

**VALOR POTENCIAL DE MARCADORES  
MICROSATÉLITE DE TABACO EN LA IDENTIFICACIÓN DE  
ESPECIES DE AGAVE**

MARTHA DÁVILA Y MIGUEL A. CASTILLO

*Unidad de Investigación en Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela  
martad@ucla.edu.ve*

*Resumen.* Las especies del género *Agave* son principalmente de origen tropical cultivadas por el valor de sus fibras y de las bebidas fermentadas que se obtienen de las plantas. Los estudios moleculares han sido de gran utilidad en el establecimiento de diferencias genéticas en otras especies, especialmente en aquellas donde la base de datos del ADN es conocida. Debido a la inexistencia de información relacionada con algunas especies de *Agave* y en particular *Agave cocui*, en este trabajo se realizó un estudio preliminar con el objetivo de evaluar el valor potencial de tres pares de iniciadores para microsatélites obtenidos por consenso de genoma de cloroplasto de tabaco con el fin de determinar su posible utilidad para la realización de estudios genéticos del género. Todos los pares de iniciadores generaron productos mediante la amplificación por PCR, sugiriéndose que es posible utilizar loci SSR derivados de secuencias de consenso de tabaco en estudios poblacionales de especies de *Agave* hasta que se cuente con una base de datos propia de las especies de interés. *Recibido: 20 noviembre 2006, aceptado: 19 marzo 2007.*

*Palabras clave:* *Agave*, marcadores microsatelite, *Agave cocui*, tabaco, taxonomía, base de datos del ADN.

POTENTIAL VALUE OF TOBACCO MICROSATELLITE MARKERS  
FOR IDENTIFICATION OF AGAVE SPECIES

*Abstract.* Species of *Agave* are mainly tropical in origin, cultivated for the value of their fibers and fermented drinks obtained from the plants. Molecular studies have been useful in detecting genetic differences in other species, especially when the DNA database is known. Because genome information is lacking in *Agave*, in particular *Agave cocui*, this study evaluates the potential value of three pairs of primers for microsatellites, obtained by consensus from the tobacco chloroplast

genome with the purpose of determining its utility in genetic studies of *Agave*. All three pairs of primers generated products by means of PCR amplification, suggesting that it is possible to use SSR loci, derived from tobacco consensus sequences, in *Agave* population studies until the genome database of these species is available. *Received: 20 November 2006, accepted: 19 March 2007.*

*Key words:* *Agave*, microsatellite markers, *Agave cocui*, tobacco, taxonomy, DNA database.

## INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es originario de América tropical con muchas especies productoras de aproximadamente un 90% de las fibras duras consumidas en el mundo (Ciaramello y de Paiva 1975). El análisis taxonómico de este género fue realizado por Gentry (1982). Sin embargo, los botánicos coinciden en que existen dificultades para determinar con exactitud las especies de este género debido a la escasa información escrita y a las deficientes colecciones existentes. Aparentemente, cada variación de color en la hoja, así sea leve y la estructura de la hoja entre otros caracteres, históricamente ha dado origen a especies o variedades nuevas que han producido una lista de especies aparentemente artificial. Gentry (1982) dividió el género en dos grupos subgenéricos, *Littaea* y *Agave*, abarcando en total 136 especies. En principio, esta variación podría deberse a que la polinización en *Agave* es quiropterofílica (Slauson 2000, Scott 2004 y Rocha *et al.* 2005), en otras especies del género relacionado *Manfreda*, visitantes como abejas y colibríes también han sido observados (Barrón y Hernández 2004).

Adicionalmente, se han señalado tanto el carácter protándrico (García *et al.* 2004) como la polinización quiropterofílica de sus flores (Molina-Freaner y Eguiarte 2003), lo cual impide la autofecundación. El efecto de los polinizadores en el sistema reproductivo de las plantas puede modificar el flujo genético en las poblaciones y al mismo tiempo aumentar su variabilidad genética debido a los efectos de una reproducción sexual.

