



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Asociación genotipo-fenotipo en
grupos de *Agave durangensis* por
medio de marcadores ISTR y
validación de los grupos por
regiones ITS**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática
y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Luis Guillermo Ríos Villaseñor

Zapopan, Jalisco

Diciembre de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Asociación genotipo-fenotipo en grupos de
Agave durangensis por medio de marcadores
ISTR y validación de los grupos por regiones
ITS**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo
de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

NOMBRE ALUMNO

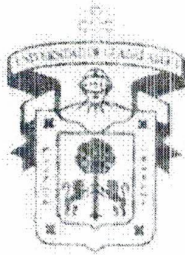
Luis Guillermo Ríos Villaseñor

DIRECTOR

Dra. Martha Isabel Torres Morán

Zapopan, Jalisco

Diciembre de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Asociación genotipo-fenotipo en grupos de *Agave durangensis* por medio de marcadores ISTR y validación de los grupos por regiones ITS

Por

Ing. Luis Guillermo Ríos Villaseñor

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dra. Martha Isabel Torres Morán
Director de Tesis e integrante del jurado

13 NOV. 2017
Fecha

Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

13/Nov/2017
Fecha

Dra. Martha Escoto Delgadillo
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

13/Nov/2017
Fecha

Dra. Ana Paulina Velasco Ramírez
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

13/Nov/17
Fecha

Dra. Norma Almaraz Abarca
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

10 NOV 2017
Fecha

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Al ser supremo, por la vida, por permitirme gozar de ella con salud y rodeado de las personas que la vuelven maravillosa.

A mi familia, por el apoyo incondicional. Un especial agradecimiento a la familia Torres Villaseñor, gracias por todo.

A mi directora y amiga Dra. Martha Isabel Torres Morán, por creer en mí, por sus valiosas enseñanzas y por su ayuda incondicional.

A Dra. Paulina por el adiestramiento en el laboratorio, tus enseñanzas fueron parte central de la culminación de este proyecto.

A los compañeros del laboratorio Alejandro, Efraín, Erika, Karen, Samuel, Víctor y compañeros del vivero escuela, que volvieron ligera la rutina e hicieron llevaderos los días.

A mis asesoras Dra. Carla, Dra. Martha y Dra. Norma por su disposición y valiosos aportes que permitieron enriquecer el proyecto.

DEDICATORIAS

A Tere, por los valores inculcados que hoy rigen mi vida y me motivan a ser mejor persona cada día. Te amo mamá.

A mis Sobrinos, que hoy son tantos que no los nombro. Les aseguro que lo que se propongan lo pueden lograr.

Salvador, siempre me acompañas †

Índice

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	4
<i>Objetivos específicos</i>	4
HIPÓTESIS	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 LA FAMILIA DE LOS AGAVES	6
2.1.2 IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>AGAVE</i> EN MÉXICO.....	7
2.2 ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN AGAVES.....	7
2.2.1 ANTECEDENTES DE VARIABILIDAD MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN <i>AGAVE DURANGENSIS</i>	8
2.3 <i>AGAVE DURANGENSIS</i> Y SU IMPORTANCIA EN LA INDUSTRIA DEL MEZCAL.....	10
2.4 MARCADORES ISTR Y VARIABILIDAD GENÉTICA ASOCIADA A RETROTRANSPONES.....	11
2.5 RELACIÓN ENTRE MARCADORES MOLECULARES Y TAXONOMÍA.....	12
2.5.1 <i>Gen matK</i>	14
2.5.2 <i>Gen rbcl</i>	14

2.5.3 <i>Espaciador intergénico trnH-psbA</i>	14
2.5.4 <i>Espaciador intergénico psbK-psbL</i>	15
2.6 LAS REGIONES ITS Y SU IMPLICACIÓN EN LA SISTEMÁTICA MOLECULAR	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	18
3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	19
3.2.1 <i>ISTR</i>	20
3.3 ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE DATOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES	21
3.4 VALIDACIÓN DE LOS GRUPOS FENOTÍPICOS POR ITS2	22
3.4.1 <i>Clonación para secuenciación</i>	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	24
4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	26
4.3 ANÁLISIS DE CORRESPONDENCIA ENTRE DATOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES	29
4.4 VALIDACIÓN DE LOS GRUPOS FENOTÍPICOS POR ITS2	31
4.4.1 <i>Análisis de las secuencias de la región ITS 2</i>	32
V CONCLUSIONES.....	35
VI LITERATURA CITADA	36
VII ANEXOS	43

Índice de cuadros

CUADRO 1. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES ISTR UTILIZADOS EN PCR	20
CUADRO 2. PROGRAMA PARA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS INICIADORES ISTR	21
CUADRO 3. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR LA REGIÓN ITS2.	22
CUADRO 4. PROGRAMA PARA AMPLIFICACIÓN POR PCR LA REGIÓN ITS2.	22
CUADRO 5. PORCENTAJE DE POLIMORFISMO GENERADO CON CADA COMBINACIÓN DE INICIADORES PARA EL MARCADOR ISTR PARA INDIVIDUOS DE <i>AGAVE DURANGENSIS</i>	27
CUADRO 6. CORRELACIÓN PARA LA COMPARACIÓN DE LAS MATRICES DE SIMILITUD Y DE CORRELACIÓN DERIVADAS DE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES ISTR RESPECTIVAMENTE.	29

Índice de figuras

FIGURA 1. ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS ITS 1 Y 2 UBICADOS ENTRE LAS UNIDADES 18S, 5.8S Y 28S DE rDNA NUCLEAR	16
FIGURA 2. UBICACIÓN DE LOS MUNICIPIOS DE MUESTREO PARA <i>A. DURANGENSIS</i> . 1. DURANGO, 2. NOMBRE DE DIOS Y 3. MEZQUITAL	20
FIGURA 3. DENDROGRAMA OBTENIDO A PARTIR DE LA MATRIZ DE CORRELACIÓN DE DATOS MORFOLÓGICOS PARA 95 INDIVIDUOS DE <i>AGAVE DURANGENSIS</i> COLECTADOS EN LA SIERRA DEL REGISTRO, DURANGO.	24
FIGURA 4. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO DE DATOS MORFOLÓGICOS DE 57 INDIVIDUOS DE <i>AGAVE DURANGENSIS</i> POR EL MÉTODO UPGMA.	25
FIGURA 5. PATRÓN DE AMPLIFICACIÓN EN GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ISTR CON LA COMBINACIÓN DE INICIADORES F10/B1 EN INDIVIDUOS DE <i>AGAVE DURANGENSIS</i> (M= MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB).....	26
FIGURA 6. DENDROGRAMA GENERADO POR EL ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO CON DATOS DEL MARCADOR MOLECULAR ISTR EN 57 INDIVIDUOS DE <i>AGAVE DURANGENSIS</i> . SE MUESTRA LA ASOCIACIÓN DE CADA MUESTRA A UN GRUPO ESPECÍFICO. AZUL GRUPO I, ROJO GRUPO II Y VERDE GRUPO III.....	28
FIGURA 7. COMPARACIÓN ENTRE LA MATRIZ DE SIMILITUD Y DE CORRELACIÓN DERIVADAS DE MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MARCADORES MOLECULARES ISTR RESPECTIVAMENTE.	30
FIGURA 8. COMPROBACIÓN DE LA SEPARACIÓN EN TRES GRUPOS, DE LAS MUESTRAS DE <i>A. DURANGENSIS</i> ELEGIDAS PARA SECUENCIACIÓN.	31
FIGURA 9: GEL DE AGAROSA 1.5% AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO ITS2 (450 PB). CARRILES DEL 1 – 6, <i>AGAVE DURANGENSIS</i> ; CARRIL 7, <i>A. TEQUILANA</i> , CARRIL 8, <i>A. AMERICANA</i> , M= MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 PB)	32
FIGURA 10. ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS (426PB) DE LA REGIÓN ITS 2 DE <i>AGAVE DURANGENSIS</i> Y <i>A. TEQUILANA</i> WEBER, DONDE SE MUESTRA LA DIFERENCIA ENTRE AMBAS ESPECIES.	33
FIGURA 13. DENDROGRAMA DE LAS SECUENCIAS DE DNA DE <i>A. DURANGENSIS</i> Y <i>A. TEQUILANA</i> WEBER, DONDE SE MUESTRA LA RELACIÓN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS.	34

SEDE

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares, perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Fitogenéticos, Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara

Resumen

Agave durangensis se distribuye de manera natural en el Sur de Durango y en el Norte de Zacatecas, es un agave utilizado en la industria de elaboración de mezcal, el cual cuenta con una denominación de origen, misma que le atribuye características específicas que vuelven atractiva a esta bebida para la industria y la captación de divisas. Sin embargo, existe controversia entre los taxónomos acerca de los tipos de agave que son colectados para la elaboración de la bebida que se obtiene a base de este agave, ya que los productores eliminan el escapo floral de las plantas silvestres, en recorridos que realizan para seleccionar las plantas que van a utilizar, impidiendo con esto la floración y con ello la observación de características necesarias para la identificación taxonómica. En el presente estudio se utilizaron los marcadores molecular ISTR e ITS (para la región ITS2) para diferenciar tres grupos fenotípicos dentro de *Agave durangensis*. Los marcadores ISTR usados en el presente estudio detectaron altos niveles de polimorfismo en las muestras analizadas y permitieron separar las muestras de acuerdo a las características morfológicas específicas de cada uno de los grupos estudiados. Para el caso del marcador ITS, la comparación de las secuencias ITS2 de *A. durangensis* con las reportadas en GeneBank (AM884828.1; AM884829.1 y AM884836.1) presentaron altos porcentajes de identidad con *A. rhodacantha* (99%), *A. gentry* (99%) y *A. salmiana* (90%). Estos resultados corresponden a la semejanza fenotípica que comparte *A. durangensis* con estas especies. Debido a que no se observaron diferencias nucleotídicas en la región ITS2 entre las muestras de *A. durangensis*, se sugiere utilizar la región ITS completa ya que su poder de discriminación entre los fenotipos fue limitado.

I. Introducción

Agave durangensis se distribuye de manera natural en el Sur de Durango y en el Norte de Zacatecas, es un agave utilizado en la industria de elaboración de mezcal, el cual cuenta con una denominación de origen, misma que le atribuye características específicas que vuelven atractiva a esta bebida para la industria y la captación de divisas. Sin embargo, esta denominación de origen y la instalación de destilerías dentro de Durango han ocasionado una sobre explotación del recurso, dado que la principal fuente de materia son las poblaciones naturales de este agave. Esa sobreexplotación ha repercutido en la reducción de las poblaciones y la pérdida de la variabilidad natural de esta especie.

Por otra parte, existe controversia entre los taxónomos acerca de los tipos de agave que son colectados para la elaboración de la bebida, ya que los productores eliminan el escapo floral de las plantas silvestres, en recorridos que realizan para seleccionar las plantas que van a utilizar, impidiendo con esto la floración y con ello la observación de características necesarias para la identificación taxonómica. Es por ello que no existe un conocimiento preciso de separación en sub-especies e incluso especies diferentes que posiblemente están presentes dentro de este complejo grupo de agaves. La clasificación taxonómica de *Agave durangensis* que realizó Gentry (1982), se basó en un individuo colectado en una población de La Sierra del Registro en el estado de Durango, la cual es la localidad tipo. Este hecho pudo haber influenciado la problemática de clasificación para la especie, ya que el mismo Gentry hace referencia a la variación de fenotipos que observó dentro de esa población.

Las aportaciones que se han realizado para ampliar el conocimiento de esta especie de agave por medio de estudios morfológicos, moleculares y fitoquímicos han proporcionado evidencias para considerar que *Agave durangensis* no es una entidad taxonómica individual, si no; un complejo de especies. El establecimiento de los límites específicos de *A. durangensis* permitiría ampliar el panorama de su clasificación, además de poder asociar los genotipos más adecuados para estandarizar el proceso de la elaboración del mezcal.

En el caso de *A. durangensis*, la mencionada combinación de técnicas ha sugerido la existencia de tres grupos principales que se diferencian a partir de caracteres tanto

morfológicos como químicos y moleculares. Sin embargo, hasta la fecha, no se cuenta con datos que permitan delimitar esos tres grupos a nivel de especie, subespecie o un grupo taxonómico definido. En la búsqueda de soluciones en la definición de fronteras claras para la separación de los individuos con características particulares dentro de este grupo de agaves, en el presente trabajo se proponen los marcadores ISTR (de sus siglas en inglés, *Inverse Sequence Tagged Repeat*) y los ITS2 (de sus siglas en inglés, *Internal Transcribed Spacer2*) cuyas características pueden ser aplicadas para tal fin.

Los marcadores ISTR han demostrado su eficiencia para la separación de especies pertenecientes al género *Agave*; además, son marcadores que utilizan iniciadores universales, pueden amplificar un número alto de loci y son una herramienta fácil de reproducir, así como su accesibilidad en costo comparados con otros marcadores.

Las regiones ITS2 han sido de gran ayuda en la identificación de otras especies a nivel de género en diferentes estudios realizados con plantas. Dentro de los géneros estudiados se encuentra también el género *Agave*. En este trabajo, se utilizó el marcador ISTR para caracterizar los diferentes grupos de individuos dentro de *A. durangensis* y se analizó la región ITS2 de individuos de *A. durangensis* para generar datos moleculares que contribuyan a esclarecer el estatus taxonómico de esta especie.

Objetivo general

Definir un perfil molecular con ISTR para tres grupos diferenciados fenotípicamente dentro de *Agave durangensis* y determinar diferencias específicas en los grupos, basadas en la región ITS2.

Objetivos específicos

- Determinar patrones de amplificación con ISTR específicos asociados a grupos fenotípicos dentro de *Agave durangensis*.
- Precisar el nivel de diferenciación entre los grupos detectados, comparando secuencias de la región ITS2.

Hipótesis

La utilización del marcador molecular ISTR asocia grupos fenotípicos a un genotipo dentro del complejo *A. durangensis* y estos grupos pueden ser comprobados por medio del análisis de la secuencia ITS2.

II. Revisión de Literatura

2.1 La familia de los agaves

La familia Asparagaceae (Rodríguez-Arévalo, et al., 20016). La familia es endémica de América y su distribución geográfica abarca desde el sur de Canadá hasta el norte de Sudamérica. Esta familia alcanza los máximos niveles de riqueza y diversidad en México, por lo que este país se considera su centro de origen. La delimitación de esta familia ha sido tema de debate desde su creación por Endlicher en 1841, mencionado por Singh (2010); por un lado con respecto al número de géneros incluidos en ella, que han variado desde seis (*Yuca*, *Agave*, *Furcraea*, *Littaea*, *Manfreda* y *Polianthes*) hasta 19 citados por Hutchinson (1934); y por otro, con respecto a la ubicación de los géneros, los de ovario ínfero en la familia Amaryllidaceae, y los de ovario súpero en la familia Liliaceae. La sub familia Agavoideae incluye, de acuerdo a García-Mendoza y Galván (1995), seis géneros, de ovario ínfero: *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*, pero de acuerdo con Rocha et al. (2006), además de los anteriores, también se incluye al género *Hesperoyucca*.

En la sistemática moderna, se han tomado en cuenta marcadores tanto morfológicos como moleculares que han permitido definir el origen monofilético o parafilético de las especies. En el caso de los agaves, a partir del sistema de clasificación del *Angiosperm Phylogeny Group* o grupo para la filogenia de las angiospermas (APG III, 2009), los agaves se consideran como parte de la familia Asparagaceae, debido a que recientes estudios moleculares asociaron a la planta no xerofítica (*Schoenolirion* spp) como hermana de *Hesperaloe* spp. las cuales tienen características morfológicas comunes con el género *Agave*. Esto se consideró como evidencia de que Agavaceae es un grupo parafilético (Eguiarte et al., 2013) con características comunes a la familia Asparagaceae. Actualmente, esta familia comprende las subfamilias Agavoideae, Aphyllanthoideae, Asparagoideae, Brodiaeoideae, Lomandroideae, Nolinoideae y Scilloideae.

Good-Ávila et al. (2006), reconoce un total de 206 especies dentro del género *Agave*; sin embargo, Rocha et al. (2006) incluye 300 especies para la familia, de las cuales, en México

se encuentran 217 (258 taxa, tomando en cuenta las categorías infraespecíficas, García-Mendoza y Galván, 1995).

2.1.2 Importancia del género *Agave* en México

Los agaves son plantas endémicas de América de distribución tropical y subtropical, presentes en zonas de clima árido, siendo México con sus características edáficas y climáticas el que mayor número de especies registra de forma endémica. El agave conforma un tipo de vegetación que caracteriza a la región de origen a la que pertenece. En México, se ha aprovechado tradicionalmente este recurso natural utilizando diferentes partes de las plantas: con las fibras obtenidas de las hojas es posible realizar la fabricación de cuerdas. El tallo o piña es rico en azúcares, sirve para preparar miel y edulcorantes sustitutos de azúcar o para la alimentación del hombre o animales, la savia se utiliza para preparar bebidas como el Aguamiel y Pulque y los tallos también sirven para la elaboración de Mezcal o Tequila. Además, son plantas importantes para la protección del suelo deteniendo su erosión (Verduzco-Martínez, et al. 2008).

De las diferentes especies de este género que crecen en México por su importancia actual en la producción de bebidas alcohólicas destaca *Agave tequilana*; sin embargo, hay especies con el mismo potencial que pueden ser utilizadas en la industria de elaboración de bebidas alcohólicas (Torres-Morán, 2009). Entre los estados que destacan en la producción de bebidas a base de azúcares provenientes de plantas de agave, se encuentran Jalisco, Sonora, Oaxaca, Guerrero y Durango.

2.2 Estudio de la variabilidad en agaves

En los últimos años las herramientas moleculares han sido de gran ayuda en resolver problemáticas de identificación de especies con una amplia variación fenotípica. En el género *Agave* se han realizado diversos trabajos, como el de Chávez-Ávila y Martínez-Palacios (1996), quienes realizaron un análisis sobre las características genéticas entre poblaciones del complejo *A. victoriae-reginae* asociado a la calidad de semillas y un análisis isoenzimático, en el cual determinaron el nivel de variación dentro de ese grupo y

de la reducción de las poblaciones naturales. Demey et al. (2004) realizaron un estudio en el que utilizaron marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e ISTR. Estos autores evaluaron la capacidad de discriminación de esos marcadores y la eficiencia en el análisis genético del henequén (*Agave fourcroydes*). Los resultados obtenidos indicaron que el marcador ISTR detectó mayor cantidad de polimorfismo que el marcador AFLP, teniendo una mejor capacidad para la cuantificación de la diversidad genética.

Flores et al. (2010) realizaron estudios morfológicos y cariológicos en *A. karwinskii* y *A. macronata* a partir de los cuales determinaron que las descripciones morfológicas coinciden con las hechas por Gentry (1982) y Rivera (1983); sin embargo, en el apartado de citogenética para *A. karwinskii* difieren en el carácter diploide de $2n = 40$ para el municipio en donde se llevó a cabo el estudio.

Las experiencias reportadas en este género con otros marcadores han puesto en evidencia la utilidad de su uso, tanto en el estudio de variabilidad, como diversidad genética y caracterización. Los marcadores ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*) fueron utilizados en un estudio de variabilidad y relaciones genéticas entre *A. cocui*, *A. angustifolia* y *A. tequilana* (Dávila et al., 2007) en donde se reportó la cercanía genética entre *A. angustifolia* y *A. tequilana*. En henequén cultivado, fue determinada la similitud entre planta madre e hijuelos producidos en campo a través de los marcadores ISTR (Infante et al., 2003). En otro estudio realizado por Demey et al. (2004) se comparó la capacidad discriminatoria de ambos marcadores y los autores llegaron a la conclusión de que los marcadores ISTR producían patrones de diferenciación más precisos que con AFLP. Por otra parte, se ha reportado también el marcador ISTR como un marcador capaz de detectar diferencias interespecíficas en el género agave, lo cual le confiere capacidad de detectar diferencias taxonómicas (Torres-Morán et al., 2008).

2.2.1 Antecedentes de variabilidad morfológica y molecular en *Agave durangensis*

En el Estado de Durango a *Agave durangensis* se le conoce como agave cenizo. Para la elaboración de mezcal con este agave, se usan directamente las poblaciones silvestres sin el

reemplazo en su ambiente natural, reduciendo así el número de ejemplares de esta especie. La descripción se basa en el trabajo de Gentry (1982) de un ejemplar colectado en una localidad de la Sierra del Registro, cerca de la Ciudad de Durango a unos 20 Km al SE aproximadamente, esta zona como la localidad tipo de *Agave durangensis*. Gentry (1982) menciona que los ejemplares de esta especie alcanzan de 80 a 120 cm de altura, de color glauco (por eso conocido como agave cenizo), con hojas de 40 a 90 x 14 a 22 cm. Anchas en la parte media y estrechas en la parte baja, lanceoladas y rugosas en su parte ancha a cóncavas hacia la parte del ápice de la hoja, ásperas, pruinosa, los márgenes de las hojas están rodeados de profundas hendiduras, con dientes, anchos y planos, prominentes, de uno a dos cm de longitud. La espina principal es grande de cuatro a seis cm de longitud de color gris pardo. Su inflorescencia en panículas de siete a ocho metros de alto, con 18 a 30 racimos dispuestos en forma alterna, flores en pequeñas umbelas, de 60 a 80 cm de largo, erectas, amarillas con ovarios de 30 a 40 mm incluyendo un cuello estrecho de tubo cilíndrico de 15 a 22 mm de longitud, ancho y carnosos, ligeramente cavernoso, tépalos no uniformes, estrechamente unidos a los filamentos, rectos en la parte posterior y enrollados en el interior, con el ápice conspicuo y papilado, casi córneo rojizo, el tépalo interior más pequeño. Por esta característica, Gentry (1982) lo ubicó dentro del grupo Ditapalae, e hizo mención de que no cuenta con más características similares a otros miembros que pertenecen a este grupo (Godoy-Díaz et al., 2015). En su publicación, el mismo Gentry hizo referencia a la variación fenotípica y la cantidad de fenotipos que se pueden encontrar dentro de ésta especie.

Agave durangensis es muy variable en tamaño, color de la hoja, tamaño y forma de las espinas. Esta variabilidad podría ser explicada por un sistema de reproducción fundamentalmente sexual en el que la hibridación interespecífica juega un papel importante por la interacción que sucede con la cantidad de fenotipos que se aprecian dentro de este agave. La diversidad fenotípica que se encuentra en las poblaciones naturales, dificulta su clasificación y por consecuencia, su delimitación específica o la separación de grupos definidos dentro del taxón (Torres-Morán, 2009).

La variabilidad genética encontrada a partir de marcadores moleculares dentro de esta especie fue reportada previamente por Torres-Morán (2009), Almaraz-Abarca et al. (2009)

y Almaraz-Abarca et al. (2013), quienes usando ISTR y perfiles fenólicos, concluyeron que esta taxa se encuentra en un proceso avanzado de especiación. Ambos tipos de marcadores detectaron la presencia de tres grupos dentro de las poblaciones que analizaron.

2.3 *Agave durangensis* y su importancia en la industria del Mezcal

El agave se ha aprovechado de manera empírica en el estado de Durango para producir mezcal, bebida alcohólica que en la actualidad cuenta ya con denominación de origen y que se pretende que alcance los niveles de calidad y producción similares a los del tequila en Jalisco. Su aprovechamiento representa una fuente de recursos económicos importante para los habitantes de las comunidades rurales que, en general, viven en condiciones sociales marginales (Olivas et al., 2007).

En los últimos años se ha aprovechado la planta de manera irracional por productores locales y de otras entidades, lo que ha provocado el deterioro del recurso y puesto en riesgo su sustentabilidad. De acuerdo con Valenzuela-Ruiz et al. (2003), la reproducción y establecimiento en forma natural del agave mezcalero en las zonas productoras de Durango no es suficiente para abastecer el volumen de mezcal que demanda el mercado estatal, nacional y recientemente internacional lo que pone en riesgo la continuidad del aprovechamiento y la conservación de la especie (Olivas et al., 2007).

La elaboración de mezcal en las destilerías del Estado de Durango sigue un proceso tradicional que en la actualidad se busca industrializar. El impulso al desarrollo de esa actividad por parte de los productores y el gobierno del Estado, se ha concretado con la inauguración, en 2008, de una planta destiladora en el municipio de Nombre de Dios que cuenta con tanques de cocción, tanques de fermentación y sistemas de destilación modernos, con los que se puede tener un mejor control de la calidad del producto y, con esto aumentar la producción de esta bebida. Al mismo tiempo, la concientización de los productores para conservar las poblaciones naturales de agave y establecer plantaciones ha ido en aumento; sin embargo, uno de los principales problemas para el manejo agronómico sustentable del recurso natural es la falta de información taxonómica y genética disponible. Uno de los puntos medulares que dimensiona la importancia de la conservación de *A.*

durangensis, es la necesidad de ubicar las regiones naturales de crecimiento y la elaboración de propuestas sobre un área de protección que permita evitar la erosión genética que pueda sufrir este recurso. Por otra parte, la ubicación de estas áreas de crecimiento natural, documentaría la información que se requiere para la operación de la denominación de origen, que se encuentra definida como el nombre de una región geográfica del país que sirve para designar el producto originario de la misma, y cuya calidad y características se deben exclusivamente al medio natural y humano (IMPI, 1991, Torres-Morán, 2009)

2.4 Marcadores ISTR y Variabilidad genética asociada a retrotransposones

Los marcadores ISTR se han utilizado para estudios de diversidad y variabilidad genética en algunas especies de cactus (Montalvo et al., 2010), maíz (Torres-Morán et al., 2012) y frijol (Castellanos-Hernández et al., 2017). Son marcadores basados en PCR, que pueden ser aplicados a genomas de animales, plantas y microorganismos. Se basan en el polimorfismo generado por los procesos de transposición de retrotransposones. Fueron reportados por primera vez por Rohde (1996) quien los presentó como marcadores universales útiles en los estudios de variabilidad genética. Los marcadores ISTR son una buena opción y presentan ventajas con respecto a otros marcadores moleculares aleatorios, ya que son más accesibles en precio, son reproducibles y relativamente fáciles de detectar, esto debido al carácter universal de sus iniciadores y el alto nivel de polimorfismo que detectan (Venturi, 2006; Vargas, 2009; Torres-Morán, 2009).

En el caso de agaves, los ISTR han presentado ventajas con respecto a otros marcadores, debido a que detectan más altos porcentajes de polimorfismo (Demey et al., 2004; Torres-Morán et al., 2012) y han permitido discriminar entre la variación existente debido a condiciones ambientales durante la micropropagación (Torres-Morán et al., 2010).

2.5 Relación entre marcadores moleculares y taxonomía

La clasificación taxonómica de organismos involucraba básicamente el análisis de sus características morfológicas. Sin embargo, los taxónomos tenían serios problemas al tratar de ubicar adecuadamente a individuos que perteneciendo a la misma especie, subespecie, variedad o línea, presentaban diferente fenotipo (Quijada, 1996). Sin embargo, en la última década se ha incluido como criterio para la clasificación, a los datos moleculares. Así mismo, el desarrollo a pasos acrecentados de la tecnología en el procesamiento de datos con el desarrollo de las computadoras y software capaces de procesar la información de una manera más eficiente y rápida ayudó a la inclusión de estos criterios en la clasificación desde 1998 con lo que se llamó APG I (*Angiosperm Phylogeny Group*), que contribuyó a la reubicación en un sistema de varios grupos de plantas.

Anteriormente Hillis y Davies (1988) hicieron referencia a no considerar a la sistemática molecular como la panacea; sin embargo, ésta permite abordar problemas que se habían considerado intratables por los sistemáticos tradicionales. Desde la aparición del APG I y posterior de APG II en el 2003 se ha recabado información molecular sobre las relaciones entre las plantas y para el caso de los agaves, éstos se reposicionaron como parte de la familia Asparagaceae como se mencionó anteriormente.

Existe actualmente, metodologías específicas que permiten obtener información a nivel molecular, que han sido tomadas en cuenta para la clasificación de los organismos. El término código de barras de DNA para la identificación de especies, fue dado por Hebert et al (2003) y consiste en un sistema de identificación microgenómico, que permite la discriminación de especies a través del análisis de un segmento pequeño de DNA, que representa una aproximación al diagnóstico de la diversidad biológica.

Para el caso de animales mamíferos, se ha utilizado una región del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI), de aproximadamente 648 pares de bases (pb); sin embargo, en plantas el gen COI no es utilizable como código de barras de ADN, debido a que la tasa de sustitución en la región COI es muy baja, a diferencia de animales, lo cual, se traduce en la ausencia de variación a nivel de la secuencia entre especies del mismo género.

Además los marcadores uniparentales pueden no reflejar la complejidad que existe en la naturaleza (Hoyos et al., 2012). Debido a esto las regiones utilizadas en plantas se han enfocado al genoma del cloroplasto y el núcleo. En el año 2009, un grupo de trabajo del CBOL (de sus siglas en inglés, Consortium for the Barcode of Life) recomendó el uso de los genes cloroplásticos *matK*, que codifica para una enzima llamada madurasa, y *rbcL*, que codifica para la subunidad grande de la enzima RuBisCo (Ribulosa-1,5-Bisfosfato Carboxilasa/oxigenasa), como código de barras, ambas regiones son menores de 800 pb y han sido ampliamente utilizadas en estudios de filogenia por lo cual tienen una importante representación en las bases de referencia. No obstante, en aquellas especies cercanas en donde no se presenta una variación suficiente en estos genes, se ha propuesto la utilización de otros marcadores como son la región transgénica *psbA-trnH*, el intron *trnL* y la región nuclear ITS (Hollingsworth et al., 2009). En todos los casos, el código de barras ha venido a complementar los trabajos morfológicos, siendo muy importantes en la verificación de especies (Armenise et al., 2012). Por lo anterior, puede mencionarse que la metodología que permite abordar las cuestiones de clasificación taxonómica, está basada principalmente en genes y espaciadores intergénicos de cloroplasto. Las secuencias de DNA del cloroplasto son una fuente primaria de datos para estudios de sistemática molecular de plantas y juegan un papel clave que ha proporcionado información como iniciadores universales de regiones tanto codificantes como no codificantes que han dominado dentro de la sistemática molecular de plantas. La elección de una región de DNA de cloroplasto apropiada para la investigación filogenética es difícil, debido a la escasez de información sobre el tiempo de las tasas evolutivas entre las diferentes regiones no codificantes en el DNA cloroplasto (Shaw et al., 2005).

Un antecedente de la aplicación de estos marcadores en el estudio de variabilidad genética y diferenciación poblacional en agaves fue el realizado por Parra (2015) con regiones del cloroplasto en *Agave kerchovei*. El estudio fue realizado en los Estados de Puebla y Oaxaca, se basó en las regiones no codificantes del cloroplasto (*trnL-trnF*, *petA-psbJ* y *rpl32-trnL*). Los resultados aportaron información de 10 haplotipos con un total de 16 sitios de DNA variables, con una diversidad haplotípica y una diferenciación genética altas. Como experiencia previa en la clasificación molecular de agaves, Torres-Morán et al.

(2008), reportaron el marcador ISTR como capaz de discriminar entre especies del mismo género.

2.5.1 Gen matK

El gen MatK codifica para una enzima llamada madurasa, que contribuye a la conformación y maduración de un ARN de transferencia. Dunning y Savolainen (2010) realizaron un estudio para diseñar iniciadores universales de la región matK para monocotiledóneas y dicotiledóneas, con base en los resultados obtenidos en su estudio, propusieron 26 primers que permiten la amplificación de manera fácil y exitosa de este marcador, que posteriormente se volvería una herramienta valiosa para los taxónomos moleculares.

2.5.2 Gen rbcL

El gen rbcL participa en el proceso de fotosíntesis y fijación de carbono, posiblemente sea uno de los genes más conocidos bioquímica y molecularmente. La región rbcL ofrece una alta universalidad, es fácil de amplificar en diversos genomas de plantas terrestres que va por arriba del 90%, y posee baja tasa evolutiva, proponiéndola como útil para discriminar a nivel de familia o género (Hollingsworth et al., 2009).

2.5.3 Espaciador intergénico trnH-psbA

Esta región se encuentra entre los genes trnH-psbA, y es una de las regiones no codificantes del cloroplasto con más variación. En estudios realizados por Kress y Erickson (2007), demostró valores arriba del 60% al 93% de discriminación en angiospermas. Dentro del estudio se hace mención de las limitaciones de esta región, una de ellas es obtener secuencias en ambos sentidos de la cadena DNA de la región que comprende este espaciador para el proceso de secuenciación.

2.5.4 Espaciador intergénico *psbK-psbL*

Esta región se encuentra ubicada entre los genes *psbK-psbL*. Es una región que proporciona porcentajes de discriminación en angiospermas del 77%, sin embargo para gimnospermas los porcentajes de amplificación están por debajo del 40%. Su universalidad en gimnospermas es baja (Jazen, 2009).

2.6 Las regiones ITS y su implicación en la sistemática molecular

El DNA ribosomal nuclear (rDNA) es una secuencia de DNA que codifica para los RNAr 18S-5.8S-28S, los cuales se encuentra organizado en tándem, separadas por espaciadores intergénicos no codificantes, conocidos como ITS1 y 2; de 750 y 450 pares de bases (pb), respectivamente (White et al., 1990 y Song et al., 2012). Las regiones ITS son a menudo diferentes entre especies estrechamente relacionadas y son consideradas secuencias que contienen alta divergencia entre sí (Bauer et al., 2009).

Las regiones ITS se han convertido en un locus nuclear importante para la investigación sistemática molecular de las angiospermas en los planos intergénicos e interespecíficos. Se han generado iniciadores universales a partir de regiones conservadas de los genes ribosomales conservados que permiten amplificar la totalidad de su región espaciadora. Los primeros reportes sobre la región ITS para la delimitación taxonómica de especies fueron generados en hongos y algas, y mediante estos estudios se hace hincapié en la necesidad de obtener un iniciador específico que permita amplificar las regiones ITS en angiospermas (Jobes y Thien, 1997).

Los ITS (Figura 1) son las regiones no pertenecientes al cloroplasto más populares para estudios filogenéticos de especies a nivel de grupos en plantas, ya que pueden producir resultados interesantes en los estudios filogenéticos a nivel de especies o cuando se requieran marcadores nucleares universales (Nieto-Feliner y Rosselló, 2007). Estas regiones nucleares han sido utilizadas en estudios enfocados a sistemática molecular de plantas a nivel de especie, también en estudios de filogenia, y algunos autores las proponen como secuencias que deberían de ser incorporadas al grupo de secuencias utilizada para el

código de barras genético de DNA para la identificación de angiospermas (Li et al., 2011; Salazar et al., 2009; Chacón et al., 2006, Levín et al., 2005). En estudios realizados por Hollingsworth et al. (2011) se informó sobre el potencial que tiene esta región para discriminar entre especies; sin embargo, la eficiencia de amplificación de esta región es más baja que la de algunas regiones del cloroplasto. Es una región ampliamente usada en estudios de especies como orquídeas, pastos, maíz, hongos (White et al., 1990; Cássio et al., 2009; Wang et al., 2011; Song et al., 2012; y Fernández-Mazuecos et al., 2013).



Figura 1. Espaciadores internos transcritos ITS 1 y 2 ubicados entre las unidades 18S, 5.8S y 28S de rDNA nuclear (White et al., 1990).

Dentro de la familia Asparagaceae se han reportado estudios con las regiones ITS combinadas con regiones de cloroplasto. Quizá el más importante sea el trabajo realizado por Bogler et al. (2006) quienes utilizaron tanto las secuencias de los genes ribulosa-bisphosphato carboxylasa (*rbcL*) y NADH deshidrogenasa F (*ndhF*) como ITS2 para definir la filogenia de la entonces familia Agavaceae. En este estudio, se incluyeron tanto especies del género *Agave* como otras especies de familias consideradas cercanas, como Amarilidaceae, Asparagaceae en sentido estricto y Xanthorroaceae. Los autores concluyeron que es más útil considerar dos o las tres regiones para determinar divisiones taxonómicas dentro del orden Asparagales que utilizando cada secuencia por separado. Posteriormente, Yao et al. (2010) propusieron a la región ITS2 como una alternativa para generar código de barras universal, tanto en plantas como en animales.

Los datos obtenidos de las secuencias tanto de cloroplasto como de las regiones nucleares, usualmente son analizados por métodos multivariados y por análisis Bayesiano, que permiten realizar inferencias estadísticas basadas en la probabilidad de pertenencia de los individuos a un grupo (Ronquist, et al., 2005), y también es posible el análisis de parsimonia, basado en establecer relaciones entre diferentes unidades de estudio, ya sea biogeográficas compartidas por taxones que se encuentren dentro del estudio (Takhtajan,

1997). Con las regiones antes mencionadas se ha proporcionado información que ha permitido realizar una clasificación de las sub familias, la identificación de nuevas especies y sub especies dentro de la familia Asparagaceae (Kim et al., 2010; Graham, et al., 2006 y Pires, et al., 2006).

3. Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara en colaboración con el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango (CIIDIR) del Instituto Politécnico Nacional.

3.1 Caracterización morfológica

Se realizó una caracterización morfológica en 95 individuos de *A. durangensis* en la localidad tipo de la Sierra del Registro, Municipio de Nombre de Dios. Los individuos incluidos en esta caracterización fueron independientes de los muestreados para la caracterización molecular, pero estuvieron dentro de la población “tipo”. El objetivo de esta caracterización fue seleccionar los individuos pertenecientes a cada grupo para ser utilizados en el estudio molecular.

Las variables que se tomaron en cuenta para esta caracterización fueron:

- Altura de planta (AP).
- Dosel medido (DOSEL)
- Altura del tallo (ATALLO)
- Largo de la hoja (LH)
- Ancho de la hoja en la parte media (HMED)
- Ancho de la hoja en la base (HBASE)
- Largo de la espina principal (LESP)
- Número de espinas en diez centímetros (NESP10)

Todas las variables fueron medidas en centímetros. Con ellas se elaboró una matriz de datos y como medida de similitud entre plantas se realizó un análisis de correlación múltiple, basado en la fórmula:

$$r_{ij} = \left(\sum_k X_{ki} X_{kj} \right) / \left(\sum_k X_{ki}^2 \sum_k X_{kj}^2 \right)^{1/2}$$

Donde:

- **i, j** corresponden a las plantas **i** y **j**
- **k** corresponde a la variable **k**-ésima

Los valores de r_{ij} se calcularon después de estandarizar las variables a media cero y varianza 1. Con los valores estandarizados de r_{ij} se llevó a cabo un análisis de agrupamiento con el método Promedio de Grupo UPGMA (de sus singlas en inglés, *Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Averages*) con el programa NTSYS 2.21 (Rohlf, 2009).

3.2 Caracterización molecular

El material vegetal utilizado para el estudio con marcadores moleculares fue colectado en tres localidades del Estado de Durango, México (Figura 2) para lo cual se seleccionaron muestras de 57 individuos, es decir, 19 de cada grupo fenotípico detectado en un análisis morfológico previo (Torres-Morán 2009). La nomenclatura de los agaves indica su lugar de procedencia, siendo los Ag con número menor de 80, provenientes de la Sierra del Registro Municipio de Durango; los Ag con números de 200- 262 del Municipio de Nombre de Dios y los Ag con números entre 500 y 533 del Municipio de Mezquital. Las muestras consistieron en tejido foliar del cual posteriormente fue aislado el DNA por el método reportado por Keb-Llanes et al. (2002).

Se verificaron la concentración y la integridad del DNA por espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa al 1% respectivamente, según protocolos (Sambrook et al., 1989). Se realizaron diluciones de trabajo a concentración de 25 ng uL⁻¹ para la amplificación del marcador ISTR y concentraciones de 2.5 ng uL⁻¹ para la región ITS2.

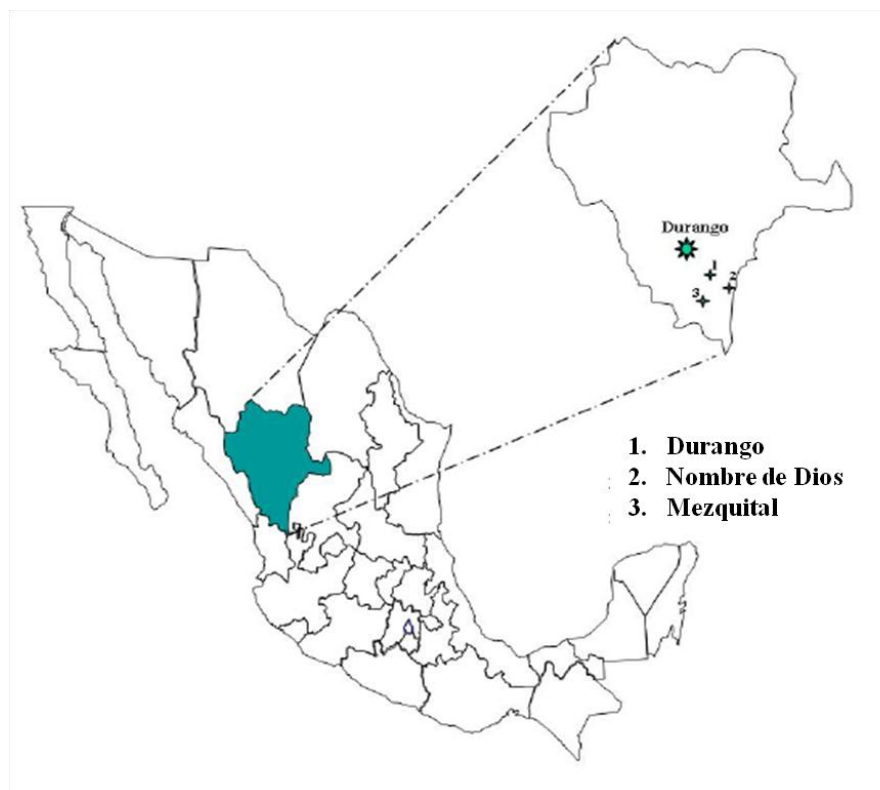


Figura 2. Ubicación de los municipios de muestreo para *A. durangensis*. 1. Durango, 2. Nombre de Dios y 3. Mezquital.

3.2.1 ISTR

Para el marcador ISTR se utilizaron cinco combinaciones de iniciadores (F10/B1, F10/B6, F4/B71, F51/B71 y F51/B101), tomadas de Rohde (1996) cuya secuencia se reporta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencias de los iniciadores ISTR utilizados en PCR

Iniciador	Forward
F10/	F5'-TAAGCAAGCATCTCGGAG-3'
F4/	F5'-TCCTACCACACCGTATGAG-3'
F51/	F5'-ATATATGGACTTAAGCAAGC-3'
	Reverse
B1	R5'-ATCAGGAAGGTCTGTAAAGC-3'
B6	R5'-GGTTCCACTTGGTCCTTAG-3'
B71	R5'-GGAATATCATTCCCAATAAG-3'
B101	R5'-GACCCTTTTGAAAACACATG-3'

Condiciones de amplificación

Para la amplificación del marcador ISTR se utilizó una reacción en un volumen final de 20µl con la siguiente composición de reactivos: amortiguador PCR 1X, 2.5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂), 0.5µM de cada iniciador, 0.2 mM de dNTPS, 1.25 U de Taq. Polimerasa de la marca Promega® y 2.5 ng de DNA. la reacción de PCR, se llevó a cabo en un termociclador Techne® flexigene. El programa de amplificación se describe en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programa para amplificación por PCR de los iniciadores ISTR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3	1
95°C	0.30	
45°C	1	40
72°C	2	
72°C	10	1
4°C	5	∞

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis vertical en geles de bisacrilamida (acrilamida y bisacrilamida) al 6%, y para su visualización se realizó una tinción con sales de plata de acuerdo protocolo reportado por Sanguinetti et al. (1994).

3.3 Análisis de correspondencia entre datos morfológicos y moleculares

Se realizó una prueba de Mantel que consiste en un análisis de correlación lineal entre dos matrices de proximidad, para este caso, se comparó la matriz de similitud de Jaccard obtenida con los datos moleculares de ISTR y la matriz de correlación de variables con marcadores morfológicos. La significancia estadística de esta asociación se mide por un procedimiento de asociación al azar en la que el orden de los elementos en una de estas matrices son permutados (Manly, 1997).

3.4 Validación de los grupos fenotípicos por ITS2

Para verificar que los grupos fenotípicos corresponden a una diferente categoría genética (sub-especie o diferente categoría taxonómica), se amplificó la región nuclear ITS2 utilizando seis individuos de *Agave durangensis* (dos de cada grupo detectado al inicio del trabajo) y como grupo de comparación se utilizó una muestra de *A. tequilana* y una de *A. americana*.

Para la amplificación se utilizaron los iniciadores universales ITS 3 y 4 descritos en el Cuadro 3 (White, et al., 1990). La reacción de PCR, se llevó a cabo en un volumen de 20 μ L utilizando un termociclador Techne® flexigene. Por reacción se utilizaron los siguientes reactivos: Amortiguador PCR 1X, 2.5 mM de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$), 0.5 μ M de cada iniciador, 0.2 mM de dNTPS, 1.25 U de Taq. Polimerasa de la marca Promega® y 2.5 ng de DNA. Para la amplificación de la zona conocida como ITS2 ubicada entre los genes 5.8s y 28S el programa de amplificación se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Secuencias de los iniciadores utilizados para amplificar la región ITS2.

Iniciador	Secuencia
ITS3	F 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
ITS4	R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

F= *Forward* y R= *Reverse*.

Cuadro 4. Programa para amplificación por PCR la región ITS2.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3	1
94°C	1	35
55°C	1	
72°C	1	
72°C	10	72
4°C	5	∞

3.4.1 Clonación para secuenciación

La selección de los individuos para el proceso de clonación se realizó con base en la agrupación obtenida por el marcador molecular ISTR, las 6 muestras seleccionadas se sometieron a un nuevo análisis de similitud (Figura 9) para verificar la formación de los tres grupos que se separan utilizando diferentes marcadores genéticos.

La región ITS2 amplificada por PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5% posteriormente, los fragmentos fueron recuperados del gel y purificados por medio del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). Posteriormente fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy (Promega®), utilizando células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (JM109), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células fueron transformadas fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina (100 µg/ µl), IPTG (0.1 M) y X-Gal (50 mg/mL). Para verificar la inserción del fragmento, se realizó una extracción de DNA plasmídico utilizando el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega®) y nuevamente se realizó una amplificación utilizando los iniciadores ITS3 y 4 y/o una digestión utilizando la enzima EcoRI. Los plásmidos extraídos que resultaron positivos fueron enviados a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

IV. Resultados y discusión

4.1 Caracterización molecular

Como resultado de la caracterización morfológica inicial se obtuvo en el análisis de agrupamiento, un dendrograma que asoció a los individuos muestreados en los tres grupos señalados en la Figura 3, lo cual comprueba lo anteriormente reportado por Torres-Morán (2009) y Almaraz-Abarca et al., 2009 y 2011.

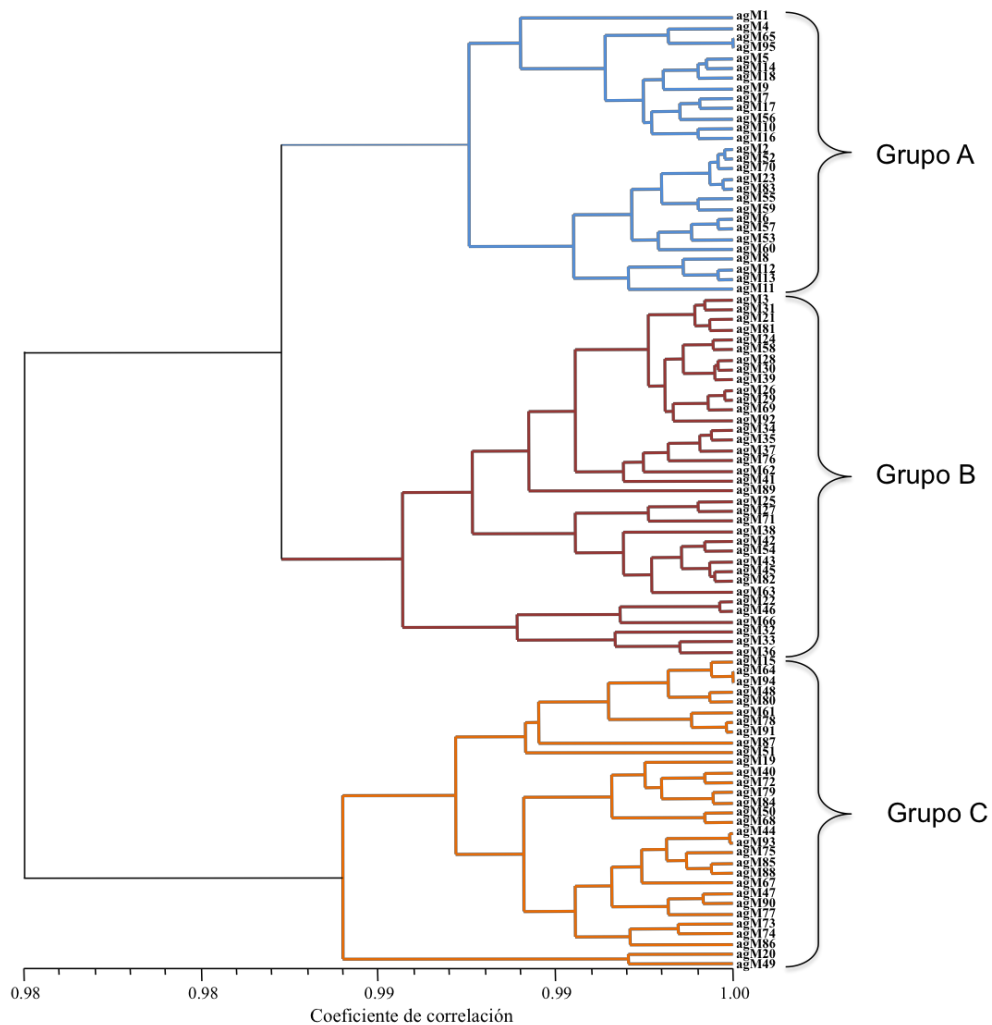


Figura 3. Dendrograma obtenido a partir de la matriz de correlación de datos morfológicos para 95 individuos de *Agave durangensis* colectados en la Sierra del Registro, Durango.

Posteriormente se realizó una selección de 19 individuos de cada grupo A, B y C identificados en el análisis de agrupamientos con datos morfológicos (Figura 4) para poder llevar a cabo la prueba de Mantel.

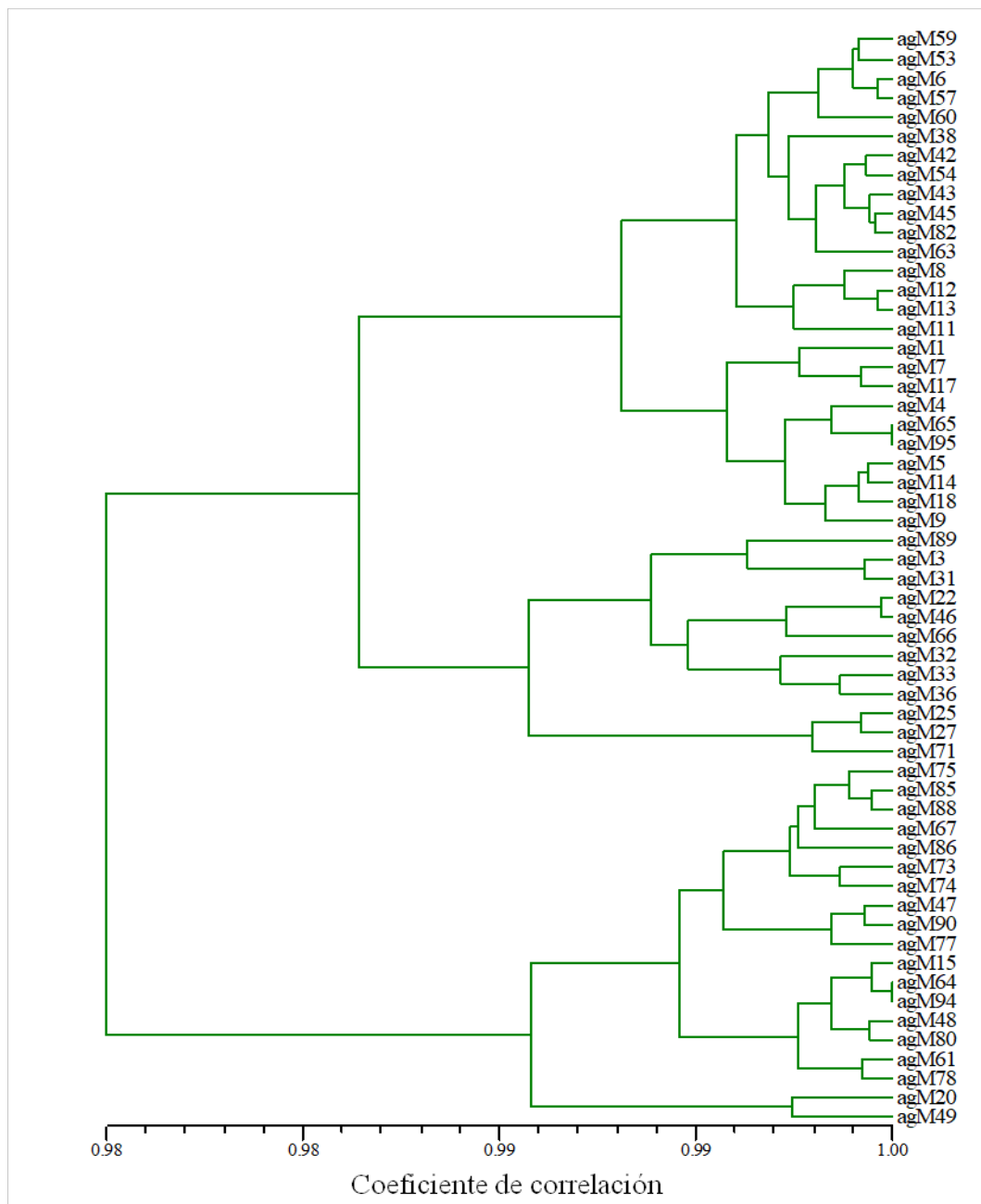


Figura 4. Análisis de agrupamiento de datos morfológicos de 57 individuos de *Agave durangensis* por el método UPGMA.

Dicha selección fue necesaria para posteriormente comparar con la matriz generada por los marcadores ISTR, ya que es necesario que las matrices que se comparan, tengan el mismo tamaño.

4.2 Caracterización molecular

Los iniciadores utilizados produjeron patrones de bandeo específicos para cada combinación. En la Figura 5 se muestra el patrón generado por la combinación F10/B1.

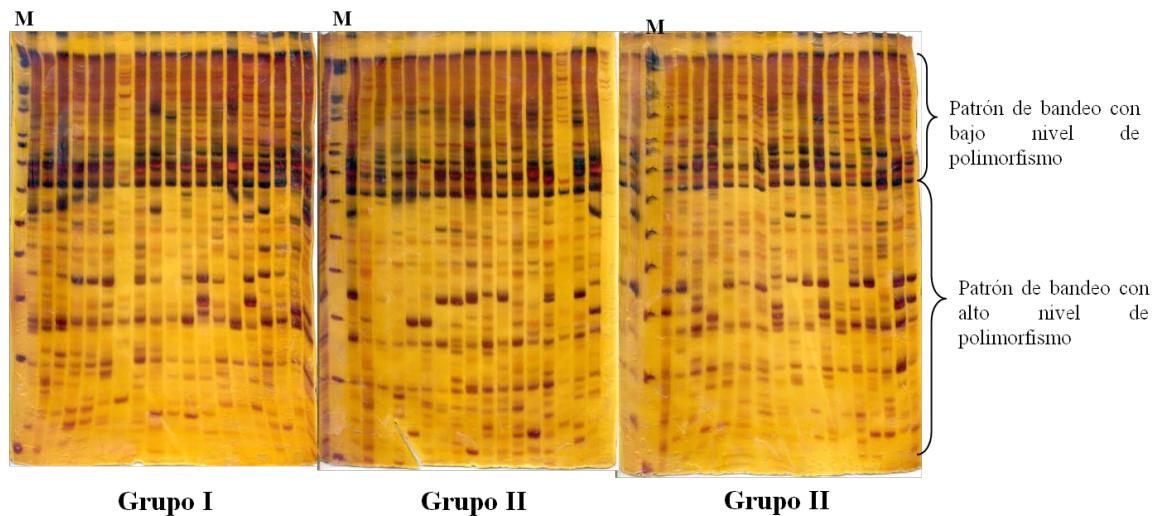


Figura 5. Patrón de amplificación en gel de poliacrilamida para ISTR con la combinación de iniciadores F10/B1 en individuos de *Agave durangensis* (M= marcