

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE
PLANTAS**

**Diversidad y relaciones genéticas del complejo *Agave
angustifolia* Haw. y los agaves mezcaleros
del occidente de México.**

T e s i s
que para obtener el grado académico de
Doctora en Ciencias

presenta:

Ofelia Vargas Ponce

Centro de Investigación Científica de Yucatán

Mérida Yucatán México

2007



Director de Tesis: Dra. Patricia Colunga GarcíaMarín

CONTENIDO

	Página
Agradecimientos	i
Índice de Cuadros	i
Índice de Figuras	v
Resumen	vii
Abstract	ix
Introducción	1
Literatura citada	6
Capítulo 1. Antecedentes generales	9
1.1. Enfoques en el estudio de la diversidad de plantas manejadas por el humano	9
1.2. Área de estudio y su importancia en la elaboración de mezcal.....	11
1.3. Recursos fitogenéticos para la elaboración de mezcal y el complejo <i>Agave angustifolia</i> Haw. en el centro-occidente de México	12
1.4. Hipótesis de trabajo	15
1.5. Objetivo general	17
1.5.1. Objetivos particulares	17
1.6. Literatura citada	18
Capítulo 2. Agaves mezcaleros en el centro-occidente de México: diversidad y mantenimiento <i>in situ</i>.	
.....	25
Abstract	25
Resumen	25
2.1. Introduction	26
2.2. Materials and methods	28
2.2.1. Study Area	28
2.2.2. Ethnobotanical evidence	30
2.2.3. Morphological evidence	30
2.3. Results	33
2.3.1. Natural populations	33
2.3.1.1. Richness and distribution of natural populations	33
2.3.2. Tolerated, encouraged and cultivated germplasm	33
2.3.2.1. Richness, distribution and frequency	34
2.3.2.2. Producer classification, management and selection of germplasm	35

2.3.3. Morphological variation of wild, tolerated, fomented and cultivated populations	37
2.4. Discussion and conclusions	40
2.4.1. Primary gene pools of selection of traditional landraces	40
2.4.2. Producer role in germplasm diversification and maintenance	41
2.4.3. Morphological variation in wild, tolerated and encouraged populations and traditional landraces	42
2.4.4. Conservation, maintenance, use and management of <i>Agave</i> genetic resources	44
Acknowledgments	45
2.5. Literature cited	45
Appendix 2.1	49
Capítulo 3. Diversidad, diferenciación y relaciones genéticas de los agaves mezcaleros y las poblaciones silvestres relacionadas en el occidente de México.	
.....	48
Abstract	51
Resumen	51
3.1. Introduction	52
3.2. Materials and methods	55
3.2.1. Collection sites, plant materials and DNA extraction	55
3.2.2. ISSR generation and analyses	57
3.2.3. Data analysis	58
3.3. Results and discussion	62
3.3.1. Genetic diversity	62
3.3.2. Genetic differentiation	65
3.3.3. Genetic relationships	69
3.4. Conclusions	72
Literature cited	73
Capítulo 4. Origen y relación genética de <i>Agave tequilana</i> Weber con poblaciones silvestres de <i>Agave angustifolia</i> Haw. del centro-occidente de México inferidos con marcadores ISSR	
.....	77
Resumen	81
4.1. Introducción	82
4.2. Materiales y métodos	87
4.2.1. Sitios de colecta y material vegetal	87

4.2.2. Amplificación y electroforésis de ISSR.....	88
4.3.1. Agrupamiento genético entre individuos y entre poblaciones .	91
4.4. Discusión y conclusiones.....	96
4.5. Literatura citada	101
Capítulo 5. Conclusiones generales.	107
Perspectivas	110

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Colunga GarcíaMarín por la dirección de este trabajo, por su guía y asesoría. Por inculcarme el gusto por los agaves, reconocer la importancia del trabajo etnobotánico y el papel de los campesinos en la evolución de las plantas manejadas. Por compartirme su experiencia académica y mostrarme su entusiasmo por el trabajo científico, la tenacidad y el ejercicio riguroso a veces exhaustivo que se requiere para realizarlo. Por su revisión al documento y sus cuestionamientos en diferentes fases del proyecto.

Un reconocimiento especial al Dr. Daniel Zizumbo por su participación activa y entusiasta a lo largo de este trabajo, quién aportó valiosas discusiones y enseñanzas que le dieron forma a este proyecto y al documento de tesis.

Al comité tutorial integrado por los Dres. Daniel Zizumbo, Patricia Delgado y Luis Eguiarte, cuya contribución a lo largo del trabajo ayudó a precisar la delimitación y cohesión del proyecto de tesis. A los Dres. Alejandro Casas y Dr. Alfonso Larqué quienes junto con el comité tutorial participaron como jurado evaluador del examen predoctoral, sus aportaciones y cuestionamientos fueron de gran importancia para la etapa final de este trabajo. De igual forma, a los miembros del jurado evaluador de la tesis, los Dres. Alejandro Casas, Patricia Colunga, Luis Eguiarte, Jaime Martínez, Javier Mijangos, Renata Rivera, Daniel Zizumbo, les agradezco por su tiempo y dedicación para revisar este trabajo, por sus aportaciones, cuestionamientos y recomendaciones que mejoraron el documento.

A las autoridades de la Universidad de Guadalajara por el apoyo institucional para realizar estudios de doctorado, a la SEP y al PROMEP por la beca otorgada (CGA/UDG-492). La SINAREFI-SAGARPA (P-007) y CONABIO (P-CS007) otorgaron financiamiento parcial para esta investigación. Al personal del Centro de Investigación Científica de Yucatán, particularmente del departamento de Posgrado, Biblioteca, Computo y Administrativo, por las facilidades brindadas y su atento apoyo logístico.

Agradezco a Adrián Galván, Roberto Nieto, Jesús Rosales y Francisco Santana por su apoyo en el trabajo de campo y a Julián Coello Coello, Jaime Martínez, Filogonio May Pat y Mayabel Guisazola por su invaluable apoyo para desarrollar el trabajo de laboratorio. A Miguel Fernández, Patricia Flores, Víctor Canche y Angélica Chan por su amistad y asistencia brindada. A los campesinos del sur de Jalisco, particularmente Macario, Miguel y Apolinar Partida, Federico y Santos Juárez, por su hospitalidad, amabilidad y por compartir su conocimiento conmigo. Al Dr. Abisaí García Mendoza por su asesoría y apoyo para la determinación taxonómica de los ejemplares de *Agave*. A Gilberto Acosta por su apoyo en la generación del mapa del área de estudio. Un reconocimiento especial a Jaime Martínez, compañero académico y amigo. A Fabián Rodríguez, esposo, por ser mi contrafuerte siempre.

Dedicatoria

*A mi familia, esposo e hijos, con amor,
por su significancia en mi vida.*

Índice de Cuadros

	Página
Table 2.1. Name, code, management status, and distribution in the study area of the 23 wild and cultivated <i>Agave</i> populations included in morphological analysis.	30
Table 2.2. Characters evaluated in the variation morphological analysis and eigenvectors of the first (PC1), second (PC2), and third (PC3) principal components.	33
Table 3.1. Number, name, code, locality of origin, and genetic diversity of wild and cultivated <i>Agave</i> populations studied.	60
Table 3.2. Genetic differentiation in wild and cultivated <i>Agave</i> populations estimated with ISSR markers in different levels of analysis.	66
Table 3.3. Summary of the AMOVA analysis based on genotypic distances of <i>Agave</i> populations in different levels.	68
Table 3.4. Genetic structure of <i>Agave</i> populations estimated with Bayesian approximation in three different analysis levels and the $f = 0$ model.	69
Cuadro 4.1. Procedencia de las poblaciones silvestres de <i>A. angustifolia</i> Haw. y cultivares de Tequila.	89
Cuadro 4.2. Proporción de membresía estimada por población mediante el programa Structure (Pritchard, 2000).	96

Índice de Figuras

Página

Figure 2.1.	Studied zones where ethnobotanical exploration was done in central and south of the state of Jalisco, West-Central Mexico, and study area sites of morphological analysis of wild and cultivated <i>Agave</i> populations.	29
Figure 2.2.	Plots of Discriminant Function Analysis (DFA), Principal Components Analysis (PCA) and Cluster Analysis (CA) of the 23 wild and cultivated <i>Agave</i> populations in Jalisco, West-Central Mexico.	39
Figure 3.1.	Study area: west-central Mexico. Populations of <i>Agave</i> studied in central and southern Jalisco.	56
Figure 3.2.	<i>Agave</i> genetic diversity estimated with ISSR markers in three levels of analysis.	63
Figure 3.3.	Genetic relationships of wild and cultivated <i>Agave</i> population inferred from ISSR markers using Nei's genetic distance (1972).	71
Figura 4.1.	Area de estudio en el centro-occidente de México.	88
Figura 4.2.	Dendograma de similitud genética entre los individuos silvestres de <i>Agave angustifolia</i> Haw. y las variedades cultivadas de Tequila.	93
Figura 4.3.	Patrones de agrupación mostrados por el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basados en el coeficiente de distancia de Gower sobre los datos ISSR de 293 individuos silvestres de <i>Agave angustifolia</i> Haw. y las variedades cultivadas de <i>Agave tequilana</i> Weber.	94
Figura 4.4.	Dendograma de relaciones genéticas de poblaciones silvestres de <i>Agave angustifolia</i> Haw. y variedades cultivadas de <i>Agave tequilana</i> Weber basado en la distancia genética de Nei (1972) y método de agrupamiento del vecino más cercano.	94
Figura 4.5.	Coefficiente de ancestría estimada por individuo (q) agrupado por población ($K = 11$) basado en el análisis de asignación bayesiana.	95

RESUMEN

Agave angustifolia Haw. es el principal acervo genético del cual se han seleccionado en México diferentes cultivares para producir bebidas destiladas llamadas popularmente mezcales, como el "Bacanora" y el "Espadín" de Sonora y Oaxaca, incluyendo el Tequila. El origen de estas bebidas en el centro-occidente de México está ligado a la introducción del destilador filipino a las costas de Colima a fines del siglo XVI y al uso de esta tecnología en la destilación de bebidas fermentadas de *Agave* tradicionales existentes en tiempos precolombinos. Las estribaciones de los volcanes de Colima, en el sur de Jalisco, han sido propuestas como el centro primario de diversidad y selección del germoplasma de *Agave* usado en la elaboración de mezcal y Tequila. En este trabajo se evaluó la diversidad, diferenciación y relaciones genéticas del complejo *A. angustifolia* y los agaves mezcaleros del centro y sur de Jalisco, en el occidente de México y el papel de los campesinos tradicionales en la diversificación y mantenimiento *in situ* de estos recursos genéticos. La evidencia etnobotánica, morfológica y molecular generada reveló la existencia de 18 cultivares tradicionales, morfológica y genéticamente diferenciados, de los cuales la mayor riqueza se encuentra en el sur de Jalisco. El aprovechamiento tradicional incluye poblaciones del gradiente silvestre-domesticado bajo diferentes intensidades de selección y manejo. *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* son los acervos primarios de selección para cultivo. En las parcelas tradicionales hay una alta riqueza de cultivares correlacionada con la selección campesina de morfotipos diversos de agaves, silvestres y cultivados, de diferente procedencia, así como con bajas presiones de mercado. El estudio de 69 loci polimórficos generados con dos iniciadores de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), mostró que los cultivares tradicionales tienen niveles de diversidad genética ($H_E = 0.20 - 0.35$) similares o una tercera parte menores a las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* de la región ($H_E = 0.29 - 0.40$), en contraste con la baja diversidad ($H_E = 0.08$) encontrada en *A. tequilana* var. azul. Existe una considerable diferenciación ($\Phi_{ST} = 0.35$) entre las poblaciones silvestres y las cultivadas. El acervo silvestre de *A. angustifolia* presentó una baja estructura genética ($F_{ST} = 0.17$), lo que puede ser explicado por la ancestría y poza génica que comparten las poblaciones de esta especie y por el posible flujo génico entre estas. El acervo cultivado mostró una

mayor estructura genética ($F_{ST} = 0.36$) resultado de las prácticas de manejo campesino como: eliminación de la reproducción sexual, la propagación vegetativa, la baja frecuencia de intercambio de plantas entre sitios de cultivo, que disminuyen el flujo génico y mantienen la diferenciación. Las distancias genéticas ($D = 0.12 - 0.28$) mostraron una cercana relación del germoplasma cultivado con el acervo de *A. angustifolia*, evidenciando que algunos cultivares tradicionales del sur de Jalisco han sido seleccionados de poblaciones de esta especie de esta región. Por otra parte, las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* del centro de Jalisco resultaron genéticamente más relacionadas con el cultivar Sigüin y al agave azul, la variedad comercial del Tequila. El estudio en su conjunto demuestra que el manejo agrícola tradicional ha favorecido la riqueza, generación y conservación *in situ* de cultivares genéticamente diversos, mientras que el manejo comercial ha conducido a la disminución de la diversidad. La información generada es relevante para desarrollar propuestas de manejo sustentable y conservación *in situ* de los recursos genéticos de *Agave*.

ABSTRACT

Different landraces have been selected from the *Agave angustifolia* Haw. pool for production of spirits such as "Bacanora", "Espadín" and tequila. The origin of these spirits in west-central Mexico is linked to introduction of the Philippine-style still to the Colima coast in the late 16th Century and its use for distillation of traditional fermented *Agave* beverages produced before European contact. The foothills of the Colima volcanoes have been proposed as the primary center of diversity and germplasm selection for the *Agave* species used in mezcal and tequila production in this region. This research evaluated diversity, differentiation and genetic relationships within the *A. angustifolia* complex and the mezcal agaves in the center and south of Jalisco state, Mexico, and the role of farmers engaged in traditional practices in the diversification and *in situ* management of these genetic resources. The ethnobotanical, morphological and molecular data generated in this study indicated the existence of 18 morphologically- and genetically-differentiated, traditional landraces, with the highest diversity in southern Jalisco. Traditional use practices involve *Agave* populations along a wild-domesticated gradient under different selection and management intensities. *Agave angustifolia* and *A. rhodacantha* Trel. are the primary selection pools for mezcal agaves. Traditionally managed parcels have high landrace richness correlated to farmer selection of varied agave morphotypes (wild and cultivated) from different locations, as well as to local demand for agave spirits. Analysis of 69 polymorphic loci of Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) showed there to be high genetic variation in wild *A. angustifolia* populations in the region ($H_E = 0.29 - 0.40$); diversity levels in traditional landraces ($H_E = 0.20 - 0.35$) similar to, or slightly lower than, wild populations; and very low diversity ($H_E = 0.08$) in *A. tequilana* Weber var. azul. Genetic differentiation between the wild and cultivated populations is considerable ($\Phi_{ST} = 0.35$). The wild *A. angustifolia* pool has low genetic structuration ($F_{ST} = 0.17$), probably due to these populations' shared ancestry and gene pool, and possible gene flow between them. The cultivated pool has higher genetic structuration ($F_{ST} = 0.36$) caused by farmer management practices such as elimination of sexual reproduction, vegetative propagation and low plant exchange frequency between cultivation sites. These practices decrease gene flow and maintain genetic differentiation between

landraces. Analysis of genetic distances showed there to be a close relationship ($D = 0.12 - 0.28$) between the cultivated germplasm and the *A. angustifolia* pool, meaning that some of the traditional landraces in southern Jalisco have been selected from *A. angustifolia* populations in this region. The Sigüin landrace and commercial blue agave variety are more closely genetically related to wild *A. angustifolia* populations in central Jalisco. Overall, study results indicate that traditional agricultural management practices have favored richness, generation and *in situ* maintenance of genetically diverse landraces whereas commercial management practices have led to decreasing diversity. The data generated are relevant to development of proposals for the sustainable management and *in situ* maintenance of *Agave* genetic resources.

Introducción

La pérdida de la diversidad biológica causada por sobreexplotación de recursos, fragmentación de habitats, deforestación, ganadería extensiva y establecimiento de sistemas agrícolas comerciales, entre otros factores, ha conducido al desarrollo de estrategias de conservación de las plantas cultivadas. El establecimiento de bancos de germoplasma *ex situ*, se ha dirigido principalmente a conservar la diversidad de cultivos de importancia mundial, mientras que la conservación *in situ* de la agrobiodiversidad se práctica principalmente en los centros de domesticación, tanto en cultivos menores como en especies de importancia local y regional. La conservación *in situ* busca mantener la diversidad del acervo cultivado (variedades locales, razas criollas) principalmente dentro de agroecosistemas tradicionales, asociado con sus parientes silvestres y en las condiciones ecológicas y culturales de las cuales han sido producto y en los que han evolucionado (Altieri & Merrick, 1987; Brush, 1991; Maxted *et al.*, 2002). La principal contribución de la conservación *in situ* es el mantenimiento del proceso evolutivo más que del germoplasma en sí mismo (IPGRI, 1996).

México forma parte del centro mesoamericano de origen de la agricultura y de diversidad de plantas domesticadas (Vavilov, 1926; Harlan, 1971). Los agroecosistemas tradicionales son escenarios dinámicos de evolución y diversificación de los recursos fitogenéticos, así como de origen de nuevos cultivos (Hernández, 1998; Bye, 1998; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 1993). La variabilidad, heterogeneidad y diversidad de condiciones ecológicas, productivas y culturales en las que se realiza la agricultura tradicional han propiciado que se conserve gran parte de la diversidad de las especies domesticadas, las variedades locales y sus parientes silvestres.

El aprovechamiento tradicional de plantas puede incluir a poblaciones silvestres, toleradas o fomentadas junto con las cultivadas, por lo que es posible encontrar a las plantas útiles en diferentes fases evolutivas de un gradiente entre lo silvestre y lo domesticado (Colunga-GarcíaMarín *et al.* 1986; Casas *et al.* 1996; Colunga-GarcíaMarín, 1998). Como consecuencia del manejo humano las poblaciones de las especies aprovechadas pueden presentar cambios en su constitución genética, incluyendo su diversidad, pudiéndose incrementar su variabilidad intraespecífica ó disminuir hasta la pérdida total (Hawkes,

1983; Doebley, 1992; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 1993; Hernández, 1998).

En el proceso evolutivo de las plantas cultivadas, como en el de otros organismos silvestres, intervienen fuerzas evolutivas como la deriva génica, la mutación, la migración, la recombinación y la selección natural (Ladizinsky, 1998); sin embargo, esta última puede actuar minimizando o maximizando a su vez la presión de selección ejercida por los humanos (selección artificial) sobre el recurso vegetal, cambiando la constitución genética de las poblaciones manejadas a través del tiempo (Colunga-GarcíaMarín, 1996).

Hoy en día se reconoce la importancia de generar información sobre la variabilidad genética existente en los cultivos y en los acervos silvestres relacionados, para diseñar estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, que ayuden a disminuir la pérdida de la diversidad (Ladizinsky, 1998; Maxted *et al.*, 2002). Asimismo, es de suma relevancia documentar los factores naturales que afectan la diversidad, la biología reproductiva, el tipo de reproducción, los niveles de flujo génico, la estructura genética, y los factores sociales que influyen en los criterios de selección del germoplasma y el manejo agrícola que están determinando el proceso de evolución (Eguiarte *et al.*, 2003). La investigación realizada en esta tesis se enmarca dentro de los estudios evolutivos de las plantas mesoamericanas manejadas por el hombre, particularmente en *Agave* spp., utilizado para obtener alimento, fibras y bebidas, entre otros fines (Callen, 1965; Gentry, 1982; Smith, 2001).

En el centro-occidente de México el uso del germoplasma de agaves para producir bebidas destiladas, llamadas popularmente "mezcales", tiene una antigüedad alrededor de 400 años (Bruman, 1940, 2000; Walton, 1977; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). A finales del siglo XVI se introdujo el destilador asiático al centro-occidente de México y la población nativa lo incorporó a la destilación de las bebidas fermentadas tradicionales de *Agave* (Bruman, 1940, 1944; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007; Zizumbo-Villarreal & Colunga-GarcíaMarín, 2007). Actualmente, en las estribaciones de los volcanes de Colima, en el sur de Jalisco, existen al menos 24 cultivares tradicionales de *Agave*, por lo que esta región ha sido propuesta como la zona núcleo de diversidad y selección primaria de germoplasma de *Agave* spp. para producir mezcal (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-

Villarreal, 2007). La diversidad genética de los cultivares tradicionales y su relación genética con las poblaciones silvestres de *Agave* no ha sido documentada aún y ésta se encuentra en grave riesgo de pérdida y erosión, debido al cultivo extensivo de *A. tequilana* Weber var. azul para la producción de Tequila, un mezcal por origen, que adquirió este nombre en el siglo XIX.

Considerando tal problemática el tema central de esta investigación fue documentar la diversidad de los agaves mezcaleros mantenidos en agroecosistemas tradicionales y comerciales en el centro-occidente de México y de las poblaciones silvestres de *Agave* relacionadas así como evaluar el papel de los campesinos en el mantenimiento y generación de la diversidad de este germoplasma. De particular interés fue *A. angustifolia* Haw., una especie de la que han sido seleccionados algunos cultivares para producir bebidas destiladas en México, y que de acuerdo con Gentry (1982) también es precursora de *A. tequilana* var. azul en la región de estudio, donde además algunas poblaciones silvestres de *A. angustifolia* son utilizadas para elaborar mezcal.

En este estudio se hace referencia a poblaciones silvestres y cultivadas y a distintas categorías de manejo (poblaciones toleradas, fomentadas, cultivadas tradicionalmente y comercialmente), que se definen a continuación: la concepción de población silvestre corresponde con el concepto de ecología de poblaciones. Una población tolerada se encuentra asociada o cercana a agroecosistemas tradicionales (no es eliminada cuando se establecen los cultivos) y es aprovechada en forma directa por los campesinos. Una población fomentada se encuentra en condiciones similares a la tolerada, pero el campesino ejerce un manejo mayor sobre ella, realizando acciones que favorecen la permanencia e incremento de la población y del objeto de aprovechamiento. Una población cultivada bajo manejo tradicional, definida con el término de cultivar local y de distribución casi siempre local, corresponde con una unidad de manejo campesino, reconocida por éste con base en un conjunto de atributos particulares, la cual es manejada como una unidad independiente de otros cultivares dentro de un mismo campo de cultivo. Una población cultivada bajo manejo comercial, definida aquí como variedad comercial, corresponde a una entidad reconocida en una escala geográfica mas amplia con base en un conjunto de características morfológicas distintivas y generalmente

exhibe menor variación morfológica. También se hace referencia a tres agroecosistemas de cultivo, milpa, mezcalera y plantación; la milpa es el sistema en el cual se cultiva tradicionalmente maíz, frijol y calabaza y se incorporan otros elementos como los agaves; la mezcalera es un agroecosistema tradicional donde se cultivan exclusivamente varios cultivares locales de agave mientras que en la y plantación comercial sólo se cultiva una variante de agave.

Cuatro preguntas centrales fueron consideradas en el estudio: ¿Cuál es la diversidad genética actual de las poblaciones silvestres y cultivadas de *Agave* spp. utilizadas para elaborar bebidas destiladas en el área de estudio?, ¿Cómo está distribuida esta diversidad?, ¿Cuál es la relación genética entre el acervo cultivado y las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*, su ancestro putativo? y ¿Cuál es el papel de los campesinos tradicionales en la conservación *in situ* de la diversidad de agaves mezcaleros?.

Las hipótesis centrales de este trabajo fueron: a) Las estrategias de manejo campesino favorecen la diversidad del germoplasma de agaves mezcaleros en los agroecosistemas tradicionales del centro-occidente de México. b) La intensificación del manejo humano incrementa la diferenciación entre acervos cultivados en relación con los silvestres. c) El acervo cultivado (los cultivares tradicionales y la variedad comercial de Tequila) tiene una cercana relación genética con las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* de la región de estudio. Las predicciones particulares para cada una de estas hipótesis se detallan en el capítulo 1 de esta tesis. Los resultados son discutidos en términos del papel de los campesinos tradicionales en la conservación *in situ* de la diversidad de estos recursos genéticos.

La estrategia metodológica empleada para responder a estas preguntas integró el análisis de evidencias etnobotánicas, morfológicas y moleculares, a través del uso de técnicas de estadística descriptiva, análisis multivariados y genética de poblaciones.

En el Capítulo 1 se presenta el marco teórico de esta investigación: la introducción a los temas que se abordan en este trabajo, justificando la importancia del enfoque etnobotánico y la genética de poblaciones como metodologías para entender la dinámica evolutiva de las especies manejadas. Se hace una breve introducción al área de estudio y los recursos genéticos de *Agave* utilizados para la

elaboración de bebidas destiladas. Se establecen las hipótesis y los objetivos generales. En los Capítulos 2, 3 y 4, se desarrollan los resultados centrales del trabajo, los cuales son presentados como artículos científicos. En el Capítulo 2 se presenta un análisis morfológico y etnobotánico de los agaves mezcaleros (incluido el agave azul) y las poblaciones silvestres de *Agave* relacionadas en el centro-occidente de México, contrastando el manejo y el mantenimiento de la diversidad en los agroecosistemas tradicionales y en los sistemas de agricultura comercial. Los resultados indicaron una alta riqueza de cultivares tradicionales morfológicamente diferenciados, que han sido seleccionados del acervo de *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* Trel. sugiriendo la existencia de una alta diversidad y diferenciación genética. Estos resultados contrastan con el cultivo univarietal del agave azul en las plantaciones comerciales. En el Capítulo 3 se muestra el análisis de la diversidad, diferenciación y relaciones genéticas de los agaves mezcaleros y las poblaciones silvestres relacionadas utilizando marcadores moleculares Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). Los resultados mostraron que los cultivares tradicionales tienen una alta diversidad genética, similar a la de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*, contrastando con la baja diversidad de la variedad comercial de Tequila. Las poblaciones silvestres presentaron una baja diferenciación genética entre sí, mientras que ésta se incrementó en las poblaciones toleradas-fomentadas aún más en las cultivadas. Asimismo, se encontró que *A. angustifolia* tiene una relación cercana con el germoplasma cultivado. En el Capítulo 4 se presenta un análisis de las relaciones genéticas entre las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* y el acervo cultivado para Tequila utilizando marcadores moleculares ISSR. Los resultados mostraron que una población de *A. angustifolia* de Ameca, en el centro de Jalisco, tiene la mayor similitud morfológica y genética con *A. tequilana* var. Azul, resultando ser el linaje más cercanamente relacionado. La variedad Sigüin también tiene una relación genética cercana con *A. angustifolia* y con la población de Ameca. Estos hallazgos tienen una implicación importante para la conservación del germoplasma silvestre y cultivado de *Agave*. En el Capítulo 5 se presenta una discusión que integra todas las evidencias, derivando en las conclusiones generales del trabajo y perspectivas.

Literatura Citada

- Altieri, M. A., and L. C. Merrick. 1987. *In situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. *Economic Botany* 41:86-96.
- Brush, S. B. 1991. A farmer-based approach to conservation crop germplasm. *Economic Botany* 45:153-165.
- Bruman, H. J. 1940. Aboriginal Drink Areas of New Spain. Tesis Doctoral, Universidad de California, Berkeley. 243 pp.
- Bruman, H. J. 1944. The Asiatic Origin of the Huichol Still. *Geographical Review* 34:418-427.
- Bruman, H. J. 2000. Alcohol in Ancient Mexico. University of Utah Press, Salt Lake. 158 pp.
- Bye, R. 1998. La intervención del hombre en la diversificación de plantas en México. En: Ramamorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (compiladores). *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. págs. 689-713.
- Callen, E. O. 1965. Food habits of some Pre-Columbian Mexican Indians. *Economic Botany* 19:335-343.
- Casas, A., M. Vázquez, J. L. Viveros and J. Caballero. 1996. Plant management among the Nahua and the Mixtec in the Balsas river basin, Mexico: an ethnobotanical approach to the study of plant domestication. *Human Ecology* 24:455-478.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 1996. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis de doctorado, Instituto de Ecología-UACPyP/CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Colunga-García Marín, P. 1998. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 62:109-128.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Hernández-Xolocotzi y A. Castillo-Morales. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola y grados de

- domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. *Agrociencia* 65:7-49.
- Colunga-GarcíaMarín, P. y D. Zizumbo-Villarreal. 1993. Evolución bajo agricultura tradicional y desarrollo sustentable. En: *Cultura y manejo sustentable de los Recursos Naturales. Volumen I*. E. Leff y J. Carabias (coordinadores). CIIH-UNAM. Miguel Angel Porrúa. México, D.F.: págs.123-164.
- Colunga-GarcíaMarín, P., and D. Zizumbo-Villarreal. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16:1653-1667.
- Doebley, J. 1992. Molecular systematics and crop evolution. En: P. S. Soltis, D. E. Soltis, and J. J. Doyle (eds). *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall, New York, NY. Pags. 202-222.
- Eguiarte F., L.; X. Aguirre; M. Rocha; C. Torres; A. Silva y A. Valera. 2003. Diversidad genética de dos especies mezcaleras. Proyecto CONABIO V038, Informe Final. <http://www.conabio.gob.mx/institución/proyectos/resultados/infV038>. Fecha de consulta 18 de mayo 2007.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 679 pp.
- Hawkes, J. G. 1983. *The diversity of Crop Plants*. Harvard University Press, Cambridge. 183 pp.
- Harlan, J. R. 1971. Agricultural origins: center and noncenter. *Science* 174:468-474.
- Hernández X., E. 1998. Aspectos de la domesticación de plantas en México: una apreciación personal. En: Ramamorrhthy, T. P.; R. Bye; A. Lot y J. Fa (compiladores). *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. págs. 714-735.
- IPGRI. 1996. An IPGRI strategy for *in situ* conservation on agricultural biodiversity. IPGRI. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. Italy.

- Ladizinsky, G. 1998. Plant Evolution under Domestication. Kluwer Academic Publishers, Londres. 254 pp.
- Maxted, N., L. Guarino, L. Myer and E. A. Chiwona. 2002. Toward methodology for on-farm conservation of plant resources. Genetic Resources and Crop Evolution 49:31-46.
- Smith, B. 2001. Documenting plant domestication: The consilience of biological and archeological approaches. Proceedings the National Academy of Science 98:1324-1326.
- Vavilov, N. I. 1926. Centers of origin of cultivated plants. Bulletin of Applied Botany Genetic Plant Breeding 16:248.
- Walton, M. K. 1977. The evolution and localization of mezcal and tequila in Mexico. Geográfica 85:113-132.
- Zizumbo-Villarreal, D. and P. Colunga-GarcíaMarín. 2007. Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution (En prensa). DOI 10.1007/s10722-007-9255-0.

Capítulo 1

Antecedentes generales

1.1. ENFOQUES EN EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE PLANTAS MANEJADAS POR EL HUMANO

La aproximación etnobotánica y de la genética de poblaciones han sido utilizadas, de manera independiente o conjunta, para analizar la diversidad genética de las especies vegetales de importancia económica para el hombre, tanto en poblaciones silvestres como manejadas, toleradas y cultivadas, en sistemas de agricultura tradicional o comercial, incluyendo las poblaciones domesticadas. De igual forma, estos enfoques de estudio han sido utilizados para entender la evolución de las poblaciones bajo selección y manejo humano (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1986; Otero-Arnaiz *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 1996, 2006; Montes & Eguiarte, 2002; Payró *et al.*, 2005; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005; Miller & Schaal, 2005; Martínez-Castillo *et al.*, 2006). Los estudios etnobotánicos son valiosas fuentes de información sobre la diversidad y origen del germoplasma manejado por los campesinos (Colunga-GarcíaMarín & May-Pat, 1993; Colunga-GarcíaMarín, 1996; Martínez-Castillo *et al.*, 2004); los criterios de selección campesina y su relación con la diversidad (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1986; Teshome *et al.* 1997); los factores sociales, ecológicos y tecnológicos que determinan la dinámica de la diversidad (Bellon 1996; Perales *et al.*, 2003; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 1988), el efecto del manejo en la conservación y generación de la diversidad, así como su consecuencia en la diferenciación morfológica y genética entre los acervos silvestres y manejados (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1986; Colunga-GarcíaMarín, 1996; Casas *et al.*, 2006; Martínez-Castillo *et al.*, 2004; Cruse-Sanders & Hamrick, 2004; Otero-Arnaiz *et al.*, 2005), entre otros aspectos. El conocimiento tradicional y la clasificación campesina de diferentes cultivares, pueden corresponder con la variación genética infraespecífica existente (Hernández, 1970; Bellon, 1996) pero también puede subestimar o sobreestimar ésta (Quiroz *et al.*, 1990; Sambatti *et al.*, 2001). Por ello actualmente también se emplean marcadores moleculares que permiten hacer una estimación más precisa de la diversidad genética (Quiroz *et al.*, 1990; Martínez-Palacios *et al.*, 1999)

Los marcadores moleculares son una herramienta muy útil en estudios de diversidad genética, caracterización de huellas, y mapeo genético, biología evolutiva y filogenia, entre otros. En estudios de genética de poblaciones se busca trabajar con regiones de ADN polimórfico y marcadores genéticos neutrales, que informen sobre la variabilidad existente entre individuos, poblaciones o especies, su distribución dentro y entre ellas y que sean indicadores de ancestría o parentesco (Hedrick, 2000). Los marcadores ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats, por sus siglas en inglés) empleados en este estudio, amplifican regiones neutrales entre secuencias simples repetidas conocidas como microsatélites (Simple Sequence Repeats, SSR por sus siglas en inglés) las cuales tienen una amplia distribución en el genoma de tal manera que permiten hacer un amplio muestreo de éste. La generación de ISSR se apoya en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) mediante la cual se amplifica ADN genómico en presencia de un iniciador semiarbitrario que es complementario al microsatélite blanco. Cada fragmento que se obtiene corresponde a secuencias de ADN delimitadas por dos microsatélites invertidos y se obtienen patrones polimórficos para múltiples loci (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe *et al.*, 1998; Abbot, 2001; Bornet & Branchard, 2001). Los ISSRs son considerados marcadores dominantes dialélicos, en los que cada fragmento generado (con un tamaño particular) se considera como un "locus". La presencia del fragmento indica que el individuo puede ser tanto heterócigo como homócigo dominante para ese locus, mientras que la ausencia de esa misma banda en otro individuo representa el genotipo homócigo recesivo. La ausencia de una banda es interpretada como la consecuencia de la pérdida de un *locus* a través de la delección de un sitio de SSR o un rearrreglo cromosómico (Wolfe *et al.*, 1998). Debido a la naturaleza dominante de los marcadores ISSR para estimar la diversidad y parámetros poblacionales se requiere suponer que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg para calcular la frecuencia de los alelos ó recurrir a otros métodos estadísticos y probabilísticos desarrollados (estadística frecuentista y Bayesiana). Los ISSR son particularmente útiles para la caracterización de cultivares cercanamente relacionados (Godwin *et al.*, 1997; Bornet & Branchard, 2001; Fang & Roose, 1997), para estimar la diversidad, relaciones genéticas, estructura poblacional y procesos evolutivos en plantas

(Payró *et al.*, 2005; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005; Martínez Castillo, 2005; Wolfe *et al.*, 1998) y han sido es en *Agave* para estudios sobre estos temas (Aguirre, 2004; Rocha, 2006; Eguiarte *et al.*, 2006).

Para comprender la evolución a nivel genético se requiere determinar los niveles de diversidad genética en las poblaciones, su origen y los mecanismos que influyen su mantenimiento y distribución (Hartl & Clark, 1989). La variación genética es afectada por fuerzas evolutivas (selección natural, flujo génico, deriva génica y mutación), particularmente la selección (natural y humana) y el flujo génico pueden aumentarla o reducirla (Ellstrand *et al.*, 1999; Gepts & Papa, 2003). Los parámetros de genética de poblaciones son críticos para entender los procesos evolutivos que se encuentran operando en las especies y para hacer propuestas de conservación (Hartl & Clark, 1989; Hedrick, 2000; Eguiarte *et al.*, 2000, 2006). Diversos trabajos han mostrado que la información etnobotánica y molecular utilizadas en forma conjunta proveen información relevante para estimar la diversidad del germoplasma silvestre y cultivado, los factores que determinan y mantienen esta diversidad y hacer propuestas viables para la conservación *in situ* y para el manejo sustentable de esos recursos (Birnbaum *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2006; Martínez-Castillo *et al.*, 2005, 2007).

1.2. ÁREA DE ESTUDIO Y SU IMPORTANCIA EN LA ELABORACIÓN DE MEZCAL

El área de estudio abarca el centro y sur de Jalisco, ubicado en el centro-occidente de México, entre los 19-21° de latitud norte y los 103-104° longitud oeste (Figure 1). La región centro incluye los municipios de Hostotipaquillo, Tequila, Amatitán, Ameca y Magdalena, los cuales son irrigados por la cuenca del Río Grande de Santiago y por el río Ameca. La región sur comprende Sayula, San Gabriel, Tonaya, Tolimán, Tuxcacuesco y Zapotitlán de Vadillo, municipios que forman parte de la cuenca baja del río Armería-Ayuquila. Al noroeste de la región sur se ubica el municipio de Tecolotlán (en la parte alta de la cuenca y en posición intermedia entre el sur y el centro de Jalisco) y al sureste al municipio de Tuxpan (situado en la planicie entre el Volcán de Colima y las montañas que limitan con el estado de Michoacán), formando parte de la cuenca del río Tuxpan-Coahuayana; ambos municipios son parte del área estudiada.

El área de estudio forma parte de una región cultural que incluía parte de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero en la que las bebidas fermentadas de mezcal y de ciruela fueron las más importantes de su tipo en la época prehispánica (Bruman, 1940). Sin embargo, las bebidas destiladas de *Agave* tienen sus orígenes en las estribaciones de los volcanes de Colima en el sur de Jalisco, donde surgieron como resultado de la introducción del destilador asiático a finales del siglo XVI y la incorporación de esta tecnología, por los pobladores locales, a las bebidas fermentadas que ya elaboraban (Bruman, 1940, 1944, 2000; Walton, 1977; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). De esa región tal tecnología se difundió hacia el centro de Jalisco, donde se estableció la industria tequilera a mediados del siglo XVIII, y de ahí hacia otras partes de México (Walton, 1977; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). En el sur de Jalisco aún se elaboran bebidas destiladas de *Agave* utilizando destiladores rústicos similares al tipo filipino a partir de diversos cultivares locales cultivados en agroecosistemas tradicionales, mientras que en la región central de ese Estado predominan las plantaciones de *A. tequilana* para producir Tequila. Dados estos antecedentes, las estribaciones de los volcanes de Colima han sido considerados como el área de selección primaria y diversificación de germoplasma de *Agave* spp. para elaborar bebidas destiladas en el centro-occidente de México (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007), y este es uno de los supuestos generales de la presente investigación.

1.3 RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA LA ELABORACIÓN DE MEZCAL Y EL COMPLEJO *Agave angustifolia* HAW. EN EL CENTRO-OCCIDENTE DE MÉXICO

El género *Agave* (Agavaceae *sensu* Dahlgren, 1985) incluye cerca de 200 especies, 75% de ellas endémicas de México, país que es centro de origen y diversidad del género (Álvarez, 1989; Gentry, 1982). De acuerdo con Gentry (1982) al menos 11 especies silvestres y cultivadas son utilizadas para preparar bebidas destiladas en el país. De las 20 especies de *Agave* que se encuentran en Jalisco (Hernández, 2003), cinco son utilizadas con este propósito. *A. tequilana* Weber var. azul sólo se encuentra en estado cultivado y se usa para elaborar el Tequila, una bebida de gran importancia nacional. Con *Agave maximilliana* Baker se elabora la "Raicilla" una bebida destilada de la región de Talpa, Mascota y San Sebastián, en las regiones suroeste y noroeste

del estado. Con *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* Trel. se elabora la "Raicilla de la costa" en el municipio del Tuito, al suroeste del estado. Con *A. inaequidens* Koch se prepara el "vino de Abadiano" en Quitupan ubicado al sureste en los límites con el estado de Michoacán (Valencia & Cházaro, 2004). *Agave angustifolia* se utiliza para preparar el "Tusca" en Tuxcacuesco mientras que otras especies no determinadas (*Agave* spp.) se usan para elaborar el mezcal de Tonaya, Canoas y Zapotitlán, en los municipios de Tonaya, Tolimán y Zapotitlán respectivamente (observaciones personales). El proceso, la antigüedad y los acervos de *Agave* utilizados para estas bebidas no se han documentado a profundidad. Recientemente su utilización se está viendo desplazada por la importancia económica y el énfasis otorgado al Tequila, lo que también aplica al germoplasma utilizado tradicionalmente para elaborar esta bebida, ya que de las nueve variedades (Azul, Bermejo, Sigüin, Moraleño, Chato, Pie de Mula, Mano larga, Zopilote y Mezcal chino) reportadas para el siglo XIX (Pérez, 1887) han desaparecido cuatro (Zopilote, Mezcal chino, de acuerdo con Valenzuela-Zapata, 1997 y Moraleño y Pata de mula de acuerdo con Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007), y el resto se reportan como muy escasas (Valenzuela-Zapata, 1997; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007).

Del acervo de *A. angustifolia* Haw. en México se han seleccionado diferentes cultivares (linajes) usados para la preparación de bebidas destiladas, como el "Bacanora" y el "Espadín" los mezcales de Sonora y Oaxaca, respectivamente (Bahre y Bradbury, 1980; Espinosa-Paz *et al.*, 2002). Como se mencionó antes, en Jalisco también se utiliza *A. angustifolia* para preparar mezcal. En este estado esta especie se encuentra ampliamente distribuida, mayormente formando parte del bosque tropical caducifolio, del bosque de encino en ecotonía con el bosque tropical y del matorral xerófilo, en un intervalo altitudinal de 300 a 1800 msnm (Hernández, 2003). *Agave angustifolia* exhibe un gradiente de variación morfológica correlacionado con el hábitat, altitud, tipo de suelo y clima. Es posible apreciar varios morfotipos lo que concuerda con las observaciones de Gentry (1982), quien ya había indicado que esta especie es un complejo biológico que varía en un gradiente geográfico. En la presente investigación se documenta el uso y los criterios de selección de *A. angustifolia* y otros

agaves silvestres como materia prima para la fabricación de bebidas destiladas en el área de estudio.

1.4 HIPOTÉISIS DE TRABAJO

El complejo *A. angustifolia* Haw. es el principal acervo genético seleccionado en México para la obtención de bebidas destiladas (Gentry, 1982; García-Mendoza *et al.*, 1993; Colunga-GarcíaMarín, 2003). El origen de estas bebidas está ligado a la introducción del destilador filipino a las costas de Colima a fines del siglo XVI (Bruman, 1940). Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal (2007) con base en: a) antecedentes etnohistóricos y geográfico culturales sobre la difusión, b) el uso de esta tecnología en la destilación de bebidas fermentadas de *Agave* tradicionales precolombinas en el centro-occidente de México (Bruman, 1940; Walton, 1977) predijeron que en las estribaciones de los volcanes de Colima, en el sur de Jalisco, debía encontrarse el centro primario de diversidad y selección del germoplasma de *Agave* usado en la elaboración de mezcal y Tequila. La exploración entobotánica preliminar de estos autores aportó evidencia de esta predicción. Esta información junto con la hipótesis de Gentry (1982) de que *A. tequilana* Weber var. azul es un clon seleccionado de poblaciones de *A. angustifolia* en Jalisco, fueron las bases para plantear las hipótesis de este trabajo. Específicamente, el presente estudio analizó las siguientes hipótesis:

- Las estrategias del manejo campesino en los sistemas de agricultura tradicional del centro-occidente de México favorecen la diversidad de germoplasma de agaves mezcaleros. Por tanto, las poblaciones cultivadas tradicionalmente tendrán niveles de diversidad genética más altos que el cultivar comercial de Tequila y similares o un poco menores que las poblaciones silvestres.
- La intensificación del manejo agrícola mantiene la diferenciación entre acervos cultivados en relación a los silvestres y refleja diferentes intereses antropocéntricos de consumo. Por ello, las poblaciones cultivadas tendrán una menor variación morfológica que las poblaciones silvestres y la diferenciación genética del acervo cultivado corresponderá con la intensificación del manejo, a mayor intensificación se apreciará mayor diferenciación.
- Algunos cultivares tradicionales de mezcal han sido seleccionados del acervo genético de *A. angustifolia* de la región de estudio. Por lo

que exhibirán una cercana relación genética con las poblaciones silvestres de esta especie.

- *Agave tequilana* es un clon seleccionado de poblaciones silvestres de *A. angustifolia* del occidente de México. De tal forma que las poblaciones de esta especie serán el acervo genético más relacionado al agave azul.

1.5. OBJETIVO GENERAL

Estimar la diversidad, estructura y relaciones genéticas del complejo *Agave angustifolia* Haw. y los agaves mezcaleros en el centro-occidente de México y analizar el papel de los campesinos tradicionales en la diversificación y conservación *in situ* de estos recursos genéticos.

1.5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar la riqueza, la distribución y los patrones de variación morfológica de los agaves mezcaleros mantenidos en el centro-occidente de México y su relación con las prácticas de selección y manejo agrícola tradicional.
2. Estimar la diversidad y diferenciación genética de *Agave angustifolia* Haw. y los cultivares tradicionales de mezcal relacionados con este complejo en el centro-occidente de México y su relación con las prácticas de selección y manejo tradicional.
3. Evaluar las relaciones genéticas entre las poblaciones de *Agave angustifolia*, los cultivares tradicionales y la variedad comercial *Agave tequilana* Weber var. azul e identificar los acervos genéticos potenciales de los cuales fueron seleccionados.
4. Discutir los resultados en términos de la importancia del manejo campesino para la conservación de la diversidad del germoplasma de *Agave*.

1.6. LITERATURA CITADA

- Abbot, P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*, 1.8. <http://www.insectscience.org/1.8>.
- Álvarez de Zayas, A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, Universidad de la Habana Cuba 10:25-35.
- Aguirre D, X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *A. potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 73 pp.
- Bahre, C. J. and D. Bradbury. 1980. Manufacture of mezcal in Sonora, Mexico. *Economic Botany* 34:391-400.
- Bellon, M. R. 1996. The dynamics of crop infraspecific diversity: a conceptual framework at the farmer level. *Economic Botany* 54:26-39.
- Birnbaum, K., R. DeSalle, Ch. M. Peters and P. N. Benfer. 2003. Integrating gene flow, crop biology, and farm management in on-farm conservation of avocado (*Persea americana*, Lauraceae). *American Journal of Botany* 90:1219-1267.
- Bornet, B. & M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and specific tools for genome finger printing. *Plant Molecular Biological Reporter* 19:209-215.
- Bruman, H. J. 1940. Aboriginal Drink Areas of New Spain. Ph. D. Dissertation, University de California, Berkeley. 243 pp.
- Bruman, H. J. 1944. The Asiatic Origin of the Huichol Still. *Geographical Review* 34:418-427.
- Bruman, H. J. 2000. Alcohol in Ancient Mexico. The University of Utah Press, Utah. 158 pp.
- Casas, A., J. J. Cruse-Sanders, E. Morales, A. Otero-Arnaiz and A. Valiente-Banuet. 2006. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity in managed populations of *Stenocereus stellatus*

- (Cactaceae) by indigenous peoples in central Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15:879-898.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 1996. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis de doctorado, Instituto de Ecología-UACPyP/CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 2003. The domestication of henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). pp. 439–446. En: *The Lowland Maya Area. Three Millennia at the Human-Wildland Interface*. A. Gómez-Pompa, M. F. Allen, S. L. Fedick and J. J. Jiménez-Osorio (eds.). The Haworth Press Inc., Binghamton, New York.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Hernández-Xolocotzi y A. Castillo-Morales. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola y grados de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. *Agrociencia* 65:7-49.
- Colunga-GarcíaMarín, P. and F. May-Pat. 1993. *Agave* studies in Yucatan, Mexico I. Past and present germplasm diversity and uses. *Economic Botany* 47:312-327.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Estrada-Loera and F. May-Pat. 1996. Patterns of Morphological Variation, Diversity, and Domestication of Wild and Cultivated Populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. *American Journal of Botany* 83:1069-1082.
- Colunga-GarcíaMarín, P. and D. Zizumbo-Villarreal. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16:1653-1667.
- Cruse-Sander, J. M. and J. L. Hamrick. 2004. Genetic diversity and protected populations of wild American ginseng, *Panax quinquefolius* L. (Araliaceae). *American Journal of Botany* 91:540-548.
- Eguiarte, L. E., A. González González y E. Sheinvar Gottdiener. 2006. Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. CS016. México.<http://>

www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfCS016.pdf.

- Eguiarte, L. E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:131-150.
- Ellias, M., O. Panaud and T. Robert. 2000. Assessment of genetic variability in a tradicional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* 85:219-230.
- Ellstrand, N., H. Prentice and J. Hancock. 1999. Gene Flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review Ecological Systematic* 30:539-563.
- Espinosa-Paz, H., C. Arredondo-Velásquez, A. Cano-García, A. M. Canseco y F. Vázquez Quintana. 2002. La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño. INIFAP. Manual Técnico No. 2. Oaxaca, México. 68 pp.
- Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theoretical y Applied Genetics* 95:408-417.
- García-Mendoza, A., P. Colunga-GarcíaMarín y R. Bye. 1993. Los usos del *Agave angustifolia* Haw., ancestro silvestre del henequén, en toda su área de distribución geográfica. *En*: Peniche P. y F. Santamaría (eds.). *Memorias de la Conferencia Nacional sobre el Henequén y la Zona Henequenera de Yucatán*. Gob. del Edo. de Yucatán CONACYT-UADY-INIFAP. Mérida, Yucatán. pp. 92-112.
- Gentry, S. H. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 679 pp.
- Gepts, P. and R. Papa. 2003. Possible effects on (trans) gene flow from crops on the genetic diversity from landraces and wild relatives. *Enviromental Biosafety Research* 2: 89-103.
- Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer, Sunderland, Massachussets. 542 pp.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publisher. Sudbury, Massachussets. 553 pp.

- Hernández X., E. 1970. Apuntes sobre la Exploración Etnobotánica y su Metodología. Colegio de Postgraduados, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México. 69 pp.
- Hernández V., G. 2003. Inventario de especies silvestres del género *Agave* en el estado de Jalisco y relaciones genéticas inferidas mediante marcadores AFLP. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco. 103 pp.
- Martínez-Castillo, J. 2005. Diversidad intraespecífica de *Phaseolus lunatus* L. e intensificación de la agricultura tradicional en la Península de Yucatán, México. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. 128 pp.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera and P. Colunga-GarcíaMarín. 2004. Intraspecific diversity and morphophenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatán Peninsula, México. *Economic Botany* 58:354-380.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Delgado-Valerio and P. Colunga-GarcíaMarín. 2006. Structure and genetic diversity of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan Peninsula, México. *Crop science* 46:1071-1080.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts and P. Colunga-GarcíaMarín. 2007. Gene flow and genetic structure in the Wild-weedy-domesticated complex of *Phaseolus lunatus* L. in its Mesoamerican center of domestication and diversity. *Crop science* 47:58-66.
- Martínez-Palacios, A., L. Eguiarte, and G. R. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* 86:1093-1098.
- Montes, S. and L. Eguiarte. 2002. Genetic structure and indirect estimates of gene flow in three taxa of *cucurbita* (cucurbitaceae) in western México. *American Journal of Botany* 89:1156-1163.
- Otero-Arnaiz A., A. Casas, J.L. Hamrick and J.Cruse-Sanders. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae)

- under domestication in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Molecular Ecology* 14:1603-1611.
- Payró de la Cruz E., P. Gepts, P. Colunga-GarcíaMarín and D. Zizumbo-Villarreal. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato y Michoacán, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:589-599.
- Perales, H., S. B. Brush and C. O. Qualset. 2003. Dynamic management of maize landraces in central Mexico. *Economic Botany* 57:21-34.
- Pérez, L. 1887. Estudio sobre el maguey llamado mezcal en el estado de Jalisco. *Boletín de la Sociedad Agrícola Mexicana* 11:130-133.
- Quiroz, C. F., S. B. Brush, D. S. Docuhes, K. S. Zimmerer and G. Husties. 1990. Biochemical and folk assessment of variability of Andean cultivates potatoes. *Economic Botany* 44:254-266.
- Rocha M., M. G. 2006. Genética evolutiva comparada en cinco especies de *Agave*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. 164 pp.
- Sambatti, J. B. M., P. S. Martins and A. Ando. 2001. Folk taxonomy and evolutionary dynamics of Cassava: a case study in Ubatuba, Brazil. *Economic Botany* 55:93-105.
- Teshome, A., B.R. Baum, L. Fahrig, J. K. Torrance and J. H Lambert. 1997. *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L.) landrace variation and classification in north Shewa and south Welo, Ethiopia. *Euphytica* 97: 255-263.
- Valencia P., O. M, y M. J. Cházaro. 2004. El uso de los agaves en la preparación de bebidas alcohólicas en el occidente de México. RESÚMENES. IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae: Los Agaves de Importancia Económica en México, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Cultivo e Industria. 2da. ed. Monsanto. Guadalajara, México. 204 pp.
- Walton, M. K. 1977. The evolution and localization of mezcal and tequila in Mexico. *Geográfica* 85:113-132.

- Wolfe, A. D., Q. Xiang and S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Schrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR). *Molecular Ecology* 7:1107-1125.
- Zietkiewicz, E. A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-181.
- Zizumbo-Villarreal, D., E. Hernández-Xolocotzi y H. Cuanalao de la C. 1988. Estrategias agrícolas tradicionales para aprovechar el agua en Yuridia, Guanajuato, México. *Agrociencia* 71:315-340.

Capítulo 2

Agaves mezcaleros en el centro-occidente de México: diversidad y mantenimiento *in situ*.¹

ABSTRACT

Extensive monovarietal cultivation of *Agave tequilana* Weber var. azul is threatening the diversity of the germplasm used in traditional Agave spirits production in west-central Mexico. To promote the preservation, use and management of this germplasm an ethnobotanical and morphological study was done in the center and south of the state of Jalisco, Mexico. The richness, distribution, and morphological variation of wild and cultivated *Agave* populations was characterized, and producers' role in germplasm maintenance and diversification was analyzed. Results indicated that: 1) *A. angustifolia* and *A. rhodacantha* are the primary gene pools used for selection; 2) Traditional landraces are differentiated morphological entities; and 3) in situ maintenance and increase of *Agave* germplasm diversity is the results of constant selection of wild germplasm, producer management of populations in the wild-domesticated gradient, and preservation of old landraces. Preservation of *Agave* germplasm diversity in west-central Mexico requires increased cultivation and valuation of traditional landraces.

RESUMEN

El cultivo extensivo de *A. tequilana* Weber var. azul amenaza la diversidad del germoplasma de *Agave* utilizado en la producción tradicional de bebidas destiladas en el centro-occidente de México. Para promover su conservación, uso y manejo realizamos un estudio etnobotánico y morfológico en el centro y sur de Jalisco. Caracterizamos la riqueza, distribución y variación morfológica de poblaciones silvestres y cultivadas de *Agave* y analizamos el papel de

¹ Traditional cultivars of *Agave* spirits in west-central Mexico: on-farm diversity and maintenance. Ofelia Vargas-Ponce, Daniel Zizumbo-Villarreal and Patricia Colunga-GarcíaMarín. 2007. Economic Botany 61 (3): XX-XX. (En Prensa)

los campesinos en el mantenimiento y diversificación del germoplasma. Encontramos que: 1) *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* son los acervos primarios de selección; 2) Los cultivares tradicionales son entidades morfológicas diferenciadas y 3) El mantenimiento *in situ* y diversificación es resultado de la selección constante de germoplasma silvestre, manejo campesino de poblaciones del gradiente silvestre-domesticado y conservación de cultivares antiguos. Para conservar la diversidad del germoplasma de *Agave* en el centro-occidente de México se requiere aumentar la valoración y cultivo de los cultivares tradicionales.

2.1. INTRODUCTION

Supporting traditional agrobiodiversity management practices is one of the more viable options for maintaining diversity in crops of local economic and cultural importance (Altieri & Merrick, 1987; Bellon, 1996; Brush, 1991). *In situ* generation, maintenance and distribution of landrace diversity at spatial and temporal scales requires traditional knowledge, producer interest in agrobiodiversity, and the proper social, economic, and ecological conditions for production. The use, processing techniques and final destination of germplasm determine landrace management intensity and directly influence the evolutionary dynamic of traditional landraces and their wild relatives (Bellon, 1996; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 1993a; Perales, Brush, and Qualset, 2003).

Mexico was at the center of the origin of agriculture in Mesoamerica. Studies have shown that traditional peasant farmers manipulate the genetic resources of diverse local landraces through selective harvest, tolerance, promotion of wild or weedy plant populations in natural habitats, and establishment of propagules from wild, weedy, and domesticated individuals in home gardens and traditional agricultural plots (Casas *et al.*, 1996; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1986; Zizumbo-Villarreal, Hernández-Xolocotzi & Cuanalao, 1988). Ethnobotanical, morphological and molecular studies have confirmed that these practices have maintained high germplasm diversity (Bellon & Brush 1994; Martínez-Castillo *et al.* 2004; Casas *et al.* 2005; Montes-Hernández *et al.*, 2005; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005).

The genus *Agave* (Agavaceae) originated and diversified in Mexico (Álvarez-Zayas, 1989), and since at least 9000 years ago has been utilized and manipulated for myriad ends, most commonly for food

and fiber (Callen, 1965; Gentry, 1982). Mezcal-type *Agave* species (from the Nahuatl '*metl*' = *Agave* and '*ixcalli*' = cooked or baked) have been used extensively as a food source, but also to produce fermented and distilled spirits (Bruman, 1940, 2000; Gentry, 1982). In pre-conquest Mesoamerica the Mezcal-Jocote cultural area (Bruman *op cit.*), extending from the present day state of Sinaloa to the Balsas River Basin in the state of Guerrero, was the principal region in which fermented *Agave* beverages were produced and consumed. Distilling of *Agave* spirits began during the 16th Century in west-central Mexico, in the foothills of the Colima volcanoes, and along streams and rivers in the south of the state of Jalisco (Bruman, 1940, 2000; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007; Walton, 1977). From these origins, *Agave* spirits production extended to northern Jalisco and other parts of Mexico during the 17th and 18th centuries. It was not until the 19th Century that the *Agave* spirit Tequila gained popularity (Luna-Zamora, 1999; Valenzuela-Zapata, 1997).

Production of *Agave* spirits in central and southern Jalisco remains a culturally and economically important activity. It is based on at least 24 traditional landraces, most of which are cultivated in the state's southern region. Some traditionally-managed agricultural plots in the region contain high landrace diversity favored by constant incorporation of wild individuals, tolerance or encouraging of others in agricultural fields and maintenance of selected old landraces (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). Central Jalisco, in contrast, is currently dominated by monovarietal plantations of *Agave tequilana* Weber var. azul for Tequila production, and traditional landraces have become very scarce (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007; Valenzuela-Zapata, 1997).

These regional differences indicate that west-central Mexico, in the foothills of the Colima volcanoes, is the current center for diversity and primary germplasm selection of *Agave* for spirits production (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). Extensive commercial cultivation of *A. tequilana* var. azul (common name, 'Blue agave') in central Jalisco, however, now threatens the diversity of *Agave* landraces (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007; Valenzuela-Zapata, 1997). This risk highlights the need to document the antiquity, richness and frequency of *Agave* landraces in traditional agricultural plots in southern Jalisco, identify wild gene pools that have

been selected for cultivation and understand the germplasm maintenance dynamic used in this region. In response to these needs the objectives of the present study were to: 1) Characterize the richness and distribution of wild *Agave* genus populations, which may be the primary genetic pool used for selection and maintenance of *Agave* landraces for spirits production in west-central Mexico; 2) Use ethnobotanical evidence to characterize landrace richness, frequency, and age in traditional agricultural plots with high *Agave* diversity in southern Jalisco and understand how that diversity is maintained; and 3) Analyze morphological variation, differentiation, and grouping patterns in landraces and related wild populations.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. Study Area

The study area is located in west-central Mexico, in a region crossed by the Trans-Mexican Volcanic Belt, which contains the Tequila, Fuego, and Nevado de Colima volcanoes (4,260 m asl) (Figure 2.1). Within the study area sites were sampled in the central and southern zones of the state of Jalisco, which contrast in terms of *Agave* diversity and management of *Agave* landraces for spirits production (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). Significant watersheds provide irrigation in both zones; they both have warm, subhumid and dry climates, and vegetation types (subtropical scrub or tropical deciduous forest / oak forest ecotone) that favor development of wild and cultivated *Agave* populations.

Wild and cultivated *Agave* populations are utilized in the study area. Populations in natural areas are harvested directly or encouraged for this purpose, whereas those in agricultural areas may be tolerated or cultivated. Cultivation occurs mainly within three agroecosystems used in valleys or on slopes. Milpa is the principal traditional agroecosystem and involves cultivation of maize, beans, and squash during the rainy season, cattle grazing in the dry season and permanent cultivation of a mixture of *Agave* landraces. The traditional mezcalera (i.e. dedicated to growing *Agave* for spirits production) agroecosystem involves cultivation of mixed *Agave* landraces amid original vegetation (trees or shrubs) and forage grasses. Commercial, monovarietal *Agave* plantations are focused on cultivation of a single commercial variety, mainly *A. tequilana* var. azul, and the exclusion of all other vegetation.

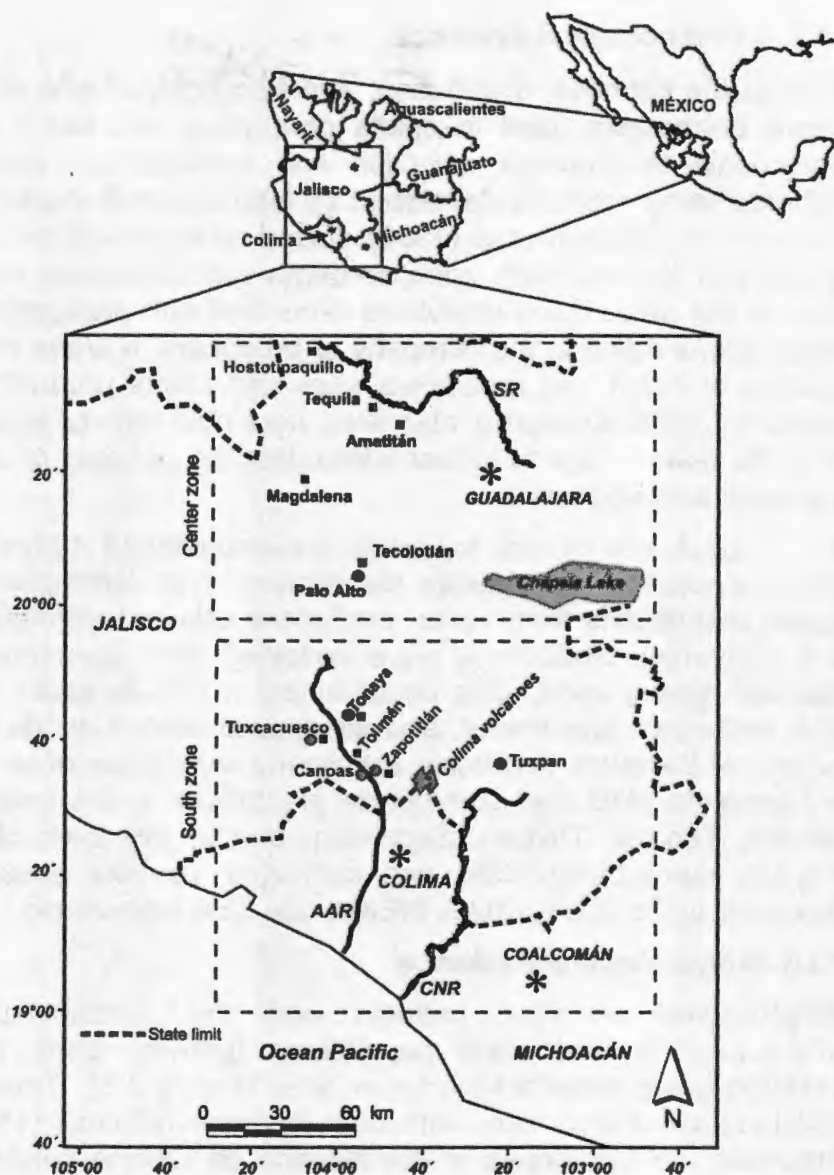


Figure 2.1. Studied zones where ethnobotanical exploration was done in central and south state of Jalisco, West-Central Mexico (dash line squares), capital cities of the municipalities included in the studied zones (■), and study area sites of morphological analysis of wild and cultivated *Agave* populations (●). SR= Santiago River, AAR= Ayuquila Armería River, and CNR Coahuayana Naranjo River.

2.2.2. Ethnobotanical evidence

Data on the richness, distribution, and frequency of wild and cultivated *Agave* germplasm used in spirits production and these parameters' relationship to producer selection and management practices were gathered using methods developed by Hernández-Xolocotzi (1970) and Colunga-GarcíaMarín *et al.* (1986). Based on reports of greater landrace diversity in the southern zone, in-depth ethnobotanical research was done in this area. Open interviews were held with producers, and direct observations made in the company of producers in areas of wild *Agave* harvest, at milpa and mezcalera sites and spirits production facilities. Additional, semi-structured interviews were held with 12 producers aged 50 to 95 years of age to further investigate the antiquity of landrace use and gene pool sources.

Specimens of wild, tolerated, and encouraged *Agave* populations were collected to characterize the richness and distribution of the wild *Agave* populations from which producers selected germplasm for use and cultivation. Specimens were collected from sites that producers reported having used, sites documented in ENCB, IBUG, MEXU, and ZEA herbarium specimens, and sites documented in the floristic and taxonomic literature. Additional specimens were taken of local landraces in mezcalera plots and commercial plantations in the municipalities of Tequila, Tonaya, Tuxpan, Zapotitlán, and in the town of Canoas in Tolimán municipality. Wild and cultivated voucher specimens were deposited in the CICY, IBUG, MEXU, and ZEA herbariums.

2.2.3. Morphological evidence

Morphological variation patterns and the relationships between landraces and wild plant populations (primary gene pools) were analyzed using material from seven sites (Figure 2.1). Three sites were traditional mezcalera sites with high landrace richness (18 landraces): Zapotitlán, on the slopes of the Nevado de Colima volcano; Canoas, 500 m from the Armería River on mountainous terrain inside the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve; and Tuxpan, on the plain between the Nevado de Colima volcano and mountains along the border with the state of Michoacan. Another three sites contained wild individuals (a wild population in Tuxcacuesco; an encouraged one in Palo Alto; and a tolerated one in Tuxpan), and the last site was a commercial *A. tequilana* plantation in Tonaya. Overall, 23 populations and 199

individuals were evaluated; most samples were 10 individuals per population, except from populations with less than 10 individuals (Table 2.1).

Only vegetative traits were considered in the morphological analysis because agaves have long life cycles and are not allowed to flower when managed for spirits production. Measurement of characteristics was done according to Colunga-GarcíaMarín *et al.* (1996) and only individuals near reproductive maturity were selected. A total of 19 characteristics (or variables) were evaluated, of which 16 were quantitative (Table 2.1). The four characteristics for leaf and terminal thorn color were recorded by transforming the two primary color dimensions (hue and value) in the Munsell notation (Munsell, 1975, 1977) to continuous color values (XY format) using the Munsell Color Conversion Software (Version 6.5.1). The three qualitative characteristics were codified using a nominal scale and were included among the 16 quantitative characteristics (Table 2.2) in a cluster analysis.

Tests of normality were done for each variable's residual values by population using the UNIVARIATE procedure of the Statistical Analysis System version 6.04 program (SAS, 1988). Except for lateral thorns length, all variable residuals were normal ($P < 0.05$). The means and variation coefficients for each variable were estimated by population (Appendix 2.1).

Producer classifications were analyzed with a Discriminant Function Analysis (DFA) using a population matrix (total individuals) and the quantitative variables. The color variables were not normal and thus were not included in the analysis. Landrace or population names were used as classification factors. Population variability levels and morphological variables were compared using a two-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey test to determine statistically-significant differences. A Principal Components Analysis (PCA) on a population means matrix was used to generate clustering patterns based on the 16 quantitative variables. Morphological similarity between populations was identified with a Cluster Analysis (CA) using the means matrix for the 16 quantitative variables, and another CA using the means matrix for all 19 variables. Populations were grouped hierarchically using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) using standardized

Euclidean distances. All statistical analyses were done with the Statgraphics version 4.1 and Statistica version 6 programs.

Table 2.1. Name, code, management status, and distribution in the study area of the 23 wild and cultivated *Agave* populations included in morphological analysis.

SS	Landrace or population name	Code	S	N	D
Z	Brocha	B	TL	9	Z
Z	Cenizo	C	TL	5	Z
Z	Chancuella	CH	TL	8	Z
Z	Cimarrón de hoja larga	CZ	TL	10	Z
Z	Ixtero Amarillo	IA	TL	8	Z,To
Z	Ixtero verde	IV	TL	4	Z,To
Z	Lineño de Zapotitlán	LZ	TL	10	Z,To,Tn,Tx
Z	Perempis	PE	TL	6	Z
Z	Prieto Presa Grande	Z	TL	9	Z
Z	Prieto de Telcruz	P	TL	6	Z
Z	Telcruz	TE	TL	10	Z
C	Verde Rápido	VR	TL	8	To
C	Cimarrón Negro	CN	TL	10	To
C	Hojudo-Pencudo	HO	TL	10	To
C	Ixtero Amarillo	IAC	TL	9	Z,To
C	Lineño de canoas	LC	TL	9	Z,To,Tn,Tx
C	Mezcal Piña	MP	TL	9	To
C	Soca	SO	TL	10	Z,To
Tu	Garabato	GA	TL	10	Tu
Tu	Sierrilla Verde Amarillento	SVA	T	9	Z,To,Tn,Tx,Tu
To	Agave azul	AA	CV	10	Z,To,Tn,Tx,Tu,Tc,Te,A,M,H
Tc	<i>A. angustifolia</i> , Palo Alto	PA	E	10	Z,To,Tn,Tx,Tu,Tc,M,H
Tx	<i>A. angustifolia</i> , Tuxcacuesco	ATX	W	10	Z,To,Tn,Tx,Tu,Tc,M,H

SS = study area site where morphological evaluation was carried out, code of sites are described in **D**.

N = number of individuals evaluated.

S = management status: TL= traditional landrace; CC= commercial variety; T= tolerate; E= encouraged; W= wild.

D = distribution in municipality of study area: A= Amatitán; C= Canoas, Tolimán; M= Magdalena; H= Hostotipaquillo; Tc= Tecolotlán; Te= Tequila; Tn= Tonaya; To= Tolimán; Tu= Tuxpan; Tx = Tuxcacuesco; Z= Zapotitlán.

Table 2.2. Characters evaluated in the variation morphological analysis and eigenvectors of the first (PC1), second (PC2), and third (PC3) principal components.

Characters	Code	A	Units	PC1	PC2	PC3
Leaf length	LL	1	cm	0.073	-0.457	0.037
Leaf width at middle	LWm	1	cm	0.108	-0.397	0.150
Terminal thorn length	TTL	1	cm	0.199	-0.062	0.488
Number of teeth (lateral thorns)	NT	*1	Amount	0.350	-0.205	-0.104
Distance between teeth	DBT	3	cm	-0.358	-0.119	-0.014
**Teeth length	TL	1	cm	-0.211	-0.385	0.096
Plant total length	PTL	1	cm	-0.002	-0.467	-0.008
Distance between teeth / Leaf length	MF	-	ratio	-0.320	0.231	-0.040
Number of teeth / Leaf length	SI	-	ratio	0.385	0.069	-0.096
Terminal thorn length / Width at base	SF	-	cm	-0.081	0.275	0.249
Leaf length / Leaf width at middle	LF	-	cm	-0.155	0.061	-0.146
Leaf length / Terminal length	LLTL	-	ratio	0.211	-0.185	-0.467
Leaf color hue	CL1	1	A	-0.334	-0.172	-0.029
Leaf color value	CL2	1	B	-0.303	-0.067	-0.131
Thorn color hue	CS1	1	A	-0.192	0.025	-0.477
Thorn color value	CS2	1	B	-0.287	0.039	-0.400
* Leaf form	FH	3	1,2,3,4,5	-	-	-
* Habit	H	3	6,7,8	-	-	-
*Length of lateral teeth	LLT	1	9, 10, 11	-	-	-

A = Number of parts measured by individual. ** Variable not normal.

* One leaf side. a, b = hue and value dimensions (Munsell notation) transformed to continuous color values (XY format). * Qualitative variable: 1= linear, 2= linear lanceolate; 3= lanceolate to linear lanceolate; 4= lanceolate; 5= ovate; 6= rosette acaulescent; 7= rosette acaulescent to subcaulescent; 8= rosette subcaulescent; 9= short, 10= medium; 11=large.

2.3. RESULTS

2.3.1. Natural populations

2.3.1.1. Richness and distribution of natural populations

The wild species *A. angustifolia* Haw., *A. rhodacantha* Trel., and *A. guadalajarena* Trel. were identified in the study area. *Agave angustifolia*

populations occurred in the tropical deciduous forest / oak forest ecotone, exhibited broad morphological variation, and occurred in three possible ecotypes. This species was found in all the sampled municipalities except Tequila-Amatitán, where original vegetation has been replaced by agriculture. *Agave rhodacantha* was distributed continuously from Atoyac Municipality in central Jalisco to Tuxpan, throughout the tropical deciduous forest between 800 and 1300 m asl, and on slopes along the Pacific coastal lowlands over 250 m asl; it was sympatric with *A. angustifolia*. *Agave guadalajarana* occurred in oak forest on the rocky slopes of Tequila Volcano and in tropical forests in Magdalena Municipality; it co-occurred with *A. angustifolia*.

2.3.2. Tolerated, encouraged and cultivated germplasm

2.3.2.1. Richness, distribution and frequency

Tolerated and encouraged *A. angustifolia* populations were found in proximity to agricultural fields in Tecolotlán and Zapotitlán municipalities, and tolerated and encouraged *A. rhodacantha* populations were located near fields in Tuxpan Municipality. Mezcalera sites in Tuxcacuesco Municipality and the town of Perempitz, Zapotitlán Municipality, were recently established using exclusively wild *A. angustifolia* (locally known as *barranqueño*).

Seventeen local landraces were identified in southern Jalisco, of which ten are considered to be old (five in Zapotitlán, four in Toluca and one in Tuxpan). Oral tradition among producers suggests that the selected landraces in Zapotitlán date to at least the time of the great grandparents of present-day producers. This translates to a minimum of 150 years for the '*Ixtero verde*', '*Ixtero amarillo*', '*Cenizo*' and '*Soca*' landraces, and at least 100 years for the '*Lineño*' landrace in Toluca.

The highest landrace richness among the studied milpa and mezcalera sites was 11 in the mezcalera sites of Zapotitlán, followed by seven in the mezcalera sites of Canoas. Only the local landrace '*Garabato*' and a very few plants of '*Peruano*' and '*Sierrilla*' landraces were observed in Tuxpan (Table 2.1). Landraces at the studied sites were largely grown by a single producer in a single mezcalera plot, although the '*Lineño*' and '*Ixtero Amarillo*' landraces were observed in more than one plot (Table 1). Landrace frequency varied between study sites, with the most abundant landraces (often 50% of total individuals)

being the most commercial, most precocious, those desired for the flavor they impart to spirits, and/or favored for their resistance to grazing and consequent usefulness as a living fence. The most frequent landraces in Zapotitlán were '*Ixtero amarillo*', '*Brocha*', and '*Telcruz*', in Canoas they were '*Lineño*' and '*Verde rápido*', and in Tuxpan it was '*Garabato*'.

2.3.2.2. Producer classification, management and selection of germplasm

Producers recognized landraces based on diverse morphological characteristics. To classify landraces, they first distinguished between wild and cultivated plants and then named the cultivated and selected landraces using proper names referring to the producer who selected the landrace, the landrace's site or town of origin, its use, tone (color), appearance, or the shape of the plant or leaves. Most producers were familiar with the names of the oldest landraces, the sites where they are cultivated and occasionally the gene pool from which it was selected. Naming consistency was high in Zapotitlán, where producers conserve a strong tradition of maintaining and preserving older landraces, but was less so in locations like Canoas, where landraces are relatively recent. Use of synonyms for the same landrace was rare: '*Lineño*' was also called Limeño, Alineño or Alimeño, and '*Soca*' was also called Cuaquesoca or Cuaquisoca. These synonyms are variants of the same name, and no instance of the same name being used to refer to different landraces was recorded.

Use of agaves in spirits production requires that the floral peduncle be removed when plants bloom and that the plant be left in place for 6 to 12 months after peduncle removal to allow accumulation of sugars. Producers at the studied sites managed wild, tolerated, encouraged, and cultivated *Agave* populations using this system, and continually monitored surrounding areas for wild plants ready to harvest. *Agave* crops are asexually propagated, that is, selection, propagation, and cultivation are done entirely vegetatively. The one observed exception occurred at the Canoas mezcalera, where producers used seeds for massive propagation over a short period.

Tolerated and encouraged populations were observed inside milpa plots. In the Tuxpan tolerated population, *A. rhodacantha* plants were tolerated, together with *Opuntia* sp. and *Acacia pennatula* (Schltdl.

& Cham.) Benth., along the milpa margin, mainly in sites with gentler slopes, which favor better development. The producer of the Palo Alto encouraged population managed it to promote vegetative maintenance and propagation of the *A. angustifolia* population in his milpa. He also allowed some individuals to flower and some *Agave* seedlings to grow with the aim of maintaining and increasing the population. Introduction of agaves from external populations was not observed.

Intensive management of *Agave* populations occurs year round in mezcalera plots. Management practices include selection of plants for introduction, propagule propagation, transplanting, removal of inflorescences and leaves, harvest of heads (for producers, an *Agave* 'head' consists of the leaf bases and stem), and distillation. Maintenance of germplasm diversity varied at the three mezcalera sites (Zapotitlán, Canoas and Tuxpan) from which material was morphologically evaluated. At Zapotitlán, wild and cultivated individuals from the region were constantly selected for incorporation into the plot. The producer also preserved older landraces selected by family members or other producers from the same town or neighboring villages, and incorporated wild material that he had selected over the last 20 to 50 years. This practice has led to at least four main gene pools at this site: *A. angustifolia*, *A. rhodacantha*, a putative hybrid of these two species, and a gene pool similar to *A. tequilana*. Plant exchange with other producers is infrequent and involves small numbers of individuals.

At Canoas, selection and introduction of *Agave* individuals from wild populations is high and most come from Cerro Grande (inside the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve). The producer also preserved regional landraces obtained through exchange or purchase of vegetative propagules from farmers in other villages, as well as older landraces selected by his grandparents or by himself. This mezcalera plot included germplasm from *A. angustifolia*, *A. rhodacantha*, another similar to *A. tequilana* and other gene pools that have not been taxonomically identified. Together with other local producers, the producer at this site belonged to a cooperative for commercial production of *Agave* spirits, leading to substantial vegetative propagules exchange between them. The Tuxpan plot was a very isolated entity because the producer was no longer interested in spirits production. No clone exchange or introduction of wild material occurred at this plot, but *Agave* plants were cultivated

along the edges of nearby plots and some wild and some tolerated *A. rhodacantha* were observed approximately 1 km away.

The commercial plantations were predominantly intensely-managed monocultures. Management at these facilities included propagule buying, selling, and exchange among producers of nearby plantations, transplant of propagule within the same plantation, weed removal, herbicide and pesticide application, head harvesting and processing for distillation. Monocultures in central and southern Jalisco most commonly use "Blue agave" clones, although 'Lineño' monocultures were observed in areas near urban centers in southern Jalisco, Tonaya, Tuxcacuesco, and Toluimán.

Human selection pressures on propagated *Agave* material were linked to use characteristics, and the production and marketing processes. Selection at the Zapotitlán mezcalera plot was focused on landraces with larger, heavier heads, even though they reach reproductive age later (10-15 years) and produce fewer vegetative propagules. Other traits selected for were high sugar content, less thominess to facilitate processing, as well as resistance to pests, diseases, and foragers to favor use in association with milpa plots and as living fences. Still other landraces were maintained in response to local and producer preferences for spirits flavor. Selection criteria in the Canoas mezcalera plot were mainly focused on obtaining landraces meeting commercial production requirements. Constant evaluation of germoplasm selectionated results led to wide biological and ecological ranges in the landraces that included all of the above characteristics.

Landrace selection at commercial plantations is determined by national-international and regional demand and is thus done considering characteristics preferred by the Tequila spirits industry, such as plant sugar content at maturity, reproductive precociousness (5 to 7 years), high vegetative propagule production, and low fiber-content ('soft') stems and heads (for easier processing).

2.3.3. Morphological variation of wild, tolerated, fomented and cultivated populations

The Discriminant Function Analysis (DFA) showed that the landraces and commercial varieties were morphologically distinct and distinguishable entities (Figure 2.2a). Eleven of the 12 discriminant

functions were statistically significant ($P < 0.005$), and classification was correct for 89.45% of the individuals. The 21 incorrectly-classified specimens belonged to three landraces; eight were '*Lineño*' individuals from the Zapotitlán and Canoas mezcalera sites that were treated as distinct populations for this analysis and exhibited no morphological differentiation. In contrast, some individuals from the 'Sierrilla Verde Amarillento' (SVA) and 'Garabato' (GA) populations resembled different landraces.

The Principal Components Analysis (PCA) incorporating the 16 quantitative variables indicated the presence of three different morphological groups and two isolated landraces (Figure 2.2b). The first three principal components explained 66.1% of total variation, and the main explanatory variables were related to plant size, thorniness and leaf color (Table 2.2). The first component identified the commercial 'Blue agave' variety (AA) by its blue color. The '*Prieto Presa Grande*' landrace (Z) had the highest number of lateral thorns in proportion to leaf length, whereas the remaining landraces had lower or intermediate thorniness and formed a heterogeneous group (Figure 2.2b). The second component determined three groups by plant size, leaf length, width leaf at middle, and lateral thorns length. The first group (I) was associated with the landraces '*Ixtero amarillo*' (IA) and '*Cimarrón de Zapotitlán*' (CZ), both known for large plant size and high thorniness. The second group (II) included 15 landraces with intermediate characteristics. The third group (III) joined the wild '*A. angustifolia* Tuxcacuesco' (ATX) population with the encouraged '*A. angustifolia* Palo Alto' (PA) population, as well as the '*Mezcal piña*' (MP), and '*Perempitz*' (PE) landraces, both known for their small size, narrow leaves and low thorniness. The commercial 'Blue agave' variety (AA) was closer to the third group because of its short lateral thorns. The third component separated the IA landrace from the rest based on thorn length and color.

The phenograms of the 16 quantitative variables (figure not shown) and of the 16 variables plus three qualitative characteristics used by producers to classify landraces (leaf shape, habit, and lateral thorns length) confirmed the grouping trends produced with the PCA. They showed four landraces (AA, Z, CZ, IA) to be more morphologically differentiated than the other landraces, and that some landraces were very similar to wild and tolerated *A. angustifolia* populations (ATX, PA)

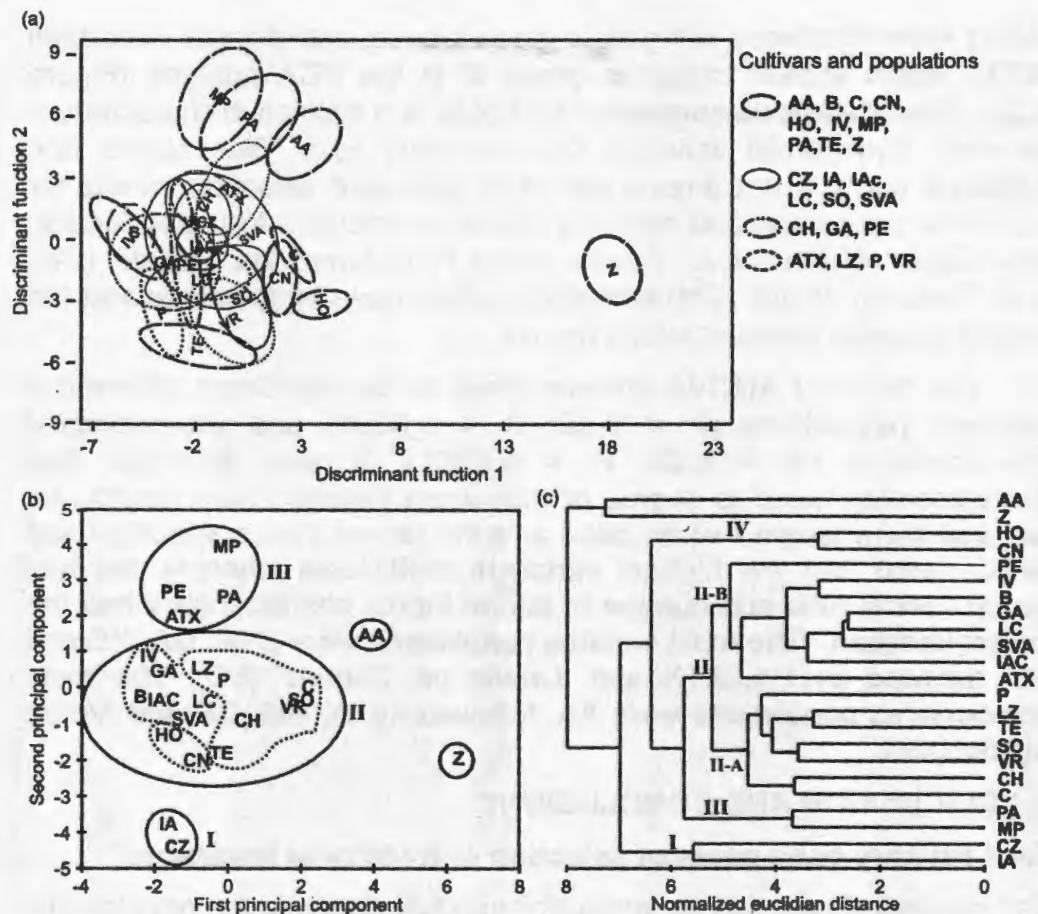


Figure 2.2 Plots of Discriminant Function Analysis (DFA), Principal Components Analysis (PCA) and Cluster Analysis (CA) of the 23 wild and cultivated *Agave* populations in Jalisco, West-Central Mexico. (a) First and second discriminant functions from analysis of 119 individuals. (b) Ordination of PCA, the first component explained 27.8 % of variation and the second 24.1 %. (c) Dendrogram of CA built with 19 variables. Codes of landraces or populations are described in Table 1.

(Figure 2.2c). Group II was separated into two subgroups: subgroup IIA included seven landraces with wider and longer leaves that are either blue, blue-green or light green; subgroup IIB included landraces with narrower leaves, that are dark or light green, the tolerated population

(SVA), other landraces with yellow-green leaves, and the wild population (ATX), which appear closer to group III in the PCA analysis (Figure 2.2b). This analysis demonstrated that color is a distinctive characteristic for more commercial varieties and landraces (e.g. 'Blue agave' and 'Lineño'), but it is not among the most important selection criteria for traditional producers, and makes a limited contribution to understanding of similarity relationships. Finally, group IV included the 'Hojudo' (HO) and 'Cimarrón Negro' (CN) landraces, which have large leaves and the largest distance between lateral thorns.

The two-way ANOVA showed there to be significant differences between populations ($F = 9.35$; $P < 0.0001$) and morphological characteristics ($F = 6.23$; $P < 0.0001$). It also indicated that characteristics linked to degree of thorniness (lateral thorns length, the terminal thorn length / width ratio, and the lateral thorns spacing / leaf length ratio) had the highest variation coefficients whereas the leaf length / width ratio and number of lateral thorns characteristics had the lowest variation. The most variable populations were SVA, GA, PE and CZ, followed by PA, ATX and 'Lineño de Canoas' (LC). The most homogenous populations were AA, followed by IA, HO, CN and 'Verde rápido' (VR).

2.4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

2.4.1 Primary gene pools of selection of traditional landraces

The results indicate that *A. angustifolia* and *A. rhodacantha* populations, as well as unclassified putative hybrids between these species, are the primary gene pools from which traditional landraces have been selected in southern Jalisco. *Agave angustifolia* is the most common species in the region and has large, morphologically-diverse populations. The observed morphotypes indicate the presence of ecotypic differentiation in response to environmental and biological factors. This differentiation makes it plausible to hypothesize that some traditional landraces in Zapotitlán ('Ixtero Verde', 'Brocha'), Canoas ('Lineño', 'Mezcal piña') and Tuxpan ('Garabato') have been selected from *A. angustifolia* populations growing in the surrounding tropical deciduous forest. In this environment, *A. angustifolia* individuals reach 1 to 2 m tall, with leaves 8 to 10 cm wide and are dark green or glaucous blue-green in color.

It is also plausible that, as suggested by Gentry (1982), the 'Blue agave' variety was selected from *A. angustifolia* populations with a morpho-phenotype similar to that mentioned above but with glaucous green to blue-green to ash colored leaves. Individuals in this color range were observed in Ameca, in the tropical deciduous forest/oak forest ecotone between 1200-1700 m asl.

Some of the cultivated landraces in Zapotitlán ('*Ixtero Amarillo*') and Canoas ('*Verde rápido*'), as well as some tolerated individuals in Tonaya ('*Sierrillas*') and Tuxpan ('*Sierrilla Verde Amarillento*'), were identified as having been selected from the *A. rhodacantha* gene pool; all were taller and had higher thorn density. The major characteristics of *Agave guadalupensis* (larger, sharper and thicker thorns, and poorly-developed stems or lack of stems) make it inadequate for spirits production, and its gene pool has consequently not been selected for this purpose.

2.4.2 Producer role in germplasm diversification and maintenance

The high richness of *Agave* genus landraces in southern Jalisco is the result of producer actions including: a strong tradition of selection and maintenance in traditional agroecosystems; agricultural management of the wild-domesticated population gradient under different selection and management intensities; and selection of landraces with different flowering periods and diverse morpho-phenological, agronomic, and organoleptic characteristics (e.g. high sugar content, reproductive precocity, high vegetative propagule production, resistance to pests and grazing). The artisanal distillation techniques used in the region also allow producers to test and select different landraces and thus increase diversity (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007).

Landrace richness in the Zapotitlán and Canoas mezcalera sites was associated with a number of factors. Traditional landraces were culturally valuable to producers at these sites, who had no desire to substitute this legacy with 'Blue agave', which is highly susceptible to pests and pathogens (which prevents polyculture) and the cultivation of which favors soil erosion. This is linked to the villages' geographic isolation, which helps to preserve their traditional culture. Spirits production in the region is also not subject to national or international market pressures since it is primarily focused on supplying the regional traditional spirits market. Producers in Zapotitlán and Canoas have

diverged in this respect now that the latter have begun to focus on higher production volumes for sale on a broader market. The low diversity at Tuxpan was related to loss of producer interest in spirits production, due to of local market displacement caused by the great commercialization of Tequila, although the town was once a prominent spirits production center (Sauer, 1990).

The distribution, frequency and differences in landrace richness observed between study sites are associated with market tendencies, producer preferences and biological characteristics. High market demand for commercial varieties is why 'Blue agave' dominate in central Jalisco and '*Lineño*' near urban areas in southern Jalisco. The relative abundance of some landraces at the mezcalera sites, in contrast, responds to local preferences in spirits flavor (e.g. '*Ixtero Amarillo*') or to higher vegetative propagule production, reproductive precocity and sugar content (e.g. '*Brocha*', '*Telcruz*', and '*Verde rápido*'). Similar landrace distribution and frequency patterns have been reported for *A. fourcroydes* Lem. (Colunga-GarcíaMarín, Estrada-Loera & May-Pat, 1996) and other crops like beans (Martínez-Castillo *et al.*, 2004) and *Opuntia* spp. (Colunga-GarcíaMarín, Hernández-Xolocotzi & Morales, 1986).

The results highlight the replacement of traditional Agave landraces in rural southern Jalisco with large-scale commercial cultivation of 'Blue agave'. Traditional landraces are now only grown by a few producers on a small scale in milpa and mezcalera agricultural systems, usually in marginal agricultural zones. A similar phenomenon occurred in the state of Yucatan, Mexico, in the early 20th Century when *A. fourcroydes* monocropping on commercial plantations for international markets displaced traditional cultivation systems (Colunga-GarcíaMarín & May-Pat, 1993b).

2.4.3. Morphological variation in wild, tolerated and encouraged populations and traditional landraces

The morphological variation patterns observed here indicate that the Agave landrace groups and subgroups in the study area are the product of natural differentiation between *A. angustifolia*, *A. rhodacantha* and hybrid populations, as well as producer selection and management at different sites. Wild populations and some traditional landraces were found to be similar to *A. tequilana*, and traditional blue morphotype

landraces in southern Jalisco may have been selected from this wild gene pool. However, their stem attributes, size and thorniness differ from 'Blue agave', properties that have not been reported in the literature.

The DFA coincided with producer landrace classifications, meaning traditional knowledge clearly matched the differences detected through comparison of morpho-phenotypes. Most of the Zapotitlán and Canoas landraces were well-differentiated morphological entities. This high morphological differentiation and the landraces' high variation coefficient values suggest the presence of well-developed genetic differentiation and a possible correspondence between observed morphological variation and genetic diversity in management of *Agave* populations.

Degree of management intensity and discontinuities in morphological variation were found to correlate. The broadest dispersal occurred in the Tuxpan landraces and tolerated populations of 'Garabato' and 'Sierrilla Verde Amarillento', which had the most variable morpho-phenotypes. These were followed by the wild (ATX) and fomented (PA) *A. angustifolia* populations, and the 'Cimarrón de Zapotitlán' (CZ) landrace, which has only recently (30 years) entered into cultivation. This demonstrates that low intensity management of younger landraces is associated with higher morphological variation. The lowest morphological variation was observed in 'Blue agave' individuals from commercial plantations and in 'Ixtero Amarillo', one of the oldest landraces in Zapotitlán. Low variation, however, was also found in the HO, CN and VR landraces from the Canoas mezcalera site, all of which were incorporated into agriculture just within the last 15 years. Of these three, only VR has been intensively managed, suggesting that some landrace's genetics can determine their uniform morphology, as is supported by the low variation coefficient values and ANOVA results for VR (Appendix 1). The same relationship between degree of management and morphological variation has been reported for *Opuntia* spp. (Colunga-GarcíaMarín, Hernández-Xolocotzi & Castillo-Morales, 1986).

The PCA showed that producers in the study area have selected for plants of large or intermediate size with a large stem, and leaves with short thorns in low densities. A similar selection pattern for larger, heavier, less thorny and more fibrous plants has been reported for *A.*

fourcroydes (Colunga-GarcíaMarín, Estrada-Loera & May-Pat, 1996). In agaves used for spirits, these traits aid in harvesting and processing and are associated with higher distillate production volume, whereas in *A. fourcroydes* they are associated with ease of harvest and higher fiber production. It is to be expected, however, that traits desirable in spirits production (e.g. high sugar content, short life cycle, high vegetative propagule production, and preferred organoleptic properties) do not always positively correlate with the above characteristics, thus explaining the observed diversity in morpho-phenotypic patterns and consequent on-going producer selection.

2.4.4. Conservation, maintenance, use and management of *Agave* genetic resources

The results confirm that extensive cultivation of 'Blue agave' threatens overall agrobiodiversity in areas where it is cultivated, as well as the diversity of *Agave* landraces used in traditional spirits production in west-central Mexico. They also highlight the need for collection and *ex situ* conservation of *Agave* genus germplasm, and the feasibility of *on farm* maintenance of these gene pools, as proposed by Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal (2007). The recent UNESCO designation of the *Agave* Landscape and Ancient Tequila Factories of Tequila (in the Tequila-Amatitán region) as a World Heritage Site (cultural landscapes category) could lead to further extension of 'Blue agave' monoculture with consequent losses of soil, natural vegetation and agrobiodiversity.

The richness of *Agave* germplasm in west-central Mexico runs the credible risk of drastic biodiversity loss due to a number of factors. Some landraces' population sizes are very small, and many occur only locally or are restricted to a just a few producers, and producers interested in preserving germplasm and older landraces are usually elderly (60+ years of age). Finally, landrace reproduction is clonal and only the most commercial variants are preferred for cultivation. Any one of these factors could produce a genetic bottleneck and concurrent loss of genetic diversity. Preserving and using the richness of *Agave* landraces in southern Jalisco is clearly important to maintaining regional of biodiversity, but may also enable future diversification of the *Agave* spirits industry (emulating a wine industry strategy) and prove the

foundation for sustainable *Agave* production based on better ecologically and economically adapted agricultural systems.

With financial support from the SAGARPA, we have begun an *on-farm* conservation program and diversity promotion at the two traditional mezcateras, Zapotitlán and Canoas, which have the highest landrace richness in southern Jalisco. We are working in collaboration with Sierra de Manantlán Biosphere Reserve authorities and the traditional mezcateros of southern Jalisco in actions that will promote the cultivation and conservation of traditional landraces at these two mezcateras. These will then serve as reservoirs of traditional *Agave* landraces and as centers for their propagation and regional distribution in the near future.

ACKNOWLEDGMENTS

This research forms part of OVP's Ph.D. dissertation and was conducted under the direction of Patricia Colunga-GarcíaMarín with Daniel Zizumbo-Villarreal as academic adviser; both are at the Laboratory of Plant Genetic Resources Diversity and Molecular Evolution, Department of Natural Resources-CICY. The authors thank Adrián Galván, Francisco Santana Michel, Roberto Nieto and Jesús Rosales for fieldwork assistance. The authors' thanks and admiration are also due the traditional mezcal producers of southern Jalisco, particularly Macario and Apolinar Partida, and Federico and Santos Juárez, for their willingness to share their knowledge and their courage to preserve their genetic resources. The curators of the MEXU, ENCB, IBUG, ZEA and CICY herbariums kindly granted access to their facilities. Special thanks to Abisaí García-Mendoza for taxonomic identification of the *Agave* specimens, Melanie Bateman for manuscript translation and Gilberto Acosta for the study area image. The SINAREFI-SAGARPA (P-007) and CONABIO (P-CS007) provided partial financial support of this research and the PROMEP granted a Ph.D. scholarship to OVP.

2.5. LITERATURE CITED

- Altieri, M. A., and L. C. Merrick. 1987. *In situ* conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. *Economic Botany* 41:86-96.

- Álvarez de Zayas, A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, Universidad de la Habana Cuba 10:25-35.
- Bellon, M. R. 1996. The dynamics of crop infraspecific diversity: a conceptual framework at the farmer level. *Economic Botany* 54:26-39.
- Bellon, M.R. and S. B. Brush. 1994. keepers of maize in chiapas, Mexico. *Economic Botany* 48:196-209.
- Bruman, H. J. 1940. Aboriginal Drink Areas of New Spain. Ph. D. Dissertation, University of California, Berkeley. 243 pp.
- Bruman, H. J. 2000. Alcohol in Ancient Mexico. The University of Utah Press, Utah. 158 pp.
- Brush, S. B. 1991. A farmer-based approach to conservation crop germplasm. *Economic Botany* 45:153-165.
- Casas, A., M. Vázquez, J.L.Viveros and J. Caballero. 1996. Plant management among the Nahua and the Mixtec in the Balsas River Basin, Mexico: an Ethnobotanical Approach to the Study of Plant Domestication. *Human Ecology* 24:455-478.
- Casas, A., J. Cruse Sander, E. Morales, A. Otero-Arnaiz and A. Valiente-Banuet. 2005. Maintenance of Phenotypic and Genotypic Diversity in Managed Populations of *Stenocereus Stellatus* (Cactaceae) by Indigenous Peoples in Central Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15:879-898.
- Callen, E. O. 1965. Food habits of some Pre-Columbian Mexican Indians. *Economic Botany* 19:335-343.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Hernández-Xolocotzi y A. Castillo-Morales. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola y grados de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. *Agrociencia* 65:7-49.
- Colunga-GarcíaMarín, P., y D. Zizumbo-Villarreal. 1993a. Evolución bajo agricultura tradicional y desarrollo sustentable. Pages 123-164 in E. Leff y J. Carabias (coordinadores), *Cultura y manejo sustentable de los Recursos Naturales. Volumen I*. CIIH-UNAM. Miguel Angel Porrúa. México, D.F.

- Colunga-GarcíaMarín, P. and F. May-Pat 1993b. *Agave* studies in Yucatan, Mexico I. Past and present germplasm diversity and uses. *Economic Botany* 47:312-327.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Estrada Loera and F. May-Pat. 1996. Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivates populations of *Agave* in Yucatán México. *American Journal of Botany* 83:1069-1082.
- Colunga-GarcíaMarín, P. and D. Zizumbo-Villarreal. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16:1653-1667.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. University of Arizona Press, Tucson. 679 pp.
- Hernández-Xolocotzi, E. 1970. *Apuntes sobre la Exploración Etnobotánica y su Metodología*. Colegio de Postgraduados, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, México. 69 pp.
- Luna Zamora, R. 1999. *La historia del Tequila, de sus regiones y sus hombres*. 2da. Edición. CONACULTA. México, D. F. 304 pp.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, H. Perales-Rivera and P. Colunga-GarcíaMarín. 2004. Intraspecific diversity and morphophenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatán Península, México. *Economic Botany* 58:354-380.
- Montes-Hernández, S., L. C. Merrick, and L. E. Eguiarte. 2005. Maintenance of squash (*Cucurbita* spp.) landrace diversity by farmer's activities in México. *Genetics Resources and Crop Evolution* 52:697-707.
- Munsell. 1975. *Munsell soil color charts*. Munsell Color, Springer, Mo.
- Munsell. 1977. *Munsell color charts for plant tissues*. Munsell Color, Springer, Mo.
- Perales, H., S. B. Brush and C. O. Qualset. 2003. Dynamic management of maize landraces in central Mexico. *Economic Botany* 57:21-34.
- SAS. 1997. *SAS/STAT user's guide*, release 6.12 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Sauer, C. 1990. Colima de la Nueva España en el siglo XVI. Traducción de E. Enríquez Salamano y R. González Chávez. Universidad de Colima y H. Ayuntamiento de Colima, Colima, México. 147 pp.
- Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Cultivo e Industria. 2da. Ed. Monsanto. Guadalajara, Jalisco. 204 pp.
- Walton, M. K. 1977. The evolution and localization of Mezcal and Tequila in Mexico. *Geográfica* 85:113-132.
- Zizumbo-Villarreal, D., E. Hernández-Xolocotzi y H. Cuanalao de la C. 1988. Estrategias agrícolas tradicionales para aprovechar el agua en Yuridia, Guanajuato, México. *Agrociencia* 71:315-340.
- Zizumbo-Villarreal, D., P. Colunga-GarcíaMarín, E. Payró de la Cruz, P. Delgado-Valerio and P. Gepts. 2005. Population Structure and Evolutionary Dynamics of Wild-Weedy-Domesticated Complexes of Common Bean in a Mesoamerican Region. *Crop Science* 45:1073-1083.

APPENDIX 2.1. Means and coefficient of variation of 12 characters evaluated on the 23 wild and cultivated *Agave* populations in Jalisco, west-central Mexico. Code, name of cultivar, populations and morphological traits are described in tables 2.1-2.2.

Trait	LL		LWm		TTL		NT		DST		TL	
Code	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
IA	209.41	5.52	12.65	2.46	3.73	5.51	94.38	3.75	2.34	12.92	0.66	7.81
TE	160.96	8.37	12.47	7.25	1.32	19.77	66.40	9.34	2.52	9.22	0.54	14.58
B	158.53	8.65	8.84	7.65	2.08	10.97	57.67	8.50	2.28	11.98	0.47	23.96
Lz	142.44	13.90	8.74	5.89	1.46	6.96	64.56	3.72	2.58	7.20	0.48	9.23
Z	145.13	22.39	12.51	11.89	1.00	14.14	163.44	11.46	0.88	15.89	0.36	14.82
CH	154.95	9.77	12.36	7.32	2.20	16.83	79.88	6.84	1.74	6.10	0.38	12.34
P	146.53	7.72	12.03	1.14	1.78	4.22	60.67	6.48	2.23	4.62	0.40	0.00
IV	139.13	18.99	7.03	21.06	1.28	7.51	48.25	17.94	2.18	4.40	0.48	20.16
C	124.96	14.75	10.70	4.23	1.94	11.87	88.40	7.40	1.26	9.05	0.48	9.32
PE	97.28	18.17	8.42	21.69	1.66	17.76	53.00	10.33	1.71	14.61	0.35	23.90
VR	153.00	4.83	10.75	6.03	1.31	8.58	87.63	4.09	1.85	2.89	0.39	21.54
CN	176.50	5.24	11.60	3.61	1.39	5.31	93.70	2.52	2.37	4.89	0.47	14.36
LC	152.90	17.08	9.06	7.53	1.50	8.31	67.00	16.20	2.75	28.90	0.51	17.17
HO	152.50	4.37	10.23	1.79	1.21	6.10	92.80	3.40	2.39	7.50	0.49	15.06
IAC	149.23	16.11	9.80	7.99	3.08	6.45	73.44	11.37	2.11	7.65	0.49	18.98
MP	99.67	9.22	6.03	10.22	2.38	4.60	71.00	4.23	1.44	10.45	0.32	13.68
SO	136.50	6.85	9.86	11.90	1.07	10.84	70.50	5.68	1.59	5.51	0.49	15.06
ATX	132.04	7.50	5.20	17.99	1.63	20.86	71.60	8.49	1.96	13.86	0.34	16.38
CZ	220.40	14.33	10.57	9.36	2.03	7.36	95.20	10.27	1.75	33.24	0.62	16.66
SVA	154.13	11.93	9.44	18.01	1.64	16.96	76.22	9.01	1.80	27.07	0.46	22.25
GA	137.57	12.47	10.09	12.70	2.12	19.61	61.80	18.97	1.97	15.88	0.47	24.67
PA	125.50	10.21	7.40	8.64	2.12	10.62	83.70	11.77	1.80	26.32	0.23	21.00
AA	143.90	4.21	7.70	6.45	1.24	4.16	108.10	4.17	1.14	4.53	0.20	0.00

APPENDIX 2.1 Continued Means and coefficient of variation of 12 characters evaluated on the 23 wild and cultivated *Agave* populations in Jalisco, west-central Mexico. Code, name of cultivar, populations and morphological traits are described in tables 2.1-2.2.

Trait	PTL		MF		SI		SF		LF		LLTL	
Code	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV	Mean	CV
IA	262.63	6.40	0.01	10.19	0.45	3.16	4.91	13.20	16.55	3.45	56.25	3.65
TE	222.20	7.57	0.02	11.16	0.41	7.00	2.73	20.27	12.93	8.46	126.33	23.13
B	204.78	8.02	0.01	6.79	0.36	4.61	4.02	8.74	17.95	6.69	76.68	7.96
Lz	165.33	15.50	0.02	8.19	0.43	13.81	3.08	9.85	16.33	14.97	98.24	15.93
Z	203.23	23.57	0.01	8.34	1.15	11.45	1.03	8.11	11.49	11.97	144.63	15.37
CH	188.13	10.96	0.01	5.79	0.52	6.38	3.17	17.97	12.52	4.58	71.29	11.26
P	178.50	10.37	0.02	5.33	0.41	1.99	4.40	19.32	12.18	7.35	82.21	7.36
IV	179.00	19.42	0.02	13.06	0.35	2.59	3.96	8.68	19.86	1.96	108.55	11.91
C	190.40	8.67	0.01	6.92	0.71	8.14	3.63	10.16	11.64	11.57	64.30	6.73
PE	131.83	19.48	0.02	20.06	0.55	6.77	3.59	14.24	11.67	9.74	59.84	22.73
VR	188.13	4.66	0.01	4.46	0.57	3.37	2.73	14.41	14.25	4.76	117.05	6.70
CN	239.80	4.07	0.01	8.13	0.53	4.58	3.96	14.63	15.21	3.24	127.25	6.63
LC	179.20	18.76	0.02	22.61	0.44	16.18	2.96	9.37	16.86	14.44	101.83	13.85
HO	198.60	5.15	0.02	7.38	0.61	5.41	1.69	8.11	14.91	4.56	126.31	5.40
IAC	188.89	15.19	0.01	11.54	0.50	7.03	3.22	19.66	15.19	11.71	48.41	13.00
MP	127.56	13.90	0.01	12.21	0.72	10.44	7.26	13.59	16.62	11.32	42.03	11.03
SO	189.90	10.22	0.01	7.45	0.52	4.27	2.11	21.68	13.94	8.15	129.52	16.15
ATX	162.10	9.43	0.01	16.33	0.54	7.63	3.65	24.12	26.10	17.78	83.11	14.28
CZ	278.00	12.97	0.01	30.57	0.44	7.78	3.02	20.31	20.94	14.29	109.50	18.49
SVA	201.06	14.52	0.01	26.82	0.50	15.43	4.01	15.28	16.69	17.84	95.66	17.83
GA	178.30	14.07	0.01	24.70	0.45	9.24	4.31	24.19	13.73	12.21	67.69	25.12
PA	165.30	5.79	0.01	28.22	0.67	12.52	6.15	15.14	16.95	5.10	59.90	15.77
AA	206.40	2.10	0.01	4.02	0.72	2.13	6.20	4.16	19.50	3.45	120.89	3.24

Capítulo 3

Diversidad, diferenciación y relaciones genéticas de los agaves mezcaleros y las poblaciones silvestres relacionadas en el occidente de México.²

ABSTRACT

Agave is asexually propagated and cultivated to produce spirits. Farmers incorporate plants from seedling of wild populations into planting stock in traditional agroecosystems, and too used wild-fomented-enhanced populations with this aims. Agave genetic diversity and evolutionary dynamic in these farming systems are poorly known. ISSR were used to estimate diversity, differentiation and genetic relationships for wild, traditionally and commercially managed *Agave*. Four levels were included in the analysis: population, traditional parcels, agricultural management and biological status. Analysis showed the wild populations to have high genetic diversity ($H_E = 0.29-0.40$) similar to the traditional landraces ($H_E = 0.20-0.35$). The commercial *A. tequilana* Weber var. azul had low diversity ($H_E = 0.08$). Wild populations had low genetic structure ($F_{ST} = 0.17$), but this increased in tolerated-encouraged ($F_{ST} = 0.33$) and cultivated populations ($F_{ST} = 0.36$). Bayesian and molecular variance (AMOVA) analyses confirmed these results. The genetic relationships analysis (UPGMA) showed *Agave angustifolia* to have a close relationship to the cultivated germplasm, suggesting that it is the main pool for selection. Selection and traditional cultivation of different *Agave* lineages have produced local pools with high genetic diversity and have been vital to *in situ* preservation of cultivated germplasm.

RESUMEN

El género *Agave* es propagado asexualmente para producir bebidas destiladas. Los campesinos incorporan plantas de poblaciones silvestres a las parcelas de cultivo tradicional y también usan

² Diversity, differentiation and genetic relationships in traditional landraces of *Agave* spirits and related wild populations in west-central Mexico. Ofelia Vargas-Ponce, Daniel Zizumbo-Villarreal, and Patricia Colunga-GarcíaMarín. Este Capítulo será sometido a New Phytologist.

poblaciones silvestres, toleradas y fomentadas de *Agave* para elaborar mezcal. La diversidad genética de los agaves mezcaleros y la dinámica evolutiva en estos agroecosistemas tradicionales es poco conocida. Por tal razón la diversidad, diferenciación y relaciones genéticas de las poblaciones silvestres y cultivadas bajo manejo tradicional y comercial, fueron estimadas utilizando marcadores Inter Simple Sequence repeats (ISSR). Se consideraron cuatro niveles de análisis: población, parcelas de cultivo tradicionales, tipo de manejo agrícola y status biológico. El análisis mostró que los cultivares tradicionales tienen niveles de diversidad genética ($H_E = 0.20-0.35$) similares, o una tercera parte menores, que las poblaciones silvestres ($H_E = 0.29-0.40$). La variedad comercial de Tequila *A. tequilana* Weber var. Azul ($H_E = 0.08$) presentó una baja diversidad. En las poblaciones silvestres se observó una baja estructuración genética ($F_{ST} = 0.17$) que se incrementó en las poblaciones toleradas ($F_{ST} = 0.33$) y cultivadas ($F_{ST} = 0.36$). Lo anterior fue corroborado con los análisis Bayesiano y de varianza molecular (AMOVA). El análisis de relaciones genéticas (Nei, 1972, UPGMA) mostró que *Agave angustifolia* tiene una relación cercana con el germoplasma cultivado sugiriendo que es el acervo principal de selección para cultivo. La selección y el cultivo tradicional de diferentes linajes han conformado acervos locales con alta diversidad genética y han sido determinantes para conservación *in situ* del germoplasma cultivado.

3.1. INTRODUCTION

The ecological and cultural conditions of traditional genetic resource management practices in Mexico have favors the continuous diversification of cultivated species and their landraces. In traditional agricultural systems it is common to find tolerated or encouraged wild populations as well as domesticated ones, which promotes active genetic flow between the wild and domesticated pools (Casas *et al.*, 1994, 1996; Montes & Eguiarte, 2002; Payró *et al.* 2005; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005; Martínez-Castillo *et al.*, 2006).

Originated and diversified in Mexico (Álvarez-Zayas, 1989), the *Agave* (Agavaceae) genus has been used by humans for at least 9000 years as food and fiber (Callen, 1965). An *Agave* species group called mezcals (from the Nahuatl *metl* = *Agave* and *ixcalli* = cooked or baked) has been used extensively in the production of fermented and distilled

beverages (Gentry, 1982). Traditional production of distilled *Agave* beverages in the region of west-central Mexico began with introduction of the coconut palm and Philippine-style still (originally direct to coconut liquor production) to the coast of Colima in the late 16th Century (Bruman, 1940; Zizumbo-Villarreal, 1996). Use of the Philippine-style still spread from the coast up the rivers and streams of the foothills of the Colima volcanoes, and was adapted to distillation of fermented *Agave* beverages (Bruman, 1940, 2000; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007; Walton, 1977). During the 17th and 18th centuries the distillation of these beverages extended into the central and northeast portions of present Jalisco state and surrounding areas (Walton, 1977) including later the adaptation of the Arab-Style still to the process. One *Agave* spirit in particular became extremely popular. Known by the name of the town where it is made, Tequila, it has become the most famous distilled *Agave* beverage in the world (Valenzuela-Zapata, 1997). *Agave* spirits production was favored by the presence of wild *Agave* populations throughout the region and the prehispanic importance of the *Agave* fermented beverages. Its spread inland from the coast was facilitated by the existence of pre-Spanish Contact commercial trade routes along the Ayuquila-Tuxcacuesco-Armería and Coahuayana-Naranjo-Tuxpan river systems. These functioned as biological and cultural corridors along which distillation, the Philippine-style still and the associated germplasm dispersed (Zizumbo-Villarreal & Colunga-GarcíaMarín, 2007).

Spirits production in central and southern Jalisco state remains an economically and culturally significant activity. In central Jalisco, tequila is made exclusively from the clone *Agave tequilana* Weber var. azul ("blue agave") grown in extensive, commercial monoculture systems. Only a very few older landraces are still grown in this region and these by just a few producers (Valenzuela-Zapata, 1997; Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). In southern Jalisco, in contrast, at least 24 *Agave* landraces are grown as part of the traditional Mesoamerican agroecosystem called *milpa*, along with maize, beans and squash, such as part of traditional agroecosystems dedicated exclusively to cultivate local *Agave* landraces, called *mezcaleras*, and which maintain elements of the original vegetation. Traditional peasant farmers also use tolerated, encouraged and wild *A. angustifolia* Haw. populations for making spirits (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-

Villarreal, 2007, Vargas *et al.*, 2007). Other species grown in this area such as *A. guadalajarana* Trel. and *A. colimana* Gentry are not used because they are not large enough and do not produce enough sugars for spirits production.

In an ethnobotanical and morphological study of mezcal agaves in this region, Vargas *et al.* (2007) found that: 1) wild *A. angustifolia* Haw. and *A. rhodacantha* Trel. populations are the primary genetic pools for selection of germplasm for cultivation, 2) the richness, diversification and *in situ* maintenance of traditional landraces is the result of continuous selection, incorporation of wild germplasm into cultivation, management of populations along a wild-domesticated gradient and conservation of ancient landraces, 3) the landraces recognized by growers are morphologically differentiated whose richness suggests that the cultivated pool is highly genetically diverse.

The domestication process commonly reduces genetic diversity in cultivated species versus their wild relatives, and leads to differentiation between the two gene pools (Hawkes, 1983; Doebley, 1992). For example, a drastic reduction in genetic variation was reported in the cultivated species *A. fourcroydes* Lem. (henequen) compared to its wild ancestor *A. angustifolia* Haw. (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1999); this is analogous to what occurred in the case of *A. tequilana* var. azul (Gil-Vega *et al.*, 2001). In both species this reduction was associated with heavy commercial pressure from selection and propagation of a single variant, for fiber production in the former and for spirits production in the latter. Isoenzymatic analysis showed wild *A. angustifolia* Haw. populations to have high genetic diversity, including those harvested traditionally by artisans in Yucatán (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1999). This is congruent for this genus, which typically has crossed reproduction and is pollinated by bats (Eguiarte *et al.*, 2000).

The boom in extensive cultivation of blue agave in the last fifty years has affected several wild *Agave* populations in Jalisco and is displacing traditional landraces in the south of the state (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). Knowledge of *Agave* population dynamics, genetic structure and genetic resource diversity in the region is vital to attaining its sustainable management. This is extremely important because south of Jalisco seems to be the center of diversity for diversity and primary germplasm selection for production of

Agave spirits in west-central Mexico (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). Based on this background, a series of hypotheses can be made for the studied area: (a) the *Agave* germplasm used for spirits production will exhibit genetic diversity along a wild-domesticated gradient; (b) wild populations will have low genetic differentiation levels and cultivated populations will be more genetically structured; and (c) cultivated germplasm will have a close genetic relationship to wild *A. angustifolia* and *A. rhodacantha* populations in the region. In response, the study objectives were: 1) to estimate diversity, differentiation and genetic relationship of wild, tolerated, encouraged and cultivated populations of agaves used in traditional and commercial spirits production, to compare its levels of variation and to analyze the importance of peasant farmers management for *in situ* *Agave* germplasm conservation in west-central Mexico. The results were analyzed in terms of traditional management by peasant farmers and its importance for *Agave* germplasm conservation.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. Collection sites, plant materials and DNA extraction

Based on previous studies (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007; Vargas *et al.*, 2007), 11 wild *Agave* populations and 25 cultivated ones were sampled in central and southern Jalisco state, in west-central Mexico (Figure 3.1). The wild pool was represented by 10 *A. angustifolia* populations (one of which was encouraged) and one tolerated *A. rhodacantha* population. The cultivated pool was represented by 17 traditional landraces from southern Jalisco; three landraces from the central Jalisco, and the commercial blue agave variety (Table 3.1). Hereafter the terms "landrace and traditionally cultivated population" refers to the unit identified by peasant farmers under a single name, and recognized by them on the basis of morphological features. The cultivated populations in southern Jalisco were collected from: (i) three parcels that correspond to traditional mezcalera agroecosystem in Zapotitlán, Canoas, and Tuxpan. In each ones different landraces are maintained. The landrace richness and traditional management dynamic of these parcels are described in Vargas *et al.* (2007); (ii) two commercial "Lineño" parcels, one in production (Tonaya) and the other abandoned (Tolimán); and (iii)

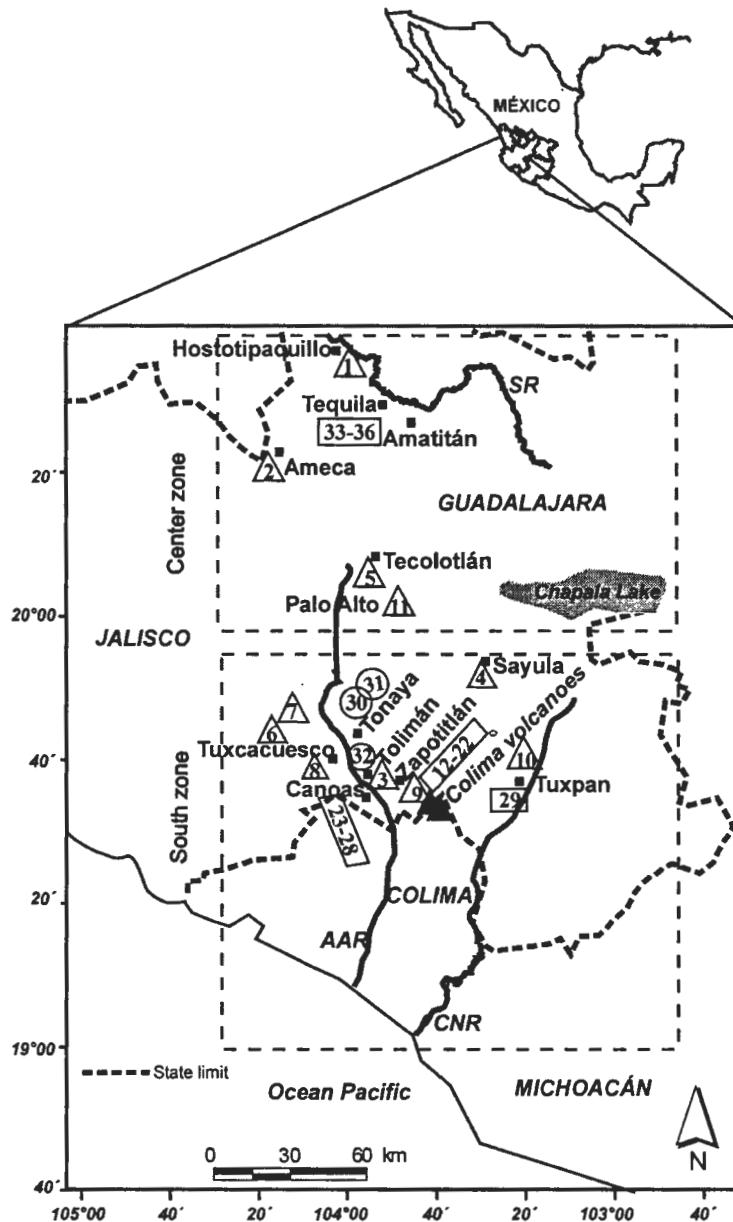


Figure 3.1 Study area: west-central Mexico. Populations of *Agave* studied in central and southern Jalisco (dash line squares), capital cities of the municipalities included (■), wild population (triangle), traditional and commercial cultivated populations (circle), traditional parcels (rectangle), Santiago River (SR), Coahuayana- Naranjo River, Armería-Ayuquila River (AAR).

populations in central Jalisco were made at: (iv) El Indio Ranch, property of the Sauza company; and (v) commercial plantations in Tequila, where samples were taken of both blue agave and other landraces now discontinued for tequila production. Overall blue agave samples were considered such as single population. For the genetic analyses two wild populations were included as outgroups: one *A. angustifolia* population from Yucatan for its geographic distance from the study area; and one *A. guadalajarana* population for its taxonomic distance to the studied cultivars (Table 3.1).

3.2.2. ISSR generation and analyses

The inter-simple sequence repeats (ISSR) markers was chosen because it takes a broad, relatively non-deviated sample of the genome which allows random, multilocus analysis and identification of multiple polymorphisms. This technique is consistent and robust in the identification of cultivars and closely related species (Godwin *et al.*, 1997; Bernet *et al.*, 2001), and for estimating genetic diversity, population structure and evolutionary processes in plants (Wolfe *et al.*, 1998; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2005, 2006). Finally, it has been established and used in *Agave* for studies of this type (Aguirre, 2004; Rocha, 2006; Eguiarte *et al.*, 2006).

Genomic DNA was extracted from an average of 18 individuals per cultivated population and an average of 25 individuals per wild population; trying to avoid samples from clones of the same plant. DNA was extracted using the CTAB method described by Doyle & Doyle (1987) as modified for *Agave* (Aguirre, 2004). A fluorometer (Dyna Quant 200, Hoefer, Biotech) was used to quantify DNA. Dilutions were prepared with 10 ng/ μ L.

Six ISSR primers synthesized by the Protein Sequencing Laboratory of the University of California-Davis were tested. The two with the best amplification and consistency, and greatest polymorphism among both landraces and wild populations were selected: (GACA)₃ RG and YR(GACA)₃. Each 25 μ L of amplification reaction consisted of: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 200 μ M of each dNTP; 1 μ M of primer; 1 unit of Taq polymerase (Promega, Madison, WI); and 40 ng of template DNA. Amplification was done with the GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) under these conditions: 4 min at 94°C for one cycle; followed by 2 min at 94°C, 1 min

at 44°C, and 2 min at 70°C for 35 cycles; and 30 min at 72°C for final extension. The amplified products were separated by electrophoresis on 6% non-denaturalizing bisacrylamide gels (30:1) containing 3 M Urea (to improve band definition) and continuous 1 X TBE buffer (Zietkiewicz *et al.*, 1994). A 100-bp molecular marker standard was included in each gel. Gels were run at 450 V constant power for 12 hours (SQ3 Sequence Hoeffler), and PCR products were visualized by silver nitrate staining (Promega Q4132 kit). Bands of similar molecular mass (i.e. weight) and migration distances across individuals were assumed to be homologous fragments. Reproducibility of the ISSR fragments was tested for each primer, and the procedure was repeated twice in a number of populations. Negative controls (without DNA template) were used consistently to detect self-amplification or DNA contamination.

3.2.3. Data analysis

Presence (1) or absence (0) of each band was recorded visually, and the results entered into a binary matrix by population. Allelic frequencies were calculated for each locus based on individuals with no band, which were considered as recessive homozygous assuming Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), where allele (q) allelic frequency was $q = X^{0.5}$ and (p) allele frequency was $p = 1 - q$.

Genetic diversity was estimated at four analytical levels: 1) wild o cultivated population; 2) traditional parcel (Zapotitlán, Canoas, and Tuxpan); 3) type of agricultural management (wild, tolerated-encouraged, traditional landrace, and commercial cultivar); and 4) biological status (wild or domesticated pool). Four estimators were used: i) percentage of polymorphic loci (pI), where $pI = x/m$, x is the number of polymorphic loci in the sample, and m the overall number of polymorphic loci under a 95% criterion. ii) expected heterozygosity (H_E), under HWE. H_E in a particular locus was calculated as $H_E = 1 - \sum p_i^2$, where p_i^2 is the homozygous genotype by allele i . Lynch & Milligan (1994) correction for dominant markers was used in which, for a locus i : $H_E = 2 q(j) [1 - q(j)] + 2 \text{Var} [q(j)]$, where $\text{Var} (q) = (1-x)/4N$, $q = X^{1/2} [1 - \text{Var} (x)/8x^2]^{-1}$ and $\text{Var}(x) = (1-x)/N$. When a number of loci were simultaneously analyzed, the formula used was: $\overline{H}_E = 1 - \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m H_j$, where H_j is the heterozygosity of locus j and m is the total number of polymorphic loci. The TFPGA

version 1.3 program (Miller, 1997) was used to calculate (pI) and (H_E). iii) Bayesian genetic diversity (H_B) was determined using the HICKORY ver. 1.0.4 program (Holsinger & Lewis, 2003). iv) Shannon's information index (I) (Lewontin 1972, POPGENE 1.31) was calculated. This index does not assume HWE but does assume that diversity estimations based on phenotypes (i.e. presence/absence of bands) approximate genetic diversity.

Distribution of genetic variation and differentiation between populations was analyzed at three levels: biological status (wild/cultivated); type of agricultural management (wild, tolerated-encouraged, traditional cultivation); and traditional parcel (Zapotitlán, Canoas, Tuxpan). Four statistical procedures were used in this analysis. First, Wright's differentiation index F_{ST} (θ) was calculated as in Weir & Cockerham (1984) using TFPGA program 1.3 under assumption of HWE ($F_{IS} = 0$) because these are diploid data/dominant markers. Variance estimators for θ were produced with Jackknife and bootstrap procedures to generate 95% confidence intervals (CI) with 5000 iterations (Weir, 1996). Second, an analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was done at the traditional parcel and biological status levels. The bands generated for each individual were directly analyzed as multilocus phenotypes (haplotypes) after identification of identical phenotypes by comparison between pairs of individuals. Distances between haplotypes were compared using Euclidean distance (Schneider *et al.*, 2000), and the variance components for different hierarchical levels, as well as the Φ_{ST} analogue to the F_{ST} statistic, were estimated with the ARLEQUIN ver 2.0 program (Excoffier, 1992). Third, the Bayesian analogue (θ^B) of F_{ST} was determined to produce independent estimations. To do this, the original binary matrix was imported into HICKORY ver. 1.0.4 program (Holsinger & Lewis, 2003) and used for the complete model, the f (the inbreeding within populations) = 0, the $\theta = 0$ and the f -free model. Several runs were done to ensure consistent results, and, to raise the confidence level to 95%, specific sample parameters were applied: burn-in = 50 000; sample = 250 000; thin = 50 (Holsinger & Wallace, 2004). The deviance information criterion (DIC, Spiegelhalter *et al.*, 2002) was used to estimate the fit between data and a particular model and to choose among models (Holsinger & Wallace, 2004). Fourth, the exact test for population differentiation of Raymond & Rousset (1995) was applied as

Table 3.1. Number, name, code, locality of origin, and genetic diversity of wild and cultivated *Agave* populations studied.

* Population ^a	Code	Locality ^b	N ^c	Lp ^d	H _E ^e	H _B ^f	I ^g
Wild							
1 <i>A. angustifolia</i>	AH	Hostotipaquillo	37	91.3	0.30	0.34	0.46
2 <i>A. angustifolia</i>	AM	Magdalena	35	88.4	0.31	0.34	0.47
3 <i>A. angustifolia</i>	AP	Perempitz	22	76.8	0.29	0.32	0.43
4 <i>A. angustifolia</i>	ASA	Sayula	25	89.8	0.32	0.34	0.48
5 <i>A. angustifolia</i>	AT	Tecolotlán	22	97.1	0.40	0.40	0.57
6 <i>A. angustifolia</i>	AW	Tuxcacuesco	15	86.9	0.31	0.34	0.47
7 <i>A. angustifolia</i>	ACT	Tuxcacuesco	16	92.7	0.35	0.37	0.51
8 <i>A. angustifolia</i>	ATX	Tuxcacuesco	36	79.7	0.31	0.31	0.45
9 <i>A. angustifolia</i>	ADB	Zapotitlán	24	82.6	0.31	0.33	0.46
			$\bar{X}$ 25	87.2	0.32	0.35	0.48
			SD	6.51	0.03	0.03	0.04
Tolerated-Enhanced							
10 <i>A. rhodacantha</i>	SVA	Tuxpan	18	89.8	0.31	0.34	0.46
11 <i>A. angustifolia</i>	APA	Palo Alto, Tec.	21	86.9	0.33	0.28	0.35
			$\bar{X}$ 19	87.04	0.32	0.35	0.48
			SD	2.05	0.01	0.04	0.08
Traditional landrace							
12 Brocha	B	Zapotitlán	20	89.8	0.35	0.33	0.50
13 Cenizo	C	Zapotitlán	23	79.7	0.33	0.32	0.47
14 Chancuella	CH	Zapotitlán	26	78.2	0.31	0.30	0.45
15 Cimarrón hoja larga	CZ	Zapotitlán	24	73.9	0.25	0.26	0.36
16 Ixtero Amarillo	IA	Zapotitlán	18	50.7	0.22	0.21	0.36
17 Ixtero verde	IV	Zapotitlán	18	76.8	0.29	0.29	0.43
18 Lineño	LZ	Zapotitlán	20	71.0	0.30	0.29	0.43
19 Prieto de Telcruz	P	Zapotitlán	9	78.2	0.32	0.31	0.44
20 Perempis	PE	Zapotitlán	14	56.5	0.23	0.23	0.33
21 Telcruz	TE	Zapotitlán	18	71.0	0.28	0.24	0.40
22 Prieto Presa Grande	Z	Zapotitlán	18	17.3	0.07	0.13	0.10

* Population number corresponds to Figure 3.1.

^a Name of wild *Agave* species or name of cultivated populations.

^b Municipalities in Jalisco where sample was collected.

^c N, Number of individuals per population.

^d Lp = percentage of polymorphic loci.

^e H_E, expected heterozygosity average per population (Lynch & Milligan, 1994).

^f H_B, Bayesian genetic diversity average per population (Holsinger & Lewis, 2003).

^g I, Shannon's diversity index (Lewontin, 1972).

Table 3.1 Continued...Number, name, code, locality of origin, and genetic diversity of wild and cultivated *Agave* populations studied.

* Population a	Code	Locality b	N c	Lp d	HE e	HB f	I g
23 Cimarrón Negro	CN	Tolimán	17	68.1	0.25	0.26	0.37
24 Hojudo	HO	Tolimán	20	71.0	0.24	0.24	0.36
25 Lineño	LSE	Tolimán	20	81.1	0.32	0.31	0.46
26 Mezcal Piña	MP	Tolimán	20	84.0	0.32	0.32	0.45
27 Soca	SO	Tolimán	20	72.4	0.29	0.27	0.41
28 Verde Rápido	VR	Tolimán	17	65.2	0.26	0.26	0.37
29 Garabato	G	Tuxpan	26	84.0	0.34	0.33	0.49
30 Azul criollo	TC	Tolimán	13	44.9	0.20	0.21	0.27
31 Lineño	LP	Tolimán	19	68.1	0.26	0.25	0.38
32 Lineño	LT	Tonaya	17	50.7	0.20	0.20	0.29
33 Bermejo	BE	Tequila-Amatitán	11	60.8	0.24	0.26	0.36
34 Chato	CHA	Tequila-Amatitán	15	79.7	0.31	0.32	0.45
35 Sigüin	SI	Tequila-Amatitán	19	89.8	0.30	0.35	0.45
			$\bar{X}$ 18	66.4	0.26	0.27	0.38
			SD	16.32	0.06	0.05	0.09
Commercial variety							
36 Agave Azul	TEQ	Tequila-Amatitán	22	20.2	0.08	0.11	0.12
Outgroups							
37 <i>A. angustifolia</i>	AY	Yucatán	27	94.0	0.32	0.34	0.48
38 <i>A. guadalupensis</i>	GU	Amatitán	26	94.0	0.30	0.33	0.46

* Population number corresponds to Figure 3.1.

^a Name of wild *Agave* species or name of cultivated populations.

^b Municipalities in Jalisco where sample was collected.

^c N, Number of individuals per population.

^d Lp = percentage of polymorphic loci.

^e H_E , expected heterozygosity average per population (Lynch & Milligan, 1994).

^f H_B , Bayesian genetic diversity average per population (Holsinger & Lewis, 2003).

^g I, Shannon's diversity index (Lewontin, 1972).

implemented in the TFGPA program (Miller, 1997), which has algorithms designed for dominant markers.

Analysis of genetic relationships was done by first structuring a binary data matrix to generate a genetic frequencies matrix (Rolf, 2004; NTSYS). The distances between each pair of populations were

calculated with the Nei (1972) genetic distance index, and then a dendrogram was built using the UPGMA method.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1. Genetic diversity

A total of 95 polymorphic bands were generated of which 69 were chosen for analysis due to their clear and constant amplification. Of these, 33 were generated with the (GACA)₃ RG primer and 36 with the YR (GACA)₃ primer; all were between 275 and 1500 bp. The Bayesian diversity estimator (H_B) had values similar to those of the H_E estimator, indicating that HWE could be assumed in the studied populations. The I values were higher (Table 3.1) versus H_E and H_B values.

The wild, tolerated and encouraged populations had high genetic diversity values (Table 3.1). This is probably because, like all wild agaves, the studied populations are long-lived with long reproductive cycles, reproduce by seed, are largely pollinated by bats (Eguiarte *et al.*, 2000), can be self-incompatible (e.g. *A. angustifolia* and other species, Molina-Frener & Eguiarte, 2003), and can also be propagated by offshoots. Their reproductive strategy favors intrapopulation genetic diversity (Molina-Frener & Eguiarte, 2003). The diversity values recorded here (H_E estimator) are higher than the reported with AFLP markers in *A. angustifolia* populations in Sonora ($H_E = 0.24 - 0.29$) (Barraza *et al.*, 2006); with RAPDS markers in *A. desertii* Engelman, *A. subsimplex* and *A. cerulata* ($H_s = 0.14 - 0.24$) (Navarro-Quezada *et al.*, 2003); or with ISSR markers in other nine wild *Agave* species ($H_E = 0.22 - 0.29$) (Aguirre, 2004; González, 2004; Rocha, 2006). They are comparable, however, to values reported with isoenzymatic markers in *A. victoria-reginae* Moore ($H_s = 0.33$) (Martínez-Palacios, 1999) and *A. lechuguilla* Torrey ($H_s = 0.39$) (Silva-Montellano & Eguiarte, 2003), and with ISSR markers in *A. cupreata* Trel. & Berger ($H_E = 0.39$) populations (Eguiarte *et al.*, 2006).

Traditional landraces had diversity almost as high as the wild populations, or about one third less, with the exception of landrace Z that show low diversity (Table 3.1, Figure 3.2). This may be a consequence of peasant farmer selection lean toward different morphotypes, continuous incorporation of wild individuals from natural populations or of cultivars from other parcels, and, in some cases, that

cultivar selection and vegetative propagation is recent. The low diversity in landrace Z resulted from it being cultivated originally from only four individuals and that recurrent clonal propagation was used to increase population size.

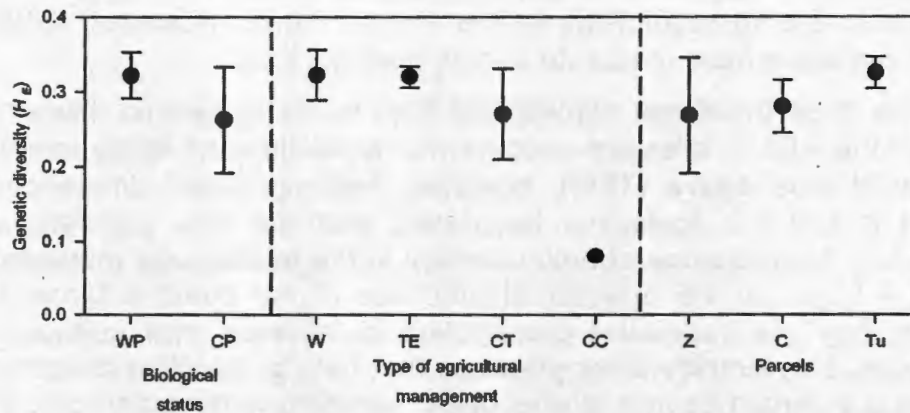


Figure 3.2. *Agave* genetic diversity estimated with ISSR markers in three levels of analysis. (1) Biological status: Wild Pool (WP), Cultivated Pool (CP). (2) Type of agricultural management: Wild (W), Tolerate-Enhanced (TE), Traditionally cultivated Landraces (CT), Commercially cultivated variety of Tequila (CC). (3) Traditional parcels: Zapotitlán (Z), Canoas (C) and Tuxpan (Tu). H_E = heterozygosity expected average per population (Lynch & Milligan, 1994) (means $\pm$ 1 SD). The same tendency was observed with the L_p , H_B , and I estimators (figures not showed).

Commercial blue agave (TEQ), in contrast, had diversity twice as low as that of the traditional landraces and three times lower than wild or tolerated *A. angustifolia* populations (Table 3.1, Figure 3.2). This confirms that *A. tequilana* var. azul has experienced a drastic reduction in genetic diversity caused by practices such as removal of the inflorescence before fertilization and seed production, promotion of a predominant genotype and vegetative propagation for over 200 years (Valenzuela-Zapata, 1997). A similar agricultural strategy led to diversity loss in *A. fourcroydes* (henequen) when immense plantations were established on the Yucatan Peninsula in the 19th and 20th centuries for

production of fiber for export. Current genetic diversity (estimated with isoenzymes) in *A. angustifolia*, henequen's wild ancestor, is $I = 3.06$, whereas in commercial *A. fourcroydes* it is $I = 0$, and other traditional varieties are now almost extinct (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996). The situation in the most important area for tequila production (Tequila-Amatitán) located in central Jalisco is analogous in that other landraces that were traditionally used to produce tequila (CHA, SI, BE) are no longer used due to restrictions in the Official Norm. However, ISSR showed that these have moderate to high diversity level.

The three traditional parcels had high levels of genetic diversity similar to the wild or tolerated-encouraged populations or lightly minor. Commercial blue agave (TEQ), however, had significant differences between it and the traditional landraces, and the wild populations (Figure 3.2). Maintenance of high diversity in the traditionally managed parcels is linked to the agricultural practices of the peasant farmers. Although they use vegetative propagation to increase their cultivated populations, they employ other practices that help to maintain diversity: 1) allowing a certain degree of phenotypic variation within landraces; 2) recurrent introduction of diverse wild and cultivated *Agave* pools from the region; 3) preservation of ancient landraces; 4) introduction of plants grown from seed. This is supported by Eguiarte (2006), who reported that *A. cupreata* propagated by seed in a nursery were as diverse as wild populations of the same species ($H_E = 0.39$). In another case, Colunga-GarcíaMarín (1996) reported that *A. fourcroydes* populations propagated vegetatively had an $I = 0$, while those from seed had an $I = 2.17$, equal to the most diverse of its wild ancestors (*A. angustifolia*). The diversity observed in the four "Lineño" populations demonstrated that management practices in traditional agroecosystems favors diversity, since the two populations grown in traditional mezcal production sites (LZ, LSE) maintained more variation than did the two grown in commercial systems (LT, LP). Similar diversity levels for managed and wild populations (at times higher in managed populations) have been reported for Cactaceae *Opuntia* spp. (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1986), *Polaskia chichipe* Riccobono and *Stenocereus stellatus* (Pfeiffer) Riccobono (Otero-Arnaiz *et al.*, 2005; Casas *et al.*, 2006). Wild populations of these cactuses are used and encouraged in their natural habitat as well as grown in parcels through vegetative propagation, and transplantation or tolerance of offspring from seeds. Their variation is

due to continuous introduction and replacement of plants in managed populations (Casas *et al.*, 2006), and to gene flow between domesticated, managed and wild populations (Otero-Amaiz *et al.*, 2005).

3.3.2 Genetic differentiation

Genetic differentiation was high at the three evaluated levels (traditional parcel, type of agricultural management and biological status). Values for the F_{ST} (θ) coefficients, AMOVA (Φ_{ST}) and θ^B were similar. Most of the values fell within the confidence interval estimated for θ (some were higher), meaning it can be assumed that the analyzed populations are in HWE (Table 3.2). Nybom & Bartish (2000) mentioned this similarity between F_{ST} , Φ_{ST} and G_{ST} values for a same data set.

Less genetic differentiation was observed among wild pool populations than among the cultivated pool populations (Table 3.2). Colunga-GarcíaMarín (1996) reported a similar situation on the Yucatan Peninsula among populations of the wild ancestor *A. angustifolia* ($F_{ST} = 0.39$) and its cultivated derivatives ($F_{ST} = 1$). The *Agave* genus has diversified rapidly; giving rise to a wide variety of moderately to highly differentiated population structures (Eguiarte *et al.*, 2000). The differentiation recorded here would be considered low, similar to that in *A. angustifolia* populations in Sonora determined with AFLPs ($F_{ST} = 0.16$, Barraza *et al.*, 2006), and in other wild *Agave* species with molecular markers such as ISSR, RAPDS and isoenzymes ($F_{ST} = 0.06 - 0.13$; Navarro-Quezada *et al.*, 2003; Silva-Montellano & Eguiarte, 2003; Aguirre, 2004; González, 2004; Rocha, 2006). Low genetic structure in some *Agave* species can be explained by their longevity and high gene flow or by combination of pollinator movements and high crossing rates that counteract the genetic drift effect (Eguiarte *et al.*, 2006).

Higher structuring has been reported using isoenzymes in *A. subsimplex* Trel. ($F_{ST} = 0.31$, Eguiarte *et al.*, 2000), *A. victoria-reginae* ($F_{ST} = 0.24$, Martínez-Palacios *et al.*, 1999) and *A. angustifolia* on the Yucatan Peninsula ($F_{ST} = 0.39$, Colunga-GarcíaMarín, 1996). In *A. victoria-reginae* this is associated with low numbers of populations, fragmentation of populations and low offspring recruitment (Martínez-Palacios *et al.*, 1999), whereas in *A. subsimplex* the high genetic structure is linked to restricted distribution and fewer pollinator (bats) visits, that diminished gene flow (Eguiarte *et al.*, 2000). Differentiation in

A. angustifolia, which is widely distributed on the Yucatan Peninsula, may correspond to its highly fragmented natural habitat causing greater genetic drift and lower gene flow.

Table 3.2. Genetic differentiation in wild and cultivated *Agave* populations estimated with ISSR markers in different levels of analysis.

Análisis level	Np/Ni	F _{ST} (θ)	IC 95%	Φ _{ST}
<i>Biological status</i>				
Wild pool	11/271	0.205	(0.238, 0.176)	0.232
Cultivated pool	25/464	0.380	(0.408, 0.355)	0.421
<i>Type of agricultural management</i>				
Wild	9/232	0.179	(0.215, 0.147)	0.213
Tolerate-enhanced	2/39	0.333	(0.408, 0.258)	0.314
Landraces	24/442	0.360	(0.388, 0.332)	0.403
<i>Parcel</i>				
Zapotitlán	11/198	0.376	(0.408, 0.343)	0.419
Canoas	6/109	0.337	(0.371, 0.301)	0.383
Tuxpan	2/43	0.222	(0.318, 0.134)	0.257

Np, number of populations; Ni, total number of individuals; F_{ST} (θ) coefficient of differentiation (Weir & Cookerman, 1984); 95% IC, confidence intervals for F_{ST}; Φ_{ST}, genetic variance (Excoffier *et al.*, 1992).

The greater genetic differentiation among the studied cultivated populations may be explained by a series of factors: heavy selection pressures by farmers; the varied origins of these; genetic drift's effect in each population (which can be high due to the small population sizes); elimination of the inflorescence in cultivated individuals (reduces the possibility of gene flow through pollen); and limited plant exchange between farmers (also limits gene flow). The high differentiation between the four analyzed "Lineño" populations ($G_{ST} = 0.32$) suggests that plant exchange and/or gene flow between them ($Nm = 1.04$, estimated from the θ value) is insufficient to prevent local differentiation. Genetic drift together with agricultural management, have contributed to structuring these cultivated populations.

Genetic differentiation among the landraces in the traditional parcels was high, particularly at Zapotitlán ($F_{ST} = 0.37$) and Canoas (F_{ST}

= 0.33). It was relatively lower at Tuxpan ($F_{ST} = 0.22$), meaning the confidence intervals (θ) were wider (Table 3.2). Structuring in the parcels was linked to the diversity of managed pools, and management practices and selection focused to maintain this diversity. Old and new landraces are conserved at both Zapotitlán and Canoas. At Zapotitlán, new landraces (<60 years old) have been taken from nearby wild populations on the slopes of the Nevado de Colima volcano. Recent landraces at Canoas have been taken from wild populations on Cerro Grande in the Sierra de Manantlán Biosphere Reserve via offset collection and establishment of offspring from seeds (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo Villarreal, 2007; Vargas *et al.*, 2007). The lower differentiation at Tuxpan may have arisen from hybridization events between the *A. angustifolia* (Garabato landrace) pool and the tolerated population related to *A. rhodacantha* (SVA) ($Nm = 3.05$ estimated from θ); hybridization between these species is feasible (Gentry, 1982, p. 582).

As agricultural management intensified, genetic structuring increased towards: traditional cultivars > tolerated populations > wild populations, such as gene flow decreased among population toward: wild > tolerated > traditional cultivars (Table 3.2). The greater differentiation in the traditional landraces is due to the heavy human selection pressures for specific uses, the elimination of or decrease in sexual reproduction, and vegetative propagation using landrace offsets of the same parcel. This farmers management practices decrease gene flow and favor cultivars genetic differentiation.

Variance component analysis at the traditional parcel level showed that the highest variation occurred within the populations in each parcel (Zapotitlán = 58%, Canoas = 61% and Tuxpan = 74%) (Table 3.3). In the cultivated pool the same tendency was observed, with 42% between population variation and 58% within population. Similarly the wild populations have 23% between population variation and 77% within population. In AMOVA all source of variation have significant differences. In the exact differentiation test (between pairs of populations) significant differences were observed between the evaluated populations due to differences in their allelic frequencies. Distribution of variation in the wild and cultivated populations confirmed that gene flow is a determinant factor in their differentiation. Wild individual's introduction into parcels and cultivated offset exchange

among parcels can diminish cultivars genetic differentiation. Introduction of g wild materials is frequent in Zapotitlán and Canoas, but cultivated offset exchange is infrequent in the three traditional parcels studied.

Table 3.3. Summary of the AMOVA analysis based on genotypic distances of *Agave* populations in different levels.

Analysis level	Source of variation	d.f.	SSD	CV	% Total	Φ_{ST}
<i>Biological status</i>						
Wild	Among populations	10	1019.9	3.6	23.2	0.23
	Within populations	260	3165.2	12.1	76.7	
Cultivated	Among populations	24	3146.3	6.5	42.5	0.42
	Within populations	439	3963.3	9.0	57.8	
<i>Parcel</i>						
Zapotitlán	Among populations	10	1315.3	6.5	41.9	0.41
	Within populations	197	1776.6	9.0	58.0	
Canoas	Among populations	5	622.0	6.0	38.3	0.38
	Within populations	108	1049.5	9.7	61.6	
Tuxpan	Among populations	1	96.9	4.0	25.7	0.25
	Within populations	42	485.2	11.5	74.2	

Df, degrees of freedom; SSD, sum of squares; CV, variance-component estimates; % Total, percentage of total variance contributed by each component; Φ_{ST} , genetic variance (Excoffier *et al.*, 1992).

Moreover, farmer selection pressures on a particular set of morphological traits and vegetative propagation keep landrace identity, and contribute for maintaining genetic differentiation.

The Bayesian approximation showed that the free model had the best fit to the data (Table 3.4). At the three analyzed levels this model produced differentiation values similar to those generated by the AMOVA and classic statistic estimators. This indicated consistency in results (Tables 3 and 4) and confirmed that this model is appropriate when no endogamy coefficient data are available (Holsinger & Lewis,

2003). Similar results have been reported for *Spondias purpurea* L. a species vegetatively propagated (Miller & Schaal, 2005), and for wild and managed *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti populations (Renau-Morata *et al.*, 2005).

Table 3.4 Genetic structure of *Agave* populations estimated with Bayesian approximation in three different analysis levels and the $f = 0$ model.

Analysis level	Np / Ni	θ^B	95% IC	DIC
<i>Biological status</i>				
Wild pool	11/271	0.21	(0.180, 0.247)	3741.60
Cultivated pool	25/464	0.42	(0.379, 0.450)	6695.06
<i>Type of agricultural management</i>				
Wild	9/232	0.19	(0.155, 0.222)	3153.19
Tolerate-enhanced	2/39	0.27	(0.213, 0.349)	574.07
Landraces	24/442	0.33	(0.314, 0.350)	6407.15
<i>Parcel</i>				
Zapotitlán	11/198	0.39	(0.352, 0.436)	2937.06
Canoas	6/109	0.35	(0.304, 0.397)	1700.07
Tuxpan	2/43	0.21	(0.158, 0.270)	648.29

Np, number of populations; Ni, total number of individuals; θ^B , estimator Bayesian of differentiation analogue to F_{ST} (Holsinger & Lewis, 2003); 95% IC, confidence intervals for θ^B ; DIC, deviance information criterion, analogue to Akaike information criterion.

3.3.3. Genetic relationships

Agave guadalajara had the greatest genetic distance from the other populations and formed a single base clade (G) (Figure 3.3). Cultivar VR, identified as *A. rhodacantha*, also formed an independent clade (F). In contrast, a tolerated population (SVA) and a landrace (IA) identified also as *A. rhodacantha*, did not form part of clade F, but were interspersed among the large *A. angustifolia* complex that was clade E. Genetic similarity between some *A. angustifolia* and *A. rhodacantha*

populations has been observed with AFLP markers (Hernández, 2001), suggesting the presence of genetic infiltration between these species (Gentry 1982, p. 582). Four groups were identified within clade E. The majority of the wild *A. angustifolia* populations were grouped in clade A by the region where grown, which is consistent with their F_{ST} values. The population from Yucatan (AY) was included in this clade, which coincides with Gentry's (1982) observation that this species is a biological complex that varies along a geographic gradient with no drastic differentiation between populations. This population was closely associated with those from central Jalisco (AM, AH). Subclade A1 consisted of most of the landraces from southern Jalisco together with wild populations from the same region. None of these landraces exhibited any relationship to the wild populations from central Jalisco (AM, AH). The short distances between some landraces and wild populations in this clade is congruent with ethnobotanical data indicating their recent incorporation into cultivation systems from local natural populations. The other cultivated populations in southern Jalisco, grouped into subclade A2, have greater differentiation with the wild populations, suggesting that the selection process has produced greater differentiation in this group than in the cultivated populations in subclade A1.

Clade B contained two landraces under traditional management (Z, PE) and one commercial TC (*A. tequilana* grown in Tonaya and considered a local landrace by farmers). The greater genetic distance between this clade and wild populations versus the landraces in clade A may be explained by an even more intense selection process. Clade C consisted of the commercial tequila variety (TEQ), two "Lineño" populations (LP, LT) grown in commercial mezcal production sites as a monoculture, one cultivated population under traditional management (HO) and one wild *A. angustifolia* population (ATX). The associations within this clade suggest that TEQ was selected from the wild *A. angustifolia* pool, as mentioned by Gentry (1982), but not from the Tecolotlán populations as he pointed out but probably from populations near Tuxcacuesco. Another two "Lineño" populations (LZ, LSE) cultivated under traditional management were associated with *A. angustifolia* from Tecolotlán (AT, APA). This coincides with Vargas *et al.* (2007) in that it indicates that this landrace has been selected from different *A. angustifolia* lineages.

Clade D contained the Chato, Sigüin and Bermejo (CHA, SI, BE) landraces, all managed traditionally to produce tequila. The genetic relationship between them was closer than with blue agave (TEQ), meaning they are differentiated lineages. This partially agrees with the data of Gil-Vega *et al.* (2006) and Bousios *et al.* (2007), who reported that the Chato and Bermejo landraces are distant lineages of blue agave whereas Sigüin is more closely related. The differences between these studies and the present results are likely due to the larger sample of the pool used here. Gil-Vega *et al.* (2006) and Bousios *et al.* (2007) included only one or a few blue agave samples, a few tequila landraces and just

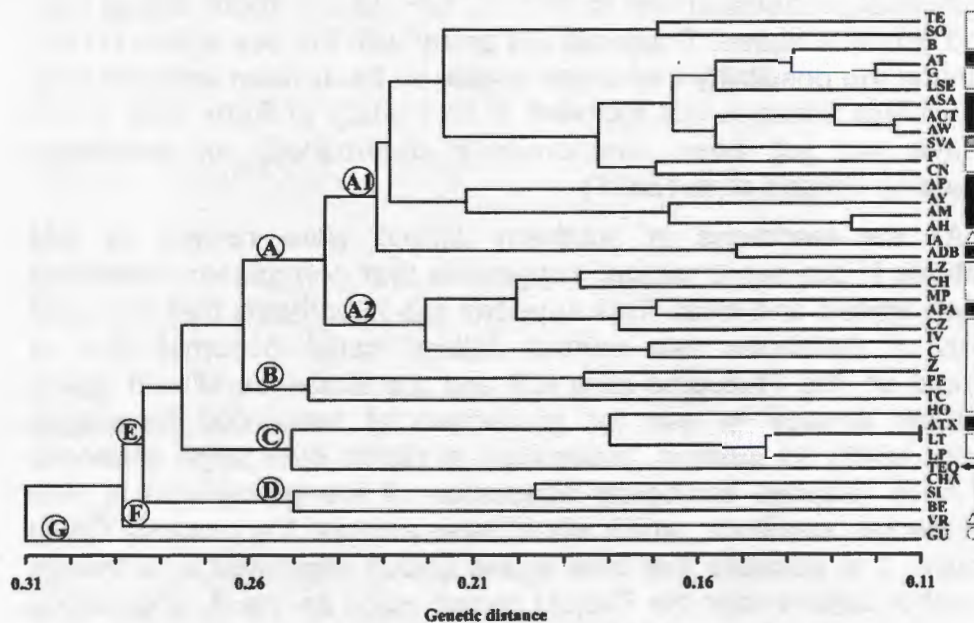


Figure 3.3 Genetic relationships of wild and cultivated *Agave* population inferred from ISSR markers using Nei's genetic distance (1972). Wild *Agave angustifolia* populations (black rectangle), landraces taxonomically related to this species (white rectangle), tolerate *A. rhodacantha* population (gray rectangle) and landrace taxonomically related to this species (triangle), commercial variety of tequila (arrow), other landraces used for tequila production (key) and *A. guadalupensis* population (circle). Code represented name of wild and cultivated populations and correspond with Table 3.1.

one *A. angustifolia*, as well as genetically distant *Agave* species and other genera. The present analysis, in contrast, included a wide sample of the wild *A. angustifolia* pool together with traditional landraces used to produce distilled beverages, providing a much broader scale view of genetic relationships between these landraces and their putative selection populations. The greater genetic distance between the Chato and Bermejo landraces and blue agave coincided with their greater morphological differentiation, but Sigüin is morphologically quite similar to blue agave.

A similar tendency was observed between the wild *A. angustifolia* populations (AM, AP) and traditional landraces with size and morphological features similar to (PE, C, MP, SI), or more robust than (TE and S0) blue agave. These did not group with the blue agave (TEQ), highlighting the possibility that some landraces have been selected from *A. angustifolia* lineages not included in this study or from other pools that have not yet been taxonomically determined, as previously discussed by Vargas *et al.* (2007).

All the landraces in southern Jalisco were related to wild populations in the same region, suggesting that germplasm movement has been limited and local. This supports the hypothesis that the rapid diffusion of distillation into central Jalisco could have occurred due to movement of the Philippine-style still and the existence of wild agave populations already in use for production of fermented beverages (Bruman, 1940). In addition, movement of plants over large distances would have required ecological adaptation of the germplasm to new environmental conditions, which would have delayed the process. Given the above, it is possible that blue agave (TEQ) originated in a lineage from central Jalisco near the Tequila region, such as the *A. angustifolia* populations in Magdalena (AM) where wild phenotypes similar to the commercial variety have been observed.

3.4. CONCLUSIONS

1) Traditional cultivars used in spirits production in west-central Mexico have high intrapopulational genetic diversity that is similar to wild *A. angustifolia* and *A. rhodacantha* populations. The commercial blue agave variety, in contrast, has diversity three times lower than in wild populations. 2) Traditional management of *Agave* landraces in traditional mezcal agroecosystems favors high genetic diversity,

whereas commercial management leads to decreased diversity. 3) Traditional management practices also maintain differentiation between landraces and the wild pool, which has a low level of structuring. 4) *Agave angustifolia* is the main pool for selection of germplasm for cultivation in the study area and therefore has a close genetic relationship to the cultivated germplasm. 5) *Agave rhodacantha*, and other as yet undetermined species, have also been used for selection, although sampling and analysis of more populations is required to confirm this. Traditionally managed parcels in the study area function as reservoirs that maintain the high richness of genetically diverse *Agave* landraces that have been selected for their productive, morphophenological, agronomic and organoleptic characteristics. This reservoir can be used to diversify traditional and commercial *Agave* spirits production in a sustainable way.

ACKNOWLEDGMENTS

This research forms part of O.V.P.'s Ph.D. dissertation and was conducted under the direction of Patricia Colunga-GarcíaMarín with Daniel Zizumbo-Villarreal as academic adviser; both are at the Laboratory of Plant Genetic Resources Diversity and Molecular Evolution, Department of Natural Resources-CICY. The authors thank Adrián Galván, Francisco Santana Michel, Roberto Nieto and Jesús Rosales for fieldwork assistance and Julián Coello Coello, Jaime Martínez, Filogonio May-Pat and Mayabel Guisazola for labwork assistance. The authors' thanks and admiration are also due the traditional mezcal producers of southern Jalisco, particularly Macario and Apolinar Partida, and Federico and Santos Juárez, for their willingness to share their knowledge and their courage to preserve their genetic resources. Special thanks to Gilberto Acosta for the study area image. The SINAREFI-SAGARPA (P-007) and CONABIO (P-CS007) provided partial financial support of this research and the PROMEP granted a Ph.D. scholarship to O.V.P.

LITERATURE CITED

- Aguirre D., X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *A. potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 73 pp.

- Álvarez de Zayas, A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, Universidad de la Habana Cuba 10:25-35.
- Barraza M. A., F. L. Sánchez Teyer, M. Robert, M. Esqueda y A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29:1-8.
- Barnaud, A. M. D., E. Garine. D. McKey and H. I. Joly. 2007. Local genetic diversity of *Sorghum* in a village in northern Cameroon: structure and dynamics of landraces. *Theoretical Applied Genet* 114:237-248.
- Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and specific tools for genome finger printing. *Plant Molecular Biological Reporter* 19:209-215.
- Bousios A., I. Saldana-Oyarzabal, A. Valenzuela-Zapata, C. Word and S R. Pearce. 2007. Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science* 172:291-298.
- Bruman, H. J. 1940. Aboriginal Drink Areas of New Spain. Tesis Doctoral, Universidad de California, Berkeley. 243 pp.
- Bruman, H. J. 2000 Alcohol in Ancient México. University of Utah Press, Salt Lake. 158 pp.
- Callen, E. O. 1965. Food habits of some Pre-Columbian Mexican Indians. *Economic Botany* 19:335-343.
- Casas, A., J.L.Viveros, y J. Caballero. 1994. Etnobotánica mixteca: sociedad, cultura y recursos naturales en la montaña de Guerrero. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes / Instituto Nacional Indigenista.
- Casas, A., M. Vázquez, J.L.Viveros and J. Caballero. 1996. Plant management among the Nahuatl and the Mixtec in the Balsas River Basin, Mexico: an Ethnobotanical Approach to the Study of Plant Domestication. *Human Ecology* 24:455-478.

- Casas, A., J. J. Cruse-Sanders, E. Morales, A. Otero-Arnaiz and A. Valiente-Banuet. 2006. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity in managed populations of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in Central Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15:879-898.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 1996. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis de doctorado, Instituto de Ecología-UACPyP/CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Hernández-Xolocotzi y A. Castillo-Morales. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola y grados de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. *Agrociencia* 65:7-49.
- Colunga-GarcíaMarín, P., J. Coello-Coello, L. Eguiarte and D. Piñero. 1999. Isoenzymatic variation and phylogenetics relations between henequén *Agave fourcroydes* Lem. and its wild ancestor *A. angustifolia* Haw. *American Journal of Botany* 86:115-123.
- Colunga-GarcíaMarín, P., and D. Zizumbo-Villarreal. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16:1653-1667.
- Doyle, J., and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Doebley, J. 1992. Molecular systematics and crop evolution. En: P. S. Soltis, D. E. Soltis, and J. J. Doyle (eds). *Molecular Systematics of plants*, 202-222. Chapman and Hall, New York, NY.
- Eguiarte Fruns, L. E., González González, A. y E. Sheinvar Gottdiener, 2006. Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No.CS016. México.
www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfCS016.pdf. Fecha de consulta 18 de mayo, 2007.

- Eguiarte, L. E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:131-150.
- Excoffier L., P.E. Smouse and J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:179-191.
- Gentry, S. H. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 679 pp.
- Gil Vega, K., M. González Chavira, O. Martínez de la Vega, J. Simpson and G. Vyermark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.
- Gil Vega, K., C. Díaz, A. Nava-Cedillo and J. Simpson. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170: 904-909.
- Godwin, I. D., E. A. B. Aitken and L. W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528.
- González, A. 2004. Biología reproductiva y genética de poblaciones del *Agave garciae-mendozae*. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/arts/
- Hawkes, J.G. 1983. *The diversity of Crop Plants*. Harvard University Press, Cambridge. 183 pp.
- Holsinger, K. E., and P. Lewis. 2003. HICKORY: a package for analysis of population genetic data V1.0. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA.
<http://www.eeb.uconn.edu./hickory/hickory.html>
- Holsinger, K. E. and L. Wallace. 2004. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: and example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 13:887-894.

- Lynch, M. and B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPDs markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- Martínez-Castillo, J., D. Zizumbo-Villarreal, P. Gepts, P. Delgado-Valerio and P. Colunga-GarcíaMarín. 2006. Structure and genetic diversity of wild Populations of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Crop Science* 46:1071-1080.
- Martínez-Palacios, A., L. E. Eguiarte, and G. R. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* 86:1093-1098.
- Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme y molecular population genetic data. Computer Software distributed by the author.
- Miller, A. J. and B. A. Schaal. 2006. Domestication and the distribution of genetic variation in wild and cultivated populations of the Mesoamerican fruit tree *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology* 15:1467-1480.
- Min Chung, J., B. Cheun Lee, J. Seok Kim, Chong-Wook Park, M. Yoon Chung and M. Gi Chung. 2006. Fine-scale genetic structure among genetic individuals of the clone-forming monotypic Genus *Echinosophora koreensis* (Fabaceae). *Annals of Botany* 98:165-173.
- Molina-Freaner, F. and L. E. Eguiarte. 2003. The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: Contrasting roles of bats as pollinators. *American Journal of Botany* 90:1016-1024.
- Navarro, A., R. González, F. Molina-Freaner and 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: 283-292.

- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13:1143-1155.
- Otero-Arnaiz A., A. Casas, J. L. Hamrick and J. Cruse-Sanders. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Molecular Ecology* 14:1603-1611.
- Raymond, M. L., and F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Renau-Morata, B., S, J, Nebauer, E. Sales, J. Allainguillaume, P. Caligari and J. segura. 2005. Genetic Diversity and structure of natural and manager populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. *American Journal of Botany* 92:873-884.
- Rolf, F. K. (1993). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analyses system. Versión 2.02i. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Rocha Munive, M. G. 2006. Genética evolutiva comparada en cinco especies de *Agave*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. 164 pp.
- SAS. 1997. SAS/STAT user's guide, release 6.122 ed. SAS Insitute Inc., Carry NC.
- Schneider S., Roessli D., and Excoffier L., 2000. Arlequin ver. 2.0. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Silva-Montellano, A. and L. E. Eguiarte. 2003. 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.
- Spiegelhalter D.J., N.G., Best, B.P. Carlin and A. van der Linde. 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society B* 64: 583-639.

- Valenzuela Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Cultivo e Industria. 2da. Ed. Monsanto y editorial Litteris. Guadalajara, Jalisco. 204 pp.
- Vargas-Ponce, O., D. Zizumbo-Villarreal and Patricia Colunga-GarcíaMarín. 2007. *In situ* Diversity and maintenance of traditional Agave landraces used in spirits production in West-Central México. *Economic Botany* 61 (3):XX-XX (In press).
- Walton, M. K. 1977. The evolution y localization of mezcal y tequila in Mexico. *Geográfica* 85:113-132.
- Weir, S., 1996. *Genetic Data Analysis II*. USA, Sinauer Associates, Suderland, Mass.
- Weir, S. and C. Cockerham, 1984. Estimating *F*- Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Wolfe, A. D., Q. Xiang and S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Schrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR). *Molecular Ecology* 7:1107-1125.
- Zietkiewicz, E. A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-181.
- Zizumbo-Villarreal, D. 1996. History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mexico: 1539-1810. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43:505-515.
- Zizumbo-Villarreal, D., P. Colunga-GarcíaMarín, E. Payró de la Cruz, P. Delgado-Valerio and P. Gepts 2005. Population structure y evolutionary dynamics of wild-weedy-domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican Region. *Crop Science* 45:1073-1083
- Zizumbo-Villarreal, D., M. Ruiz-Rodriguez, H. Harries, and P. Colunga-GarcíaMarín. 2006. Population Genetics, Lethal Yellowing Disease, and Relationships among Mexican and Imported Coconut Ecotypes. *Crop Science* 46:2509-2516.
- Zizumbo-Villarreal, D. and P. Colunga-GarcíaMarín. 2007. Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-

central Mexico. Genetic Resources and Crop evolution. DOI
10.1007/s10722-007-9255-0.

Capítulo 4

Origen y relación genética de *Agave tequilana* Weber con poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* Haw. del centro-occidente de México inferidos con marcadores ISSR.³

RESUMEN

Una acción dentro de las posibles estrategias para establecer un cultivo sustentable de tequila es ampliar la base genética de *Agave tequilana* Weber var azul. La domesticación ha conducido a una baja diversidad genética en el agave azul, a una reducción drástica de los cultivares usados tradicionalmente para elaborar Tequila y problemas fitosanitarios. Para ello se requiere en primer lugar conocer el acervo genético cultivado relacionado con él y localizar el acervo silvestre a partir del cual pudo ser domesticado. En este sentido, se ha señalado que del acervo silvestre de *Agave angustifolia* Haw. en Jalisco pudo seleccionarse para cultivo el Tequila. Dado estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) estimar las relaciones genéticas de *A. tequilana* var. azul y los cultivares Sigüin y Bermejo con el acervo silvestre de *A. angustifolia* del centro y sur de Jalisco utilizando marcadores moleculares ISSR; 2) identificar las poblaciones putativas de las cuales pudo haber sido seleccionado el agave azul y acervos genéticos relacionados. Los resultados son discutidos tanto en el contexto de su importancia para la conservación del germoplasma disponible, así como para su mejoramiento genético. Las relaciones genéticas de ocho poblaciones de *A. angustifolia*, una muestra representativa de agave azul y una población del cultivar Sigüin y otra del Bermejo fueron inferidas con base en 69 loci Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) mediante análisis de agrupamiento basados en similitud genética y un método bayesiano de asignación de individuos.

³ Origin and genetic relationship of Tequila and wild *Agave angustifolia* Haw. populations of west-central México inferred with ISSR markers. Ofelia Vargas-Ponce, Daniel Zizumbo-Villarreal, and Patricia Colunga-GarcíaMarín. Este capítulo será sometido a publicación a American Journal of Botany.

La evidencia conjunta mostró que *A. angustifolia* tiene una relación cercana con el germoplasma cultivado para Tequila. Una población de Ameca resultó el linaje más relacionado con el agave azul y con el Sigüin. Sin embargo, el acervo genético cultivado en el Valle de Tequila corresponde al acervo genético de la ruta natural demarcada por el corredor biológico de las cuencas de los ríos Armería-Ayuquila, Ameca y Santiago-Bolaños, a través de los cuales ha podido ocurrir movimiento de genes por la distribución continua de poblaciones de *Agave* y el movimiento de los polinizadores. No fue posible clarificar si el cultivar BE ha sido derivado del acervo de *A. angustifolia*. Los resultados son discutidos tanto en el contexto de su importancia para la conservación del germoplasma disponible, como para su mejoramiento genético.

4.1. INTRODUCCIÓN

La producción de Tequila, una bebida destilada de *Agave*, por denominación de origen está circunscrita a algunos estados del centro-occidente de México y a una pequeña región del noroeste. El estado de Jalisco es reconocido como la cuna del Tequila y es una de las zonas más productivas (Valenzuela-Zapata, 1997). La mayor producción se realiza en dos regiones: a) Centro, también llamada Valle de Tequila, con la mayor antigüedad de producción donde las plantaciones comerciales se establecieron en 1795 (Luna-Zamora, 1991; Valenzuela-Zapata, 1997), representada principalmente por los municipios de Tequila, Amatitán, Arenal, Hostotipaquillo y Magdalena y b) “Altos de Jalisco”, representada por los municipios de Tepatitlán, Arandas, Atotonilco, entre otros, constituida a finales del siglo XVIII. Sin embargo, debido a su demanda y rentabilidad, el cultivo se ha extendido a todo el estado, involucrando a múltiples productores.

La NOM del Tequila señala a *Agave tequilana* Weber var. azul (llamado comúnmente “agave azul”) como la variedad exclusiva para la manufactura del Tequila. El proceso de domesticación y la restricción de la NOM ha conducido a una baja diversidad genética en esta variedad (Gil-Vega *et al.*, 2001, 2006; Cuadro 3.1 de esta tesis). De manera paralela, ha ocasionado el decremento de las poblaciones y/o la desaparición de otros cultivares que se usaban tradicionalmente en Valle de Tequila para producir esta bebida. En el siglo XIX, Pérez (1887) reportó nueve cultivares: Azul, Bermejo, Sigüin, Moraleño, Chato, Pie de Mula, Mano larga, Zopilote y Mezcal chino, señalando

que correspondían a diferentes tipos de *Agave*. Weber (1902) asignó el nombre de *A. tequilana* al cultivar predominante, el agave azul. Por su parte, Trelease (1920) describió a cinco de estos cultivares como especies, las que a su vez fueron tratadas como sinónimos de *A. tequilana* por Gentry (1982) por considerarlas formas de esta especie. Valenzuela-Zapata (1997) reportó la desaparición de dos de los cultivares señalados por Pérez (Zopilote, Mezcal chino), la existencia de pocos individuos de los otros (usando el término variedad para referirse a los cultivares) y mencionó el nombre de una nueva variante "Listado azul". Estudios recientes reportan con escasos individuos sólo cinco de los cultivares de *A. tequilana* en el Valle de Tequila (Azul, Bermejo, Sigüin, Chato, Listado azul), así como la ausencia de Moraleño y Pata de mula (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal, 2007).

La baja diversidad del agave azul ha sido atribuida a tres factores principales: a) el cultivo extensivo vía propagación vegetativa, utilizando hijuelos de las mismas plantaciones comerciales; b) la eliminación de la inflorescencia que evita el entrecruzamiento y la reproducción por semilla, y con ello la generación de variabilidad genética; c) el prolongado periodo en que se han estado realizando estas prácticas. La homogeneidad y la reducida base genética han determinado una alta susceptibilidad del agave azul a plagas y enfermedades (Dalton, 2005), causando grandes pérdidas a la industria del Tequila y a los campesinos que lo cultivan. Para remediar esta problemática, la industria se ha enfocado mayormente a la búsqueda de variación somaclonal bajo cultivo *in vitro* y, de manera colateral, al combate de las causas y vectores de plagas y enfermedades. Sin embargo, una de las posibles acciones para establecer estrategias de cultivo sustentable del agave azul y aliviar los problemas fitosanitarios es ampliar la base genética del cultivo, para lo cual se requiere conocer el acervo genético cultivado relacionado con él y localizar el acervo silvestre a partir del cuál pudo ser domesticado.

A pesar de la importancia económica del tequila, la antigüedad de su producción y la problemática relacionada con su sustentabilidad, existen pocos trabajos enfocados a definir el acervo genético del cultivo, así como las relaciones evolutivas entre sus cultivares, y con las poblaciones silvestres a partir de las cuales se pudieron haber originado. Recientemente, Gil-Vega *et al.* (2006) y Bousios *et al.* (2007) utilizando marcadores AFLP y retrotransposones, respectivamente,

reportaron una alta relación genética entre los cultivares Azul, Listado Azul y Sigüin, y una mayor distancia genética de los cultivares Chato y Bermejo, sugiriendo que éstos podrían corresponder a especies diferentes de *A. tequilana* Weber. En el caso del cultivar Moraleño, los análisis basados en AFLPs resultaron contradictorios con los obtenidos con retrotransposones, ya que con los primeros resultó cercano a la variedad Azul y con los segundos no. En estos estudios y en el de Cuevas (2001) en el que incluyó muestras de *A. angustifolia* Haw. y otras especies utilizadas para la obtención de fibras y bebidas, no se discute el origen biológico de *A. tequilana*, aunque en éstos (y en el material incluido en sus análisis) subyace la observación de Gentry (1982) de que *A. tequilana* forma parte del acervo genético de *A. angustifolia*.

Agave angustifolia es una especie con entrecruzamiento libre que presenta variación morfológica a lo largo de su gradiente de distribución geográfica, distribuyéndose desde Sonora y Tamaulipas en México hasta Costa Rica (Gentry, 1982). De su acervo se han seleccionado diferentes cultivares para la obtención de fibras (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1998) y bebidas destiladas como el bacanora y el espadín, con los que se elaboran los mezcales de Sonora y Oaxaca respectivamente (Gentry, 1982; Colunga-GarcíaMarín, 2003). Gentry (1982) considera a *A. tequilana* como un clon derivado de poblaciones de *A. angustifolia* de Jalisco, señalando que las diferencias entre éstas “son de grado más que de un contraste distintivo”. Gentry considera entonces que “la separación de *A. tequilana* como especie es nominal”, aunque señala la conveniencia de mantener el nombre por su importancia para la industria del Tequila: “Ciertamente, el intercambio comercial con esta importante planta podría ser beneficiado por el mantenimiento de un simple binomio [(*A. tequilana*)]”. Si bien es conveniente mantener el nombre de *A. tequilana* por razones económicas, la identificación de los acervos genéticos de *A. angustifolia* más cercanos al agave azul es prioritaria, por su significado para la conservación y uso del germoplasma.

En Jalisco, *A. angustifolia* está ampliamente distribuida y habita mayormente en el bosque tropical caducifolio (BTC), desde los 300 msnm en la costa hasta los 1550 msnm tierra adentro. También se encuentra en bosque de encino en ecotonía con el bosque tropical en altitudes cercanas a 1700 msnm, y con menor frecuencia en el matorral

xerófilo (Hernández, 2003; Vargas *et al.*, 2007). Las poblaciones de *A. angustifolia* exhiben un gradiente de variación morfológica que se corresponde con la altitud y el tipo de vegetación, pudiéndose distinguir tres morfotipos: i) bosque tropical caducifolio (<500 msnm) y matorral xerófilo, plantas pequeñas de 1 m de alto, con hojas flácidas y angostas (< 0.8 m de largo x 5 cm de ancho) de color verde claro a oscuro; ii) bosque tropical caducifolio (700-1500 msnm) plantas de talla mediana a grande de 1-2 m alto, con hojas más largas y un poco más anchas (0.9-1.5 m de largo x 8-10 cm. de ancho), rígidas y erectas de color verde-amarillento, verde oscuro o azul-verde cenizo (glaucas); iii) bosque de encino en ecotonía con el bosque tropical caducifolio (1200-1800 msnm) plantas de talla similar a las del bosque tropical caducifolio por arriba de los 700 m de altitud, hojas flexuosas a erectas, variando en color de verde a azul-verde cenizo. *Agave angustifolia* es utilizada para la elaboración de bebidas tradicionales destiladas como la “raicilla de la costa” en el suroeste del estado y el “tusca”, “mezcal de Tonaya”, “mezcal de Canoas”, “mezcal de Zapotitlán” y “mezcal de Tuxpan o Garabato” en los municipios de Tuxcacuesco, Tonaya, Tuxpan, Tolimán y Zapotitlán en el sur (Valencia y Cházaro, 2004; Vargas *et al.*, 2007).

Tomando en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se consideró importante estimar las relaciones genéticas entre el agave azul y los cultivares Sigüin y Bermejo y cotejar si proceden de los mismos acervos genéticos (el de *A. angustifolia*). En este trabajo también se plantea que: 1) el agave azul y el siguin son genéticamente cercanos a *A. angustifolia*; 2) el cultivar Bermejo es mas distante, partiendo de los rasgos morfológicos que exhibe y su mayor diferenciación morfológica. El cultivar Chato, introducido de Michoacán al Valle de Tequila, pertenece a un acervo independiente de *A. angustifolia* por lo que fue excluido de este estudio. Para la comprobación de estos supuestos es necesario estimar las relaciones genéticas de estos acervos cultivados con el acervo de *A. angustifolia* de Jalisco, y de manera paralela, cotejar las siguientes hipótesis planteadas acerca del origen o procedencia de *A. tequilana* de poblaciones silvestres de *A. angustifolia*:

1) Gentry (1982) al no localizar poblaciones silvestres de *A. tequilana* en el Valle de Tequila, planteó dos opciones: a) las poblaciones silvestres de *A. tequilana* que dieron origen al cultivo ya no existen (desaparecieron) o b) las poblaciones cultivadas pudieron

proceder de poblaciones silvestres de *A. angustifolia* Haw. localizadas hacia el sur, en sitios transicionales del bosque de encino y el bosque tropical caducifolio, cercanos a Tecolotlán, Jalisco. Esta hipótesis la planteó con base en la poca distinción morfológica que observó entre *A. tequilana* y *A. angustifolia*, y en la alta similitud del agave azul con las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* creciendo cerca de Tecolotlán: “plantas cercanamente relacionadas a *Agave tequilana* crecen silvestres en las laderas semi-áridas del oeste y sur de Tequila, así como a lo largo de la carretera Cocula-Tecolotlán, Jalisco. En el encinar hay una población grande, variable y algunos de ellos se parecen cercanamente a formas cultivadas de *A. tequilana*. Uno podría suponer que los cultivadores de Tequila hicieron su selección para plantaciones del acervo de estas poblaciones silvestres” (Gentry, 1982, pp. 583-584).

2) Walton (1977) planteó que las plantas cultivadas en el Valle de Tequila pudieron ser introducidas del sur de Jalisco, de la comunidad de Tuxpan (800-900 msnm) dado que de allí procedían los primeros productores establecidos en Tequila en el siglo XVIII.

3) Luna-Zamora (1991), siguiendo a Muriá (1975) planteó que durante el siglo XVII la producción de mezcal en el área de Tequila se obtenía de plantas silvestres procedentes de las Barrancas del Río Grande o Santiago (800 msnm), donde predomina el bosque tropical caducifolio. Con plantas de esas poblaciones pudieron establecerse las plantaciones en el Valle de Tequila.

4) Del trabajo de Zizumbo-Villarreal y Colunga-GarcíaMarín (2007) se derivan dos hipótesis alternas: a) el cultivo en el Valle de Tequila se estableció con plantas procedentes del sur de Jalisco (Zapotitlán-Tuxcacuesco, 750-850 msnm) que fueron difundidas junto con el destilador asiático ríos arriba o b) el destilador se difundió ríos arriba y se adaptó al gemoplasma local, estableciéndose los cultivos con plantas de sitios con la misma altitud (1100-1500 msnm).

En este estudio coincidimos con esta última hipótesis, debido a que la introducción de plantas de *Agave* del sur, procedentes de tierras bajas, debió involucrar un período largo de adaptación de las plantas a las condiciones altas del Valle de Tequila y porque existen evidencias de que la difusión de la destilación desde Colima hasta la sierra de Nayarit pudo darse en menos de veinte años, entre 1603, cuando iniciaron las prohibiciones sobre la elaboración del licor de coco en

Colima (Sevilla del Río, 1977), y 1619 cuando se reporta la elaboración y consumo de mezcal en la Sierra de Nayarit (Arregui, 1619). Esta rápida difusión fue favorecida por la presencia de poblaciones de *A. angustifolia* a lo largo de los lechos de los ríos, en las barrancas y en las condiciones similares a los valles altos, así como por la prevalencia de una tradición cultural arraigada de elaboración de bebidas fermentadas de *Agave* en toda la región del occidente de México.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) estimar las relaciones genéticas de *A. tequilana* var. azul y los cultivares Sigüin y Bermejo con el acervo silvestre de *A. angustifolia* del centro y sur de Jalisco utilizando marcadores moleculares ISSR; 2) identificar las poblaciones putativas de las cuales pudo haber sido seleccionado el agave azul y acervos genéticos relacionados. Los resultados son discutidos tanto en el contexto de su importancia para la conservación del germoplasma disponible, así como para su mejoramiento genético.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Sitios de colecta y material vegetal

Con base en estudios previos (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal, 2007; Vargas *et al.*, 2007) se seleccionaron ocho poblaciones silvestres de *A. angustifolia* abarcando el centro y sur de Jalisco, en el centro-occidente de México (Figura 4.1). Estas representan a los municipios de Tuxpan, Zapotilán y Tuxcacuesco con antecedentes en la elaboración actual y antigua de bebidas tradicionales destiladas de *Agave* en el sur y a Sayula, un municipio adyacente donde se encuentran grandes poblaciones de esta especie. Las poblaciones silvestres de la región central fueron obtenidas en el municipio de Hostotipaquillo y Ameca, aledaños al municipio de Tequila. Además, se incluyeron dos poblaciones del municipio de Tecolotlán, la primera obtenida en Palo Alto y la otra en la localidad de donde ha sido reportada una población de *A. angustifolia* que muestra estrecha similitud morfológica con el agave azul (Gentry, 1982). Tecolotlán se encuentra equidistante con el centro y sur del estado (Cuadro 4.1). La región central de Jalisco estuvo representada por poblaciones silvestres de los municipios de Hostotipaquillo y Ameca, aledaños al municipio de Tequila. La población de agave azul se integró con muestras de individuos obtenidas en varias plantaciones comerciales, de las zonas centro y sur del estado, considerando que de esta manera el acervo

altamente eficiente en la identificación de cultivares y variedades de una o varias especies cercanamente relacionadas (Godwin et al. 1997; Boret y Branchard, 2001), y en la estimación de la diversidad genética y procesos evolutivos en plantas (Wolfe et al., 1998; Pradep et al., 2002). Esta técnica ha sido establecida en el género *Agave* para estudios de este tipo (Aguirre 2004; Rocha 2006; Vargas Ponce, Capítulo 3 de esta tesis).

Cuadro 4.1. Procedencia de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* Haw. y cultivares de Tequila.

* Población	Localidad ^a	COD ^b	N	LAT N	LONG O	ALT ^c
1 <i>A.angustifolia</i>	Tuxpan	ATu	26	19°33' 14"	103°22'32"	1083
2 <i>A.angustifolia</i>	Zapotitlán	AZ	24	19°32' 22"	103°50'39"	900
3 <i>A.angustifolia</i>	Sayula	ASA	25	19° 52'58"	103°36'02"	1260
4 <i>A.angustifolia</i>	Tuxcacuesco	ATX	36	19°41'39"	103°58'58"	793
5 <i>A.angustifolia</i>	Palo Alto	APA	21	21°17'00"	103°54'53"	1740
6 <i>A.angustifolia</i>	Tecolotlán	AT	22	20°12'10"	104°02'56"	1709
7 <i>A.angustifolia</i>	Ameca	AM	35	20°38'18"	104°06'08"	1600
8 <i>A.angustifolia</i>	Hostotipaquillo	AH	37	21°07'06"	104°04'28"	1050
9 Sigüin	Tequila	SI	19	20°52'58"	103°50'12"	1180
10 Bermejo	Tequila	BE	11	20°52'58"	103°50'12"	1180
11 Agave azul	***	TEQ	22			

^a Municipio(s) donde se obtuvieron las muestras.

^b código de abreviación.

N número de individuos.

Ubicación geográfica.

^c msnm.

*** De varias localidades del centro y sur de Jalisco.

Se extrajo ADN genómico de un promedio de 25 individuos por población silvestre, 11 del cultivar Chato, 19 del Sigüin y 22 del agave azul con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) modificado para *Agave* (Aguirre, 2004). El ADN obtenido se cuantificó con un fluorómetro (Dyna Quant 200, Hoefer, Biotech) y se prepararon diluciones con ADN a 10 ng/μl. La generación de los marcadores se realizó de la misma manera

señalada en el capítulo 3 de esta tesis. La amplificación fue hecha mediante GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando dos iniciadores de ISSRs -(GACA)₃ RG y YR(GACA)₃ (Laboratorio de Secuenciación de Proteínas, University of California-Davis), seleccionados por su mejor amplificación, consistencia y polimorfismo y bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 44°C y 2 minutos a 70°C de anillamiento, y una extensión final de 30 minutos a 72°C. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles no desnaturalizantes de bisacrilamida (30:1) al 6%, conteniendo urea 3M para mejorar la definición de las bandas y amortiguador continuo TBE 1.0 X. Un marcador de peso molecular de 100-pb fue incluido en cada gel. La electroforesis fue realizada a 450 V por 12 horas (SQ3 Sequence Hoeffer) y los productos de la amplificación fueron visualizados con la técnica de tinción por nitrato de plata usando el paquete de Promega Q4132. Las bandas de peso molecular fueron consideradas como fragmentos homólogos. La reproducibilidad de los fragmentos ISSR fue probada para cada iniciador repitiendo el procedimiento dos veces en varias poblaciones. Se usaron controles negativos (sin ADN) para detectar auto-amplificaciones o contaminaciones.

4.2.3. Análisis de agrupamiento genético

La presencia (1) o ausencia (0) de cada banda se registró de manera visual. Los datos se arreglaron en una matriz binaria por población. Consideramos dos niveles de análisis: individuos y poblaciones. Las relaciones genéticas fueron inferidas mediante análisis de agrupamiento basados en similitud genética y un método bayesiano de asignación de individuos.

Al nivel de individuos se realizaron dos análisis: (i) Análisis de agrupamiento con el método del vecino más cercano (NJ, Saitou y Nei, 1987) sin grupo externo y basado en el coeficiente de similitud de Nei y Li (1979): $2N_{xy} / (N_x + N_y)$, donde N_{xy} es el número de pares de bandas compartidas entre dos individuos, N_x y N_y son el número total de bandas amplificadas en los individuos x y y. Este coeficiente es apropiado para el análisis de ISSR porque excluye las bandas ausentes en el cálculo de los valores de similitud. La ausencia de bandas ISSR puede ocurrir por varias razones y podrían no ser homólogas (Wolfe *et al.*, 1998); (ii)

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), basado en las distancias entre pares de individuos obtenidas con el coeficiente de Gower. Ambos análisis fueron realizados con el programa MVSTAT versión 3.13.

Al nivel de poblaciones se realizaron dos análisis: (i) análisis de agrupamiento con el método del vecino más cercano (NJ) sin grupo externo y basado en la distancia genética estándar de Nei (1972). Como un primer paso, con la matriz de datos binarios se generó una matriz de frecuencias genéticas y sobre ella se estimaron las distancias entre cada par de poblaciones para construir el fenograma. Se utilizó el programa NTSYS (Rolf, 2004); (ii) Análisis bayesiano de agrupamiento. El método se apoya en técnicas Montecarlo Vía Cadenas de Markov para hacer una asignación probabilística de individuos (genotipos individuales) a una o dos poblaciones si sus genotipos indican que comparten ancestría y tienen flujo génico. Este modelo asume la existencia de K poblaciones, cada una caracterizada por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus (Pritchard *et al.*, 2000). La estimación de las relaciones genéticas fueron basadas en la proporción de ancestría estimada de cada individuo (q : coeficiente va de 0 a 1) y cada población calculados mediante el programa Structure versión 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Los individuos fueron clasificados de acuerdo a su localidad de procedencia, definiendo con ello $K = 11$ poblaciones (acervos genéticos) y se utilizó el modelo de ancestría sin flujo génico sugerido para marcadores dominantes, la opción de datos previos de la población, (considerando las localidades en donde los individuos fueron muestreados como datos previos) y se asumió frecuencias alélicas no correlacionadas. El período de "burn-in" y longitud de corrida ("run length") fue de 10^4 y 10^5 respectivamente, para permitir que la cadena de Markov alcanzara la estacionalidad. El programa genera un gráfico donde cada individuo es representado por una barra individual y asignado a una población. La barra puede estar fragmentada cuando el individuo comparte ancestría con otra población distinta.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Agrupamiento genético entre individuos y entre poblaciones

El análisis de agrupamiento con el método del vecino más cercano y considerando todos los individuos mostró un patrón general de asociación de éstos dentro de sus poblaciones de origen, con una baja proporción de individuos intercalados con los de otras poblaciones

(Figura 4.2). Los individuos del agave azul (TEQ) presentaron la mayor similitud genética y cinco poblaciones silvestres de *A. angustifolia* del sur de Jalisco (ATu, AT, APA, ASA, AZ, ver Cuadro 4.1) exhibieron una alta asociación con su misma población. En cambio algunos individuos de las poblaciones de *A. angustifolia* de Ameca (AM), Hostotipaquillo (AH) y de Tuxcacuesco (ATX) se asociaron con individuos de otras poblaciones. Seis individuos de *A. angustifolia* de Ameca (AM), se incorporaron al grupo formado por los individuos del agave azul (TEQ). Un subgrupo de individuos de Tuxcacuesco (ATX) se asoció con el grupo de TEQ-AM. La mayoría de los individuos del cultivar Sigüin (SI) se asociaron como población independiente y algunos individuos se agruparon con las poblaciones de *A. angustifolia* de Sayula (ASA) y de Hostotipaquillo (AH) (no señalados en la Figura 4.2). Por otra parte, algunos individuos del cultivar Bermejo (BE) presentaron la mayor distancia de similitud genética con respecto al resto de los individuos y algunos de ellos se asociaron con algunos individuos de la población de Ameca

Un patrón de agrupación semejante al generado por el NJ se obtuvo con el análisis de coordenadas principales (ACoP) (Figura 4.3). Las tres primeras coordenadas explicaron el 20% del total de la varianza, correspondiendo con la variación que exhiben los individuos de una misma población y entre poblaciones. Hubo una mayor cercanía entre las poblaciones silvestres del sur y del mismo modo entre las del centro de Jalisco. La ordenación de los individuos evidenció que el agave azul forma un grupo con gran similitud genética y más distante del resto, los individuos de las poblaciones de Ameca y Tuxcacuesco se observaron como los más cercanos al agave azul.

El análisis de agrupamiento de las 11 poblaciones (Figura 4.4) mostró la formación de dos clados. El primero agrupó a todas las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* excepto a la población de Ameca. El segundo se dividió en dos subgrupos, agrupando a *A. angustifolia* de Ameca y al agave azul en uno y al cultivar Sigüin y Bermejo en otro. Esta topología concuerda en general con los resultados del PCoA (Figura 4.3).



Figura 4.2. Dendrograma de similitud genética entre individuos silvestres de *Agave angustifolia* y variedades cultivadas de Tequila, basado en el Coeficiente de Distancia de Nei y Li (1979) y el método del vecino más cercano. Tuxpan (ATu), Zapotitlán (Z), Sayula (ASA), Tuxcacuesco (ATX), Palo Alto (APA), Tecolotlán (AT), Ameca (AM), Hostotipaquillo (AH), Sigüin (SI), Bermejo (BE), agave azul (TEQ).

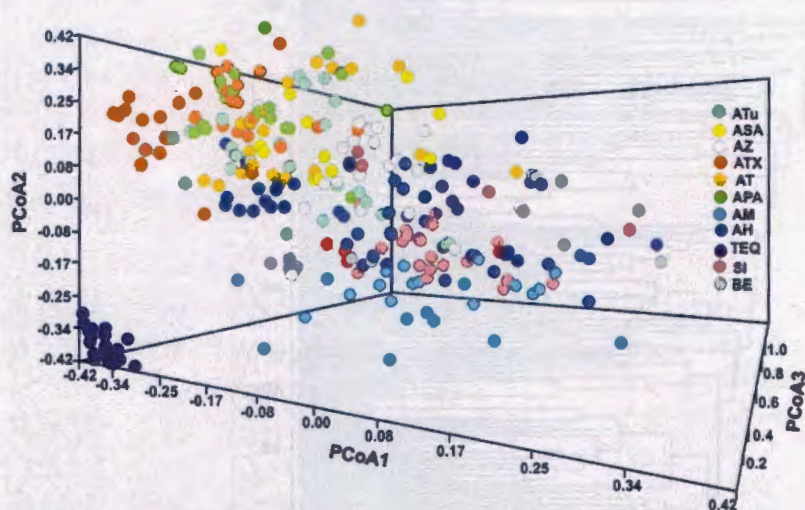


Figura 4.3 Patrones de agrupación mostrados por el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basados en el coeficiente de distancia Gower sobre los datos ISRR de 293 individuos silvestres de *Agave angustifolia* y las variedades cultivadas de Tequila. La proporción de la varianza explicada por el PCoA1 fue de 9.47% y por el PCoA2 de 8.59%. Tuxpan (ATu), Zapotitlán (Z), Sayula (ASA), Tuxcacuesco (ATX), Palo Alto (APA), Tecolotlán (AT), Ameca (AM), Hostotipaquillo (AH), Sigüin (SI), Bermejo (BE), agave azul (TEQ)

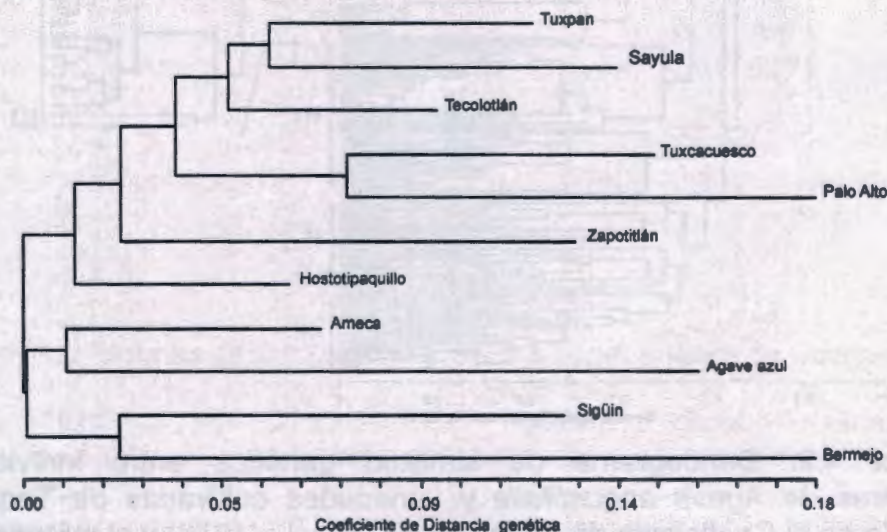


Figura 4.4 Dendrograma de relaciones genéticas de poblaciones silvestres de *A. angustifolia* y tres variedades cultivadas de Tequila basado en la Distancia genética de Nei (1972) y método de agrupamiento del vecino más cercano (Neighbor-joining)

El análisis bayesiano mostró una tendencia de agrupamiento de los individuos con las poblaciones predichas (Figura 4.5). La frecuencia de membresía de los individuos en las 11 poblaciones se muestra en el Cuadro 4.2. Cinco poblaciones silvestres, las dos del centro (AH, AM) y tres del sur (ATu, AZ, APA) agruparon individuos exclusivamente de su localidad ($q = 0.76 - 1.00$ del total), al igual que la variedad comercial ($q = 1.00$). La población de Tecolotlán (AT) comparte considerable ancestría con la de Tuxpan (ATu), la de Sayula con Tecolotlán (ASA, AT) (coeficiente q , 0.89 y 0.99 respectivamente), y la de Tuxcacuesco (ATX) con la de Sayula (ASA). El cultivar Sigüin tiene una ancestría considerable con la población de *A. angustifolia* de Ameca (AM) del centro de Jalisco (0.42) y en baja proporción con la de Tecolotlán (AT) y la de Hosotipaquillo (AH). El cultivar Bermejo también compartió ancestría con AM.

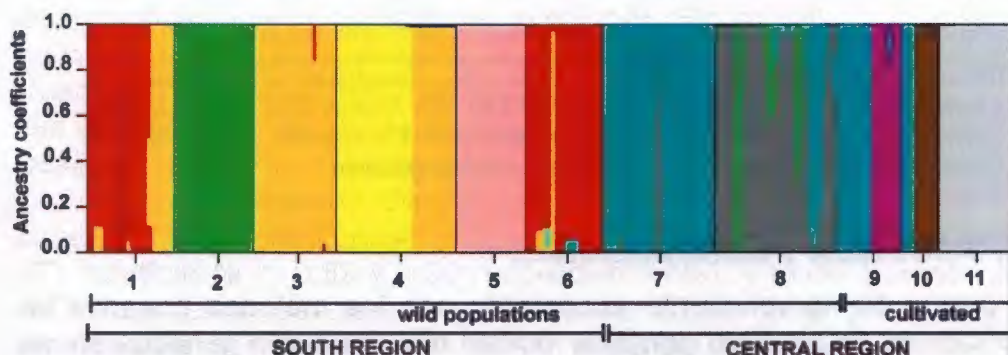


Figura 4.5. Coeficiente de ancestría estimado por individuo (q) agrupado por población ($K = 11$) basado en el análisis de asignación bayesiana mediante el programa Structure (Pritchard, 2000). Cada individuo es representado con una línea vertical. Tuxpan (1), Zapotitlán (2), Sayula (3), Tuxcacuesco (4), Palo Alto (5), Tecolotlán (6), Ameca (7), Hosotipaquillo (8), Sigüin (9), Bermejo (10), agave azul (11).

Cuadro 4.2. Proporción de membresía estimada por población mediante el programa Structure (Pritchard , 2000).

P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.756	0.000	0.034	0.000	0.000	0.203	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.989	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.001
3	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.991	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.026	0.000	0.362	0.584	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.998	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.889	0.003	0.000	0.000	0.000	0.057	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.914	0.085	0.000	0.000	0.000
8	0.000	0.008	0.009	0.000	0.000	0.004	0.158	0.829	0.000	0.000	0.000
9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.424	0.007	0.518	0.000	0.000
10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.363	0.000	0.000	0.636	0.000
11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

P = poblaciones predefinidas. Tuxpan (1), Zapotitlán (2), Sayula (3), Tuxcacuesco (4), Palo Alto (5), Tecolotlán (6), Ameca (7), Hostotipaquillo (8), Sigüin (9), Bermejo (10), agave azul (11). En negritas se resaltan los coeficientes más altos o compartidos entre poblaciones.

4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El patrón de agrupamiento encontrado con los métodos basados en coeficientes de similitud genética indican diferenciación genética en las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*. Se encontró una gran similitud entre los individuos del agave azul que indica una baja diversidad genética, resultado de la propagación vegetativa y la selección continua bajo cultivo (Gil-Vega *et al.*, 1991, 2006; Vargas *et al.* 2007). Esto es congruente con los bajos coeficientes de variación morfológica observados por Vargas *et al.* (2007). El agrupamiento bayesiano de individuos indicó, que el agave azul es una población independiente sin ancestría con otras poblaciones de las aquí involucradas, de manera similar a poblaciones que pasaron por un severo efecto de deriva génica. Sin embargo, el análisis de similitud genética y el filogenético sugieren que comparte una relación genética más cercana con la

población de *A. angustifolia* de Ameca (AM) del centro del estado de Jalisco. El método bayesiano utilizado tiene como virtud, el proporcionar una alta certeza de asignación particularmente en poblaciones genéticamente diferenciadas ($T > 0.995$, F_{ST} entre 0.10 y 0.20; Manel *et al.*, 2002).

La mayor relación genética encontrada entre los individuos de las poblaciones silvestres geográficamente más cercanas, así como los coeficientes de ancestría estimados entre éstas (Cuadros 4.1 y 4.2) podrían ser resultado de la existencia de flujo génico en las condiciones naturales de la región, facilitado por la existencia del corredor biológico de la cuenca de los ríos Armería-Ayuquila-Tuxcacuesco, las características reproductivas de *A. angustifolia* (autoincompatibilidad) y su ecología reproductiva (polinización por murciélagos) (Eguiarte *et al.*, 2000; Molina-Freener y Eguiarte, 2003; Zizumbo-Villarreal y Colunga-GarcíaMarín, 2007). Sin embargo, también puede ser resultado de la poza génica y los ancestros compartidos de *A. angustifolia*.

La población de *A. angustifolia* de Ameca resultó el linaje más relacionado con el agave azul de acuerdo con los análisis de similitud genética (PcoA, NJ de individuos y poblaciones). Esta población es grande, se localiza en una zona boscosa donde la cobertura vegetal no ha sido demasiado alterada, en las partes más bajas (1200 m de altitud) se encuentra al bosque tropical caducifolio y más arriba (desde 1500 m de altitud) bosque de encino en ecotono con el bosque tropical caducifolio. La población tiene alta diversidad genética (Heterocigosidad esperada $H_E = 0.30$ y porcentaje de loci polimórficos $pI = 91.3$, reportado en la Tabla 3.1 de esta tesis) reflejándose igualmente en una gran variabilidad morfológica que exhiben los individuos, encontrándose al menos tres morfotipos distintos; uno de ellos es semejante al del agave azul incluyendo la tonalidad azul cenizo de las hojas.

En la población de Ameca sólo dos individuos presentaron haplotipos idénticos, encontrándose entonces 33 haplotipos diferentes. En la población del agave azul se identificaron 20 haplotipos diferentes, 50 de los loci son monomórficos (80 % del total) y sólo 19 loci son polimórficos (20% del total). Los seis individuos de Ameca agrupados con el agave azul presentan cada uno un haplotipo diferente, pero tienen una similitud entre 75 y 85% con los haplotipos multilocus del agave azul, incluyendo 40 de los 50 loci fijos (75% del total) en el agave

azul. El hallazgo de esta concordancia morfológica y similitud genética de algunos genotipos de *A. angustifolia* de Ameca con el agave azul, aún a pesar de la reducida diversidad genética de este último (heterocigosidad esperada $H_E = 0.008$ y porcentaje de loci polimórficos $PI = 20.3$ reportado en la Tabla 3.1 de esta tesis) nos lleva a sugerir que las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* creciendo en este tipo de vegetación (como lo propuso Gentry, 1982), y procedentes de regiones adyacentes de Ameca, Cocula, Tecolotlán y de altitudes cercanas a los 1500 m representan al acervo genético más relacionado con la variedad comercial. En este hábitat las poblaciones alcanzan tallas mayores y desarrollan tallos más grandes, atributos deseables para el proceso productivo de bebidas destiladas.

Es más factible que en el Valle de Tequila se haya introducido a cultivo germoplasma con características adaptativas a las tierras altas, obtenido en el Bosque tropical caducifolio y transiciones con encinar entre los 1300 y 1600 m de altitud, coincidiendo con lo señalado por Gentry (1982) y Zizumbo-Villarreal y Colunga-GarcíaMarín (2007), más que de las poblaciones naturales de las barrancas del río Santiago (aprox. 700 msnm) como señaló Luna-Zamora (1991) o de poblaciones lejanas como Tuxpan (Walton, 1977). No obstante, es importante señalar que el acervo genético cultivado en el Valle de Tequila corresponde al acervo genético de la ruta natural demarcada por el corredor biológico de las cuencas de los ríos Armería-Ayuquila, Ameca y Santiago-Bolaños, a través de los cuales ha podido ocurrir movimiento de genes por la distribución continua de *Agave* y el movimiento de los polinizadores. Esto es apoyado por el hecho de que algunos individuos de la población de *A. angustifolia* de Tuxcacuesco presentan mayor grado de similitud genética con agave azul que otras poblaciones del sur (Figuras 4.2 y 4.3). De tal forma, que no se puede descartar entre: a) la posibilidad de que el acervo cultivado del agave azul proceda de poblaciones distintas de *A. angustifolia* y que la variación que actualmente presenta sea producto de la diversidad de estas poblaciones originales, b) haya sido seleccionado de una sola población con alta variabilidad genética y el manejo no ha logrado la reducción total de su variabilidad genética.

Encontramos que el cultivar Sigüin también tiene una relación genética cercana con el acervo de *A. angustifolia* y más específicamente con la población de Ameca (AM), pero con individuos

(genotipos) diferentes a los que se asociaron con el agave azul. El Análisis de coordenadas y el de agrupamiento de individuos (Figuras 4.2 y 4.3) mostraron que el Sigüin está formado por dos subgrupos genéticos, resultando en una mayor diversidad de genotipos, y concuerda con los valores de diversidad reportados para este cultivar (heterocigosidad esperada $H_E = 0.30$, y porcentaje de loci polimórficos $L_p = 89.8$, Cuadro 3.1 de esta tesis). El análisis de asignación mostró que este cultivar tiene una mayor ancestría con la población de *A. angustifolia* de Ameca, y en menor proporción con las poblaciones de Hostotipaquillo (AH) y Tecolotlán (AT), sugiriendo que su base genética más amplia puede ser producto del flujo génico entre las poblaciones de esta región, de la poza génica ancestral de *Agave* y que no ha sufrido un proceso de selección artificial tan fuerte como el agave azul. El cultivar Sigüin tiene por tanto una cercana relación con el agave azul, éste se incorporó al grupo de agave azul y *A. angustifolia* de Ameca en un análisis de agrupamiento donde se excluyó al cultivar Bermejo (figura no mostrada), concordando con lo reportado por Gil-Vega *et al.* (1997) y Bousios *et al.* (2007) y confirmando la hipótesis planteada en este trabajo. Por el contrario, un subconjunto de individuos del cultivar Bermejo (60%) exhibieron la menor similitud genética y se observaron como el acervo más distante de todas las poblaciones incluidas en el estudio (Figuras 4.1, 4.2 y 4.3); el resto de los individuos de Bermejo formaron también un grupo compacto que se asoció con dos individuos de la población de Ameca ubicados cerca del agave azul pero con genotipos diferentes. A pesar de que la prueba de asignación indica una ancestría del cultivar Bermejo con el Sigüin, con la evidencia generada en este trabajo no es posible clarificar si el Bermejo ha sido derivado del acervo de *A. angustifolia* o si se ha separado del resto de las poblaciones por su naturaleza triploide (Palomino *et al.*, 2003) o si pertenece a un acervo independiente. Lo que podría ser efecto del muestreo, pero hay indicios de que Bermejo es independiente y posiblemente haya (hubo) una parte de las poblaciones de Bermejo que han convivido con agave azul y el Sigüin y generado algún flujo génico que ha conducido a la formación de nuevas poblaciones que así lo manifiestan.

La identificación de poblaciones silvestres de *A. angustifolia* relacionadas genéticamente y morfológicamente con *A. tequilana*, es un hallazgo relevante y tiene una implicación importante para la

conservación del germoplasma silvestre y cultivado de *Agave*. La disminución o pérdida de poblaciones silvestres de *A. angustifolia* ha sido reportada por la expansión del agave azul (Martínez-Rivera *et al.*, 2007) y por sobre-explotación para la producción de mezcal en el sur de Jalisco (Zizumbo-Villarreal y Colunga-GarcíaMarín, 2007) y en Sonora (Burwell, 1995). La fragmentación de habitats y deforestación del Valle de Tequila, debido al establecimiento de la industria Tequilera (Valenzuela-Zapata y Nabham, 2003) así como a la demanda de poblaciones silvestres cuando escasea la materia prima para Tequila, ha afectado la existencia y distribución de *A. angustifolia* en esta región. Las poblaciones son escasas y relictuales, localizándose mayormente en las barrancas del Río Santiago, en sitios inaccesibles para la agricultura y la ganadería ó en relictos de bosque transicional de encino con el tropical caducifolio como es el caso de Ameca. Estas condiciones subrayan la urgencia de tomar medidas para establecer un área de conservación *in situ* para proteger el acervo silvestre relacionado con el agave azul, como son las poblaciones de *A. angustifolia* Haw. de Ameca y Tuxcacuesco. El impacto humano, el establecimiento de agricultura y la ganadería y la fragmentación del habitat pueden conducir a la pérdida de la diversidad. La conservación *in situ* de la diversidad de este germoplasma constituye el primer paso para llegar a ampliar la base genética del cultivo. De manera paralela es necesario establecer un banco de semillas para conservar la variación genética de estos acervos.

El mejoramiento genético del agave azul, como la sustentabilidad del cultivo a mediano y largo plazo, requiere de la conservación y el conocimiento profundo de los acervos genéticos silvestres y los generados a través del proceso de domesticación en los últimos 10,000 años. En relación a estos últimos, los registros históricos del cultivo indican una reducción drástica de los acervos. Hoy día en el Valle de Tequila se reporta el predominio del agave azul y escasos individuos de los cultivares Chato, Bermejo y Listado Azul, mientras que, el Sigüin se encuentra en mayor proporción (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal, 2007).

Para el caso del cultivar Sigüin es conveniente acrecentar su base genética, para lo cual las poblaciones silvestres de Ameca y Hostotipaquillo, que resultaron cercanamente relacionadas, podrían ser útiles. En cuanto al cultivar Bermejo, su agrupamiento con el agave azul

y la población silvestre de Ameca también pone en relevancia la importancia de conservar esta población. Finalmente, es estratégico para el cultivo y la industria establecer una colección de germoplasma, correctamente documentado, tanto de los cultivares existentes de tequila como de las poblaciones silvestres relacionadas, para su conservación *in situ* a largo plazo.

AGRADECIMIENTOS

Este artículo es parte de la tesis doctoral del primer autor realizada como parte de sus estudios de posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Opción Ecología en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY). La investigación fue conducida bajo la dirección de Patricia Colunga-GarcíaMarín y la supervisión académica de Daniel Zizumbo-Villarreal. Los autores agradecen a Adrián Galván, Francisco Santana-Michel, Roberto Nieto y Jesús Rosales por su apoyo en el trabajo de campo y Julián Coello Coello, Jaime Martínez, Filogonio May-Pat, y Mayabel Guisazola por su participación en el laboratorio. A los productores tradicionales del sur de Jalisco, particularmente Macario y Apolinar Partida, Federico y Santos Juárez. El primer autor agradece al PROMEP la beca otorgada para la realización de sus estudios de posgrado, al CICY, SINAREFI SAGARPA (P-007), CONABIO (P-CS007) por el apoyo económico parcial para realizar esta investigación.

4.5. LITERATURA CITADA

- Aguirre D., X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *A. potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 73 pp.
- de Arregui, D.L. 1619. Descripción de la Nueva Galicia. Escuela de estudios Hispanos-Americanos, Sevilla 1946.
- Bahre, C. J. and D. Bradbury. 1980. Manufacture of mezcal in Sonora, Mexico. *Economic Botany* 34:391-400.
- Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and specific tools for genome finger printing. *Plant Molecular Biological Reporter* 19:209-215.

- Bousios A., I. Saldana-Oyarzabal, A. Valenzuela-Zapata, C. Word and S. R. Pearce. 2007. Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science* 172:291-298.
- Bruman, H. J. 1940. Aboriginal Drink Areas of New Spain. Tesis Doctoral, Universidad de California, Berkeley. 243 pp.
- Bruman, H. J. 2000 Alcohol in Ancient México. University of Utah Press, Salt Lake. 158 pp.
- Burwell, T. 1995. Bootlegging on a desert mountain: The political ecology of Agave (*Agave* spp.) Demographic change in the Sonora River Valley, Sonora, Mexico. *Human Ecology* 23:407-432.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 2003. The domestication of henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). pp. 439–446. En: The Lowland Maya Area. Three Millennia at the Human-Wildland Interface. A. Gómez-Pompa, M. F. Allen, S. L. Fedick and J. J. Jimenéz Osorio (eds). The Haworth Press Inc., Binghamton, Nueva York.
- Colunga-GarcíaMarín, P. and D. Zizumbo-Villarreal. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16:1653-1667.
- Cuevas F. X. 2001. Análisis de diversidad genética entre especies y variedades del género *Agave* basados en marcadores AFLP. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del estado de Jalisco, Guadalajara, Jalisco. 75 pp.
- Dalton, R. 2005. Saving the Agave. *Nature* 438:1070-1071.
- Doyle, J. and J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:131-150.
- Espinosa-Paz, H., C. Arredondo-Velásquez, A. Cano-García, A. M. Canseco y F. Vázquez Quintana. 2002. La materia prima para

producir el mezcal oaxaqueño. INIFAP. Manual Técnico No. 2. Oaxaca, México. 68 pp.

Gentry, S. H. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 679 pp.

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

Gil Vega, K., C. Díaz, A. Nava-Cedillo and J. Simpson. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170:904-909.

Godwin, I. D., E. A. B. Aitken and L. W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528.

Hernández V. G. 2003. Inventario de especies silvestres del género *Agave* en el estado de Jalisco y relaciones genéticas inferidas mediante marcadores AFLP. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ), Guadalajara, Jalisco. 103 pp.

Luna-Zamora, R. 1991. La historia del Tequila, de sus regiones y sus hombres. CONACULTA. México, D.F. 302 pp.

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

Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. *Proceeding of the National Academic of Sciences, USA* 76:5269-5273.

nel, S., P. Berthier and G. Luikart. 2002. Detecting wildlife poaching: identifying the origin of individuals with bayesian assignment test and multilocus genotypes. *Conservation Biology* 16:650-659.

rtínez Rivera, L. M., J. Rosales, P. Gerritsen, A. Moreno, L. Iñiguez, G. Palomera, S. Contreras, O. Cárdenas, L. Rivera, A. Solis, R. Cuevas, E. García, M. Ramírez, A. Aguirre, J. L. Olguín, F. J. Santana, R. Carrillo, R. Carrillo y C. Pacheco. 2004. Impacto Ambiental, social y económico del cultivo de agave azul (*Agave tequilana* Weber) en el municipio de Tonaya, Jalisco. Resúmenes IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae: Los

Agaves de Importancia Económica en México, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán.

- Molina-Freaner, F. and L. E. Eguiarte. 2003. The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: Contrasting roles of bats as pollinators. *American Journal of Botany* 90:1016-1024.
- Muriá, J. M. 1975. Si los magueyes de este territorio. Documento mecanográfico. Inédito.
- MVPS. Multi-Variate Statistical Package. Kovach Computing Services, Anglesey, Wales. [Http://www.kovcomp.com](http://www.kovcomp.com).
- Pérez, L. 1887. Estudio sobre el maguey llamado mezcal en el estado de Jalisco. *Boletín de la Sociedad Agrícola Mexicana* 11:130-133.
- Pradeep R. M., N. Sarla. and E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Pritchard, J. K., M. Stefens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Rocha M. M.G. 2006. Genética evolutiva comparada en cinco especies de *Agave*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. 164 pp.
- Rolf, F. K. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analyses system. Versión 2.02i. Exeter Software, Setauked, New York.
- Sevilla del Río, F. 1977. La Provanca de la Villa de Colima: en su defensa ante un ordenamiento de la Real Academia de México, que ordenaba la tala total de los palmares colimenses, año 1612. Editorial Jus, México, D.F.
- Valencia P. O. M. y M. Cházaro Basañez. 2004. El uso de los agaves en la preparación de bebidas alcohólicas en el occidente de México. Resúmenes IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae: Los Agaves de Importancia Económica en México, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán.

- Valenzuela-Zapata, A. G. 1997. El agave tequilero: Cultivo e Industria. 2da. ed. Monsanto. Guadalajara, México.
- Valenzuela-Zapata, A. G. and G. P. Nabhan. 2003. Tequila! A Natural and Cultural History. The University of Arizona Press, Tucson. 113 pp.
- Vargas-Ponce, O., D. Zizumbo-Villarreal and Patricia Colunga-GarcíaMarín. 2007. *In situ* Diversity and maintenance of traditional Agave landraces used in spirits production in West-central México. Economic Botany 61(3):XX-XX (In Press).
- Walton, M. K. 1977. The evolution y localization of mezcal y tequila in Mexico. Geográfica 85:113-132.
- Wolfe, A. D., Q. Xiang and S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Schrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR). Molecular Ecology 7:1107-1125.
- Zizumbo-Villarreal, D. 1996. History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mexico: 1539-1810. Genetic Resources and Crop Evolution 43:505-515.
- Zizumbo-Villarreal, D. and P. Colunga-GarcíaMarín. 2007. Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution (In press). DOI 10.1007/s10722-007-9255-0.

Capítulo 5.

Conclusiones generales

Con base en los resultados obtenidos de esta investigación se concluye que:

1. Con este trabajo se resaltó que las parcelas bajo manejo tradicional son un reservorio donde se mantiene alta riqueza de cultivares de *Agave* genéticamente diversos, los cuales han sido seleccionados por sus mejores características productivas, morfo-fenológicas, agronómicas y organolépticas.
2. La alta riqueza de cultivares tradicionales encontrados en el sur de Jalisco, con altos niveles de diversidad genética ($H_E = 0.20-0.35$), similares a los de las poblaciones silvestres ($H_E = 0.29-0.40$), así como los análisis de relaciones de similitud genética y filogenéticos sugieren que las estribaciones de los Volcanes de Colima, al sur de Jalisco, es el área de selección primaria de germoplasma de *Agave* para bebidas destiladas en el centro-occidente de México.
3. Se confirmó que el manejo tradicional favorece el mantenimiento *in situ* de la diversidad de agaves mezcaleros. La riqueza, la diversificación de los cultivares tradicionales y su mantenimiento, es resultado de: 1) la selección constante de los campesinos, 2) la incorporación a cultivo de germoplasma silvestre, 3) del manejo de poblaciones del gradiente silvestre-domesticado, y 4) de la conservación de cultivares antiguos dentro de los agroecosistemas tradicionales en el sur de Jalisco.
4. En contraste, *A. tequilana* Weber var. azul, el cultivar comercial de Tequila, posee baja diversidad ($H_E = 0.08$), tres veces menor a la presentada por las poblaciones silvestres. En este estudio se corroboró que el manejo comercial y cultivo de una sola variante propagada de forma vegetativa, conduce a una drástica disminución de la diversidad.
5. Las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* Haw., presentaron menor estructuración genética y diferenciación ($F_{ST} = 0.17$) que las manejadas bajo un sistema de cultivo tradicional ($F_{ST} = 0.33$), indicando mayor flujo génico entre las silvestres, correlacionado con la presencia

de los corredores biológicos de las cuencas de los ríos Ayuquila-Armería, Grande de Santiago-Ameca y Coahuayana-Naranjo y la polinización por murciélagos.

6. Las poblaciones manejadas y cultivadas presentaron mayor diferenciación que las silvestres, la cual se incrementó con la intensificación del manejo, en dirección silvestre > tolerada-fomentada ($F_{ST} = 0.33$) > cultivadas ($F_{ST} = 0.36$).

7. Los cultivares reconocidos por los agricultores son entidades morfológicas diferenciadas. Esta diferenciación morfológica corresponde con la diferenciación genética encontrada, lo que aporta evidencia de que el manejo tradicional genera y mantiene la diferenciación entre cultivares y con respecto al acervo silvestre.

8. Las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* y *A. rhodacantha* son los principales acervos genéticos de selección de germoplasma para cultivo en el área de estudio. Los resultados permiten sugerir la existencia de acervos no identificados taxonómicamente, a partir de los cuales también se han seleccionado poblaciones para cultivo.

9. Algunos cultivares tradicionales del sur de Jalisco tienen una cercana relación genética con las poblaciones de *A. angustifolia* de esta región, confirmando que han sido seleccionados de esta especie. En cambio, las poblaciones toleradas y cultivadas, morfológicamente relacionadas con *A. rhodacantha*, no parecen tener una gran cercanía genética entre ellas. Esto puede indicar que pertenecen a linajes muy diferenciados de esta especie o que pertenecen al acervo de una especie independiente, aunque no se puede descartar que algunos sean productos híbridos entre *A. angustifolia* y *A. rhodacantha*.

10. La similitud morfológica y genética de *A. tequilana* var. azul y una población de *A. angustifolia* del Valle de Tequila, indican que el agave azul pudo haber sido seleccionado para su cultivo y domesticado de poblaciones creciendo en la transición el bosque tropical caducifolio con el encinar, confirmando la hipótesis planteada por Gentry en 1982.

11. El cultivar Sigüin tiene una relación genética cercana con el acervo de *A. angustifolia* de la región centro y sur de Jalisco. Por otra parte, en el presente estudio no se pudo definir si el cultivar Bermejo ha sido derivado del acervo de *A. angustifolia*, si pertenece a un acervo independiente o si se ha diferenciado del resto de las poblaciones por

su naturaleza triploide. Asimismo, el cultivar Chato parece pertenecer a un acervo diferente de *A. angustifolia*.

12. Con los resultados de esta investigación y la de Zizumbo-Villarreal y Colunga-GarcíaMarín (2007) podemos afirmar que el acervo genético cultivado en el valle de Tequila, corresponde al acervo genético de la ruta natural demarcada por el corredor biológico de las cuencas de los ríos Armería-Ayuquila, Ameca y Santiago-Bolaños, a través de los cuales ha podido ocurrir movimiento de genes debido a la distribución continua de poblaciones de *Agave* y el movimiento de los polinizadores, así como la difusión temprana de la destilación y la prevalencia de una tradición cultural de elaboración de bebidas destiladas de *Agave*.

Perspectivas

Con este trabajo se generaron resultados que evidencian cuáles han sido los factores fundamentales para la generación, mantenimiento y pérdida de la diversidad del germoplasma silvestre y cultivado de *Agave* utilizado para elaborar bebidas destiladas en el centro-occidente de México. Los datos obtenidos con marcadores moleculares resultaron útiles para sugerir estrategias de conservación. Paralelamente, a partir del marco teórico y metodológico que se estableció, se pueden desarrollar a futuro otros trabajos de investigación. De lo anterior se derivan las siguientes ideas:

1. El reservorio genético mantenido en las parcelas de Zapotitlán y Canoas, que han sido establecidas como áreas de conservación *in situ* —como resultado del proyecto de investigación, del cual forma parte esta tesis—, podría ser utilizado en programas para la diversificación productiva de las bebidas destiladas tradicionales y comerciales de una manera sustentable, dirigida a mercados gourmet que permitan el uso de la diversidad como base para su conservación. Para ello se requiere generar vínculos con organismos especializados en la promoción de las bebidas tradicionales destiladas (como la recién formada Logia del Mezcal), en estrategias de mercado y en trabajo comunitario, para lograr la consolidación del mercado de los mezcales tradicionales y el desarrollo sustentable que permita la conservación de la diversidad del germoplasma de agaves mezcaleros, de la tradición y conlleve al establecimiento de marcas colectivas.
2. Las estrategias del manejo campesino de la diversidad del germoplasma, los usos, el destino del producto y otros factores que determinan la alta diversidad encontrada en el sur de Jalisco podrían sentar las bases para desarrollar estrategias de conservación de la diversidad que aún existe en la región centro de Jalisco. En el Valle de Tequila podría desarrollarse un proyecto de conservación *in situ* en colaboración con las autoridades municipales y los campesinos tradicionales interesados en conservar sus recursos genéticos, con dos líneas de acción: a) búsqueda e introducción de los agaves mezcaleros de la región dentro del sistema productivo maíz-frijol-calabaza-agaves como en el sur de Jalisco, sistema que favorece la conservación del germoplasma y el ingreso económico a los campesinos; b) el establecimiento de una colección de germoplasma *ex situ in vivo* de los

cultivares de Tequila y de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* genéticamente más relacionadas, bien documentado, que funcione como parcela demostrativa (Jardín Botánico) y a la vez pueda ser utilizada como banco de semillas.

3. Realizar nuevas exploraciones etnobotánicas y colectas en las áreas no incluidas en este estudio, como: a) la región de Bolaños y San Martín Bolaños, al noroeste del estado de Jalisco, donde se reportaron bebidas destiladas en el siglo XVII, que es parte del corredor biológico Río Grande-Santiago-Río Bolaños y se encuentra en la ruta cultural-comercial utilizada por los españoles, desde Colima hasta el norte de México, durante la Colonia; b) en la región de Tuxpan, se podría ampliar el área explorada y hacer una investigación etnobotánica con mayor profundidad, que permita hacer una búsqueda de otros cultivares mezcaleros y rescatar el conocimiento tradicional en el que fue un importante centro de producción de bebidas destiladas en el siglo XIX. Estas exploraciones permitirían contestar algunas preguntas como: ¿Existen en estas regiones sitios que sean núcleos de selección y diversidad de germoplasma de agaves mezcaleros?, ¿*Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* han sido los acervos primarios de selección?, ¿Cuál ha sido el papel de los campesinos tradicionales en este proceso?.

4. Se deberán determinar los acervos silvestres no identificados que han sido seleccionados para cultivo en la región de estudio. La caracterización morfológica y taxonómica de algunos cultivares tradicionales del sur de Jalisco que presentan rasgos morfológicos similares a *A. tequilana*, tanto a la variedad azul como al Sigüin, ayudará a contestar algunas preguntas que surgieron durante el estudio, como: ¿Pertenecen estos cultivares a una especie diferente a *A. angustifolia* no conocida con anterioridad? ¿Pertenecen a linajes diferentes? ¿Comparten una ancestría considerable?, ¿Es esta similitud morfológica una convergencia evolutiva?.

5. La búsqueda y aplicación de otras herramientas moleculares para el análisis de genes influenciados por el proceso de domesticación, dado que la selección de germoplasma que hacen los campesinos se basa en atributos morfológicos particulares, el tiempo en el que alcanzan la madurez reproductiva y en las características productivas deseables como la cantidad de azúcares.