Para evitar esta variabilidad genética, lo más recomendable como método de propagación de las especies de *Agave* cultivadas comercialmente, es la utilización de hijos pequeños nacidos de la planta adulta y el aprovechamiento del rizoma que queda en el suelo cuando la planta termina su vida adulta (Echeverría 1975). No obstante, aún cuando las plantas son propagadas clonalmente, González *et al.* (2003) demostraron la existencia de diferencias

entre los caracteres morfológicos seleccionados en un estudio realizado en plantas de henequén (*Agave fourcroydes*).

Los reportes acerca de la nomenclatura de la especie antes mencionada, indican la presencia de al menos dos variedades: *Agave cocui* Trel. var. *cucutensis* Hummelinck, ubicada en el occidente de América del Sur, principalmente en Colombia, y *Agave cocui* Hummelinck var. *laguayrensis* Hummelinck, reportada para Venezuela y Bonaire (The International Plant Names Index 2004). En otras especies del mismo género que crecen en México, se ha indicado cierta confusión en su determinación exacta (Carrillo-Reyes *et al.* 2003, García-Mendoza y Chiang 2003 y Navarro-Quezada *et al.* 2003). Por esta razón, en especies de *Agave*, ya se han aplicado diversas técnicas de marcadores bioquímicos y moleculares para determinar con mayor exactitud su riqueza florística, particularmente en México, donde se maneja una industria importante alrededor de las especies *A. tequilana*, *A. sisalana* y *A. fourcroydes* (Colunga-García Marín *et al.* 1993, 1996 y Colunga- García Marín y May-Pat 1993).

Colunga-García-Marín *et al.* (1999), determinaron la alta variación isoenzimática en las poblaciones de *A. angustifolia* mientras que dentro de los cultivares de henequén (*A. fourcroydes*) todos los individuos resultaron idénticos entre ellos y diferentes entre cultivares, debido principalmente a la domesticación de un solo cultivar desde mediados del siglo XVIII.

Hernández y Flores (2004) realizaron un inventario de las especies silvestres de *Agave* en el estado de Jalisco, utilizando marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), los cuales revelaron una amplia diversidad genética entre los materiales estudiados. Igualmente, Infante *et al.* (2003) y Demey *et al.* (2004) mostraron mediante el uso de AFLP que a pesar de su reproducción asexual, el henequén puede ser genéticamente variable. González *et al.* (2004) analizaron la genética de poblaciones de *A. garciae-mendozae* utilizando marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) encontrando niveles de heterocigosis elevados, Delgado-Valerio *et al.* (2004) reportaron el uso de microsatélites, secuencias simples repetitivas (SSRs), en estudios poblacionales del complejo *A. angustifolia* y cultivos derivados, destacando la utilidad de los SSRn para detectar polimorfismos.

Los marcadores SSR, en particular, son secuencias repetitivas de oligonucleótidos cortos desde sólo 1 hasta 6 pares de base (pb) usualmente presentes en segmentos codificantes y no codificantes del ADN y la región completa repetida ocupa menos de 150 pb (Tautz y Renz 1984, Tautz 1989,

Wang *et al.* 2003). El número de microsatélites puede diferir entre individuos y por lo tanto pueden ser usados como marcadores de ADN. La forma más común de detectar los microsatélites es mediante el diseño de iniciadores específicos para PCR los cuales se corresponden con un locus particular en el genoma apareándose a cada lado de la región repetitiva, por lo tanto, al emplear un solo par de iniciadores cada individuo de una especie podría revelar productos de diferentes tamaños según sea el tamaño de cada microsatélite (Morgante y Olivieri 1993).

Su alto grado de polimorfismo y la facilidad relativa con la que estos pueden ser registrados, han hecho muy populares a los SSR en los últimos años en diferentes campos de investigación en biología molecular (Miller *et al.* 2001, Nagamitsu *et al.* 2001, Calo *et al.* 2003, Frei *et al.* 2005, Tang *et al.* 2005). Sin embargo, un factor que se ha vuelto en su contra es la obligatoriedad de sintetizar microsatélites *de novo* a partir del genoma de las especies que van a ser estudiadas (Zane *et al.* 2002). Recientemente, se han realizado varios intentos para vencer este obstáculo utilizando amplificación en especies cruzadas (el uso de marcadores microsatélite desarrollados a partir de una especie para análisis en otra especie), observándose resultados contradictorios en cuanto a su eficiencia (Weising y Gardner 1999, Gaitan-Solis *et al.* 2002, Chambers 2004).

Gaitan-Solis *et al.* (2002) aislaron microsatélites de *Phaseolus vulgaris* y establecieron con éxito un alto poder discriminatorio de los mismos para ser utilizados en la caracterización de la diversidad genética de la especie así como en el mapeo genético de especies relacionadas. Stafstrom e Ingram (2004) determinaron una secuencia SSR de 15 repeticiones TCA en la region 5'UTR del género *Pisum*; esta región repetitiva, fue analizada para diez germoplasmas silvestres y cultivados de este género así como de otros géneros relacionados (*Cicer*, *Lathyrus*, *Lens* y *Viola*). Todas las secuencias fueron similares a excepción del número de repeticiones TCA. El objetivo de este trabajo es utilizar marcadores microsatélite universales con el fin de realizar una evaluación preliminar de su utilidad en estudios de diversidad genética entre individuos de especies relacionadas del género *Agave*.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

La colección de material vegetal se realizó en el municipio Urdaneta, estado Lara, Venezuela, para *Agave cocui*. Los individuos de *A. tequilana* se colectaron en un huerto del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán

(CICY), México, y los de *A. angustifolia* provinieron de poblaciones silvestres, igualmente de Yucatán, México.

El análisis molecular se realizó con tres pares de iniciadores universales desarrollados de secuencias de consenso de ADN de cloroplasto de tabaco, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1 (Weising y Gardner 1999).

Tabla 1. Código de los pares de iniciadores y su secuencia deducida por consenso de microsatélites de cloroplasto de tabaco (Weising y Gardner 1999). Las posiciones degeneradas son Y (C ò T) y B (G, C ò T).

Código de cada par de iniciadores	Secuencias de los iniciadores ( F = forward; R = reverse)
ccmp2	F 5'-GATCCCGGACGTAATCCTG-3' R 5'-ATCGTACCGAGGGTTCGAAT-3'
ccmp3	F 5'-CACACCAAAGCTGACATAG-3' R 5'-GTTTCATTCGGCTCCTTTAT-3'
ccmp4	F 5'-AATGCTGAATCGAYGACCTA-3' R 5'-CCAAAATATTBGGAGGACTCT-3'

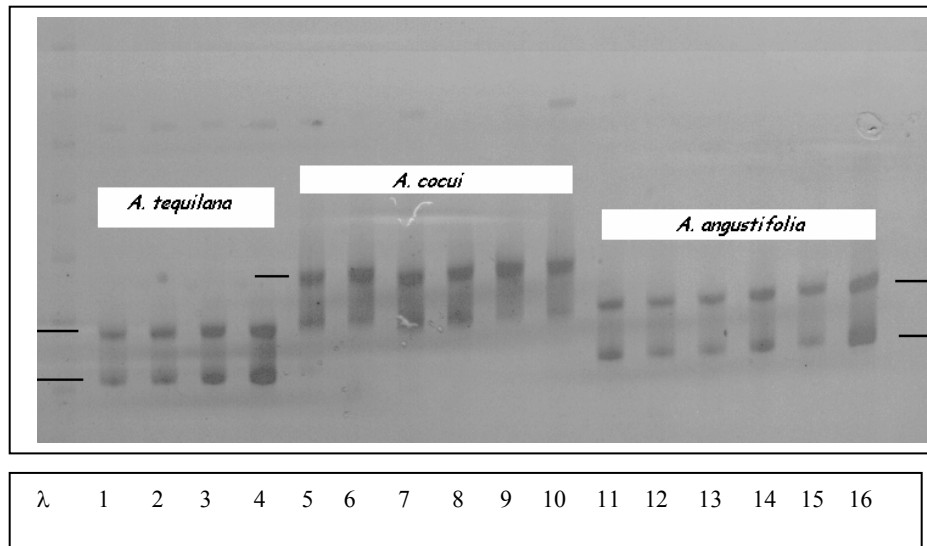
*Extracción de ADN.* El ADN del genoma de todas las muestras se extrajo por duplicado de hojas jóvenes de plantas de alrededor de ocho hojas. Las hojas jóvenes se procesaron siguiendo el método de utilización de buffer CTAB reportado por Doyle y Doyle (1987) modificado con STE (buffer Tris-HCl 100mM PH 8, EDTA 50mM PH8 CTAB 4% NaCl 100mM y B-ME 0,3%) (Aguirre y Eguiarte, comun. pers. 2005). Las concentraciones fueron medidas con un fluorómetro (Hoefer DyNA Quant) y se estandarizaron a 10 ng/ $\mu$ L.

*Amplificación por PCR y Electroforésis.* Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en volúmenes de reacción de 25  $\mu$ L conteniendo 5  $\mu$ L de ADN genómico, (50 ng), 2,5  $\mu$ L de buffer de reacción 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 4,0  $\mu$ L de iniciador (2,0  $\mu$ L de iniciador F 10  $\mu$ M y 2,0  $\mu$ L de iniciador R 10  $\mu$ M), 0,4  $\mu$ L de dNTPs (0,2 mM cada uno), 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) y 0,2  $\mu$ L (5 unidades) de taq polimerasa, completando con H<sub>2</sub>O bidestilada. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GenAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones 94 °C por 5 min seguidos por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 58 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 30 min. Seis  $\mu$ L de los productos del PCR se

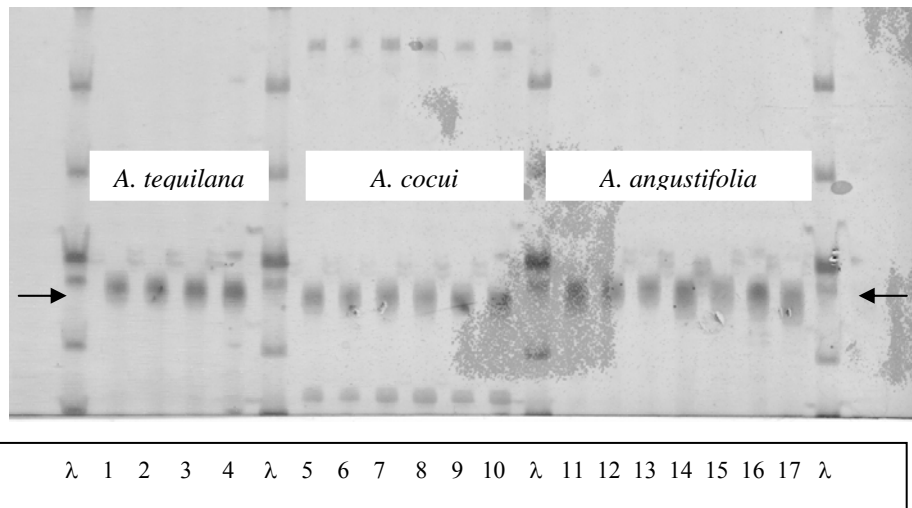
mezclaron con 4  $\mu$ L de buffer de cargado (0,025 g de azul de bromofenol, 0,025 g de Xileno-Cyanol, 4,0 g de sacarosa y 10,0 mL H<sub>2</sub>O destilada) y fueron cargados en geles de poliacrilamida al 6% con urea 7M con buffer TBE. La corrida se realizó por 4 h en cámaras Hoefer SQ3 Sequencer (Amersham Pharmacia Biotech). Los geles fueron teñidos con plata siguiendo las recomendaciones del fabricante (Silver Sequence<sup>TM</sup> DNA, Promega). El tamaño de los productos de amplificación por PCR se estimó por comparación con el marcador de DNA de 100 pb (Promega).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

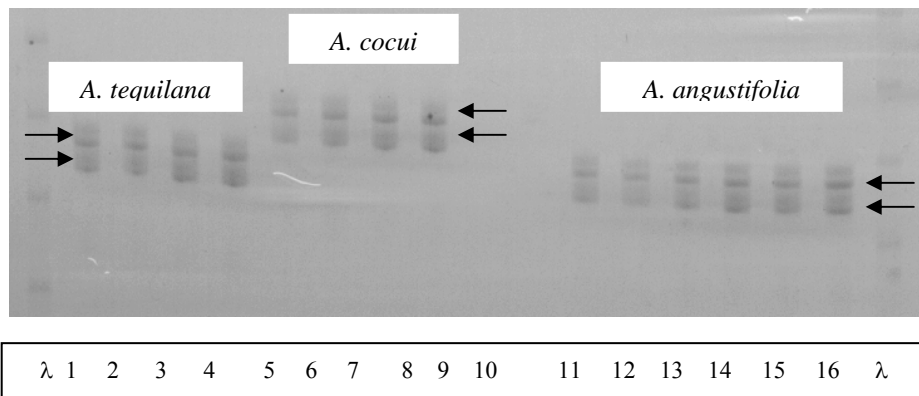
Los productos de las amplificaciones por PCR utilizando los pares de iniciadores universales de tabaco ccmp2, ccmp3 y ccmp4 son mostrados en las Figuras 1, 2 y 3 respectivamente. Weising y Gardner (1999) desarrollaron estos pares de iniciadores consensuados entre otros, con el fin de estudiar repeticiones de mononucleótidos en ADN de cloroplasto de angiospermas en las que las bases de datos son limitadas. En dos de los casos, ccmp2 y ccmp4, más de una banda se amplificó y en todos los casos, incluyendo a ccmp3, los tamaños observados de los alelos varían en relación a los datos reportados para *Cordyline*, un género en la familia Agavaceae (Weising y Gardner 1999).



**Figura 1:** Amplificaciones en ADN genómico de *Agave tequilana* (líneas 1-4); *Agave cocui* (líneas 5-10); *Agave angustifolia* (líneas 11-16), utilizando el par de iniciadores microsatélite ccmp 2.  $\lambda$  = marcador de tamaño de ADN de 100 pb. Las rayas delgadas indican las bandas polimórficas.



**Figura 2:** Amplificaciones en ADN genómico de *Agave tequilana* (líneas 1-4); *Agave cocui* (líneas 5-10); *Agave angustifolia* (líneas 11-17), utilizando el par de iniciadores microsatélite ccmp 3.  $\lambda$  = marcador de tamaño de ADN de 100 pb. La flecha indica las bandas polimórficas.



**Figura 3:** Amplificaciones en ADN genómico de *Agave tequilana* (líneas 1-4); *Agave cocui* (líneas 5-10); *Agave angustifolia* (líneas 11-16), utilizando el par de iniciadores microsatélite ccmp 4.  $\lambda$  = marcador de tamaño de ADN de 100 pb. La flecha indica las bandas polimórficas.

Los tres pares de iniciadores mostraron capacidad de discriminación entre las tres especies de diferente origen, observándose muy particularmente en las Figuras 1 y 3 (ccmp2 y ccmp4) cómo se diferencian claramente a los individuos de *A. cocui* (líneas 5-10) de aquellos pertenecientes a las otras dos

especies, *A. tequilana* y *A. angustifolia*. El par de iniciadores ccmp3 es el que menos información aparente muestra cuando se comparan las tres especies entre sí. Sin embargo, al observar los individuos de *A. angustifolia* (líneas 11-17) podría inferirse que existe una diferencia probablemente de uno o dos mononucleótidos entre estos. Utilizando estos mismos iniciadores en *Actinidia* (Actinidiaceae), Weising y Gardner (1999) observaron altos niveles de polimorfismo interéspecífico, mostrando la secuencia de los productos de amplificación de PCR números variables de residuos A, G y T en los arreglos mononucleótidos, los cuales fueron interpretados como causantes de la variación (Weising y Gardner 1999). Más recientemente, Fraser *et al.* (2005) probaron la eficiencia de 20 marcadores en 120 genotipos de 21 especies de *Actinidia* y revelaron que todos los marcadores mostraron algún grado de amplificación en especies cruzadas.

A pesar de que el uso de microsatélites para amplificar ADN en especies cruzadas ha sido criticado, en los últimos años se han realizado estudios basados en la comparación de secuencias flanqueadoras en diversos organismos que han demostrado que si bien el nivel de conservación en la repetición del microsatélite podría ser bajo, las regiones flanqueadoras por lo general están muy bien conservadas, lo cual proporciona gran utilidad a estos procedimientos (Davierwala *et al.* 2001, Arnold *et al.* 2002, Carvalho *et al.* 2004, Gutierrez *et al.* 2005). Davierwala *et al.* (2001) mostraron la habilidad de iniciadores específicos de *Oriza sativa* utilizados como iniciadores flanqueadores de secuencias (GATA)<sub>n</sub> para amplificar ADN de maíz, trigo, cebada y avena, indicando que los loci contentivos de esta secuencia están conservados en diferentes géneros de cereales.

Carvalho *et al.* (2004) probaron 67 marcadores microsatélite (TTG) desarrollados para *Arachis*, observando una trasferibilidad de marcadores entre especies de una misma sección del género de aproximadamente 76%, mientras que cuando se probaban los microsatélites entre otras secciones del mismo género, la trasferibilidad era de 45%. Arnold *et al.* (2002) utilizaron microsatélites disponibles para vid (*Vitis vinifera*) con el fin de establecer su utilidad en la determinación de variabilidad genética entre 25 especies de cinco géneros distintos de la familia Vitaceae. Estos autores demostraron que la transferencia entre géneros era tan alta como de un 51,1%.

Los niveles de polimorfismo entre las especies bajo estudio se muestran aparentemente altos de acuerdo a los resultados descritos y en concordancia igualmente con los estudios realizados utilizando otros marcadores moleculares (Demey *et al.* 2003, Infante *et al.* 2003, Hernández y Flores 2004

y Delgado-Valerio *et al.* 2004). Sin embargo, es importante destacar el valor preliminar de los resultados presentados puesto que para realizar un estudio de mayor relevancia científica deberíamos disponer de un electroferograma interpretado con un programa de lectura de geles para establecer con exactitud el número y el tamaño de las bandas presentes tal como fue reportado por Demey *et al.* (2003) en sus estudios con *A. fourcroydes*. Por otra parte, en estudios más recientes, Delgado-Valerio *et al.* (2004) reportaron que cinco microsatélites de cloroplasto de coco resultaron polimórficos en poblaciones del complejo de *A. angustifolia* y recomendaron el uso de este tipo de marcadores para estudios filogenéticos.

#### CONCLUSIÓN

Los resultados de esta investigación sugieren que es posible utilizar loci SSR derivados de secuencias de consenso de tabaco en estudios poblacionales de especies de *Agave*, hasta que se cuente con una base de datos propia de las especies de interés.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (CDCHT-UCLA) por el financiamiento de este trabajo a través del proyecto financiado por el Fondo Lisandro Alvarado para los profesores acreditados por el Sistema de Promoción al Investigador (PPI). A Patricia Colunga-García-Marín por permitirnos hacer la pasantía de investigación en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY). A Jaime Martínez por sus consejos.

#### LITERATURA CITADA

- ARNOLD, C., M. ROSSETTO, J. McNALLY Y R. HENRY. 2002. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. *American J. Botany* 89: 22–28.
- BARRÓN, M. Y G. HERNÁNDEZ. 2004. Polinización en *Manfreda scabra* McVaugh H.B.K. Agavaceae en el municipio Huimilpan, Querétaro. IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae, del 5 al 7 de Mayo, CICY, Mérida, Yucatán, México, 21 pp.
- CALO, C. M., L. GAROFANO, A. MAMELI, M. PIZZAMIGLIO Y G. VONA. 2003. Genetic analysis of a Sicilian population using 15 short tandem repeats. *Human Biology* 75: 163–178.

- CARRILLO-REYES, P., R. VEGA Y R. RAMÍREZ-DELGADILLO. 2003. *Agave rzedowskiana*, a new species in subgenus *Littaea* (Agavaceae) from western Mexico. *Brittonia* 55: 240–244.
- CARVALHO, M., M. HOPKINS, S. MITCHELL, S. KRESOVICH, J. MONTENEGRO Y M. FERREIRA. 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology* 4: 1186–1471.
- CHAMBERS, K. E. 2004. Cross-species amplification of human microsatellite markers using noninvasive samples from white-handed gibbons (*Hylobates lar*). *Amer. J. Primatology* 64: 19–27.
- CIARAMELLO, D. Y G. DE PAIVA. 1975. Estudio comparativo entre especies de *Agave*. *Bragantia* 34(11): 195–201.
- COLUNGA-GARCÍA-MARÍN, P. Y F. MAY-PAT. 1993. *Agave* studies in Yucatán, Mexico I. Past and present germplasm diversity and uses. *Economic Botany* 47: 312–327.
- COLUNGA-GARCÍA-MARÍN, P., J. COELLO-COELLO, L. ESPEJO-PENICHE Y L. FUENTE-MORENO. 1993. *Agave* studies in Yucatan, Mexico II. Nutricional value of the inflorescence peduncle and incipient domestication. *Economic Botany* 47: 328–334.
- COLUNGA-GARCÍA-MARÍN, P., E. ESTRADA-LOERA Y F. MAY-PAT. 1996. Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatán, Mexico. *American J. Botany* 83: 126–140.
- COLUNGA-GARCÍA-MARÍN, P., J. COELLO-COELLO, L. EGUIARTE Y D. PIÑERO. 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American J. Botany* 86: 115–123.
- DAVIERWALA, A. P., W. RAMAKRISHNA, V. CHOWDARI, P. K. Y. RANJEKAR Y V. S. GUPTA. 2001. Potential of (GATA)<sub>n</sub> microsatellites from rice for inter- and intra-specific variability studies. *BMC Evolutionary Biol.* 1: 7.
- DELGADO-VALERIO, P., J. COELLO-COELLO, D. ZIZUMBO-VILLARREAL Y P. COLUNGA-GARCÍAMARÍN. 2004. Uso de microsatélites nucleares y citoplasmáticos como marcadores genéticos moleculares en *Agave*. IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae, del 5 al 7 de Mayo, CICY, Mérida-Yucatán, México, 21 pp.
- DEMEY, J. R., E. GAMEZ, S. MOLINA Y D. INFANTE. 2004. Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 29–35.
- DOYLE, J. J. Y J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- ECHEVERRÍA, F. 1975. Análisis del cultivo de Maguey (*Agave* sp.) en el departamento de Chiquimula y su importancia en Guatemala. Trabajo Especial de Grado, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala, 56 pp.
- FRASER, L. G., M. A. MCNEILAGE, G. K. TSANG, C. F. HARVEY Y H. N. DE SILVA. 2005. Cross-species amplification of microsatellite loci within the dioecious, polyploid genus *Actinidia* (Actinidiaceae). *Theor. Appl. Genetics* 7: 1–9.

- FREI, A., M. W. BLAIR, C. CARDONA, S. E. BEEBE, H. GU Y S. DORN. 2005. QTL mapping of resistance to *Thrips palmi* Karny in common bean. *Crop Science* 45: 379–387.
- GAITAN-SOLIS, E., M. C. DUQUE, K. J. EDWARDS Y J. TOHME. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. *Crop Science* 42: 2128–2136.
- GARCIA-MENDOZA, A. Y F. CHIANG. 2003. The confusion of *Agave vivipara* L. and *A. angustifolia* Haw., two distinct taxa. *Brittonia* 55: 82–87.
- GARCÍA, P., I. PISANTY, E. VEGA Y C. ILLSLEY. 2004. Reproducción y germinación de *Agave cupreata* en la localidad de Ayahualco, Guerrero. IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae, del 5 al 7 de Mayo, CICY, Mérida, Yucatán, México, 21 pp.
- GENTRY, H. 1982. *Agaves of continental North America*. Univ. of Arizona Press, Tucson, AZ, USA.
- GONZÁLEZ, G., S. ALEMÁN Y D. INFANTE. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science* 165: 595–601.
- GONZÁLEZ, A., M. ROCHA, A. VALERA Y L. EGUIARTE. 2004. Genética de poblaciones y ecología reproductiva del *Agave garciae-mendozae*, especie descrita recientemente. IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. del 5 al 7 de Mayo, CICY, Mérida, Yucatán, México, 21 pp.
- GUTIERREZ, M. V., M. C. VAZ-PATTO, T. HUGUET, J. I. CUBERO, M. T. MORENO Y A. M. TORRES. 2005. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops. *Theor. Appl. Genetics* 110: 1210–1217.
- HERNÁNDEZ, G. Y E. P. FLORES. 2004. Inventario de especies silvestres del género *Agave* en el estado de Jalisco y relaciones genéticas inferidas mediante marcadores AFLP. IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae, del 5 al 7 de Mayo, CICY, Mérida, Yucatán, México, 21 pp.
- INFANTE, D., G. GONZÁLEZ, L. PERAZA-ÉCHEVERRÍA Y M. KEB-LLANES. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164: 223–230.
- MILLER, C. A., A. ALTINKUT Y N. L. LAPITAN. 2001. A microsatellite marker for tagging Dn2, a wheat gene conferring resistance to the Russian Wheat Aphid. *Crop Science* 41: 1584–1589.
- MOLINA-FREANER, F. Y L. E. EGUIARTE. 2003. The pollination biology of two paniculate *Agaves* (Agavaceae) from Northwestern Mexico: Contrasting roles of bats as pollinators. *American J. Botany* 90: 1016–1024.
- MORGANTE, M. Y A. M. OLIVIERI. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175–82.
- NAGAMITSU, T., S. ICHIKAWA, M. OZAWA, R. SHIMAMURA, N. KACHI, Y. TSUMURA Y N. MUHAMMAD. 2001. Microsatellite analysis of the breeding system and seed dispersal in *Shorea leprosula* (Dipterocarpaceae). *International J. Plant Sciences* 162: 155.

- NAVARRO-QUEZADA, A., R. GONZALEZ-CHAUVET, F. MOLINA-FREANER, L. E. EGUIARTE. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220–227.
- ROCHA, M., A. VALERA Y L. E. EGUIARTE. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave littaea* (Agavaceae) species in Central Mexico. *American J. Botany* 92: 1330–1341.
- SCOTT, P. E. 2004. Timing of *Agave palmeri* flowering and nectar-feeding bat visitation in the Peloncillos and Chiricahua mountains. *Southwestern Naturalist* 49: 425–434.
- SLAUSON, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American J. Botany* 87: 825–836.
- STAFSTROM, J. P. Y P. INGRAM. 2004. TCA microsatellite repeats in the 5'UTR of the Sat5 gene of wild and cultivated accessions of *Pisum* and of four closely related genera. *International J. Plant Sciences* 165: 273–280.
- TANG, Q., T. RONG, Y. SONG, J. YANG, G. PAN, W. LI, Y. HUANG Y M. CAO. 2005. Introgression of perennial teosinte genome into maize and identification of genomic *in situ* hybridization and microsatellite markers. *Crop Science* 45: 717–721.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463–6471.
- TAUTZ, D. Y M. RENZ. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127–4138.
- THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX (IPNI). 2004. A database of the names and associated basic bibliographical details of all seed plants, ferns and fern allies. [www.ipni.org](http://www.ipni.org). Consultado el 18 de octubre de 2006.
- WANG, D., J. SHI, S. R. CARLSON, P. B. CREGAN, R. W. WARD Y B. W. DIERS. 2003. A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Science* 43: 1828–1832.
- WEISING, K. Y R. C. GARDNER. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeats polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9–19.
- ZANE, L., L. BARGELLONI Y T. PATARNELLO. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1–16.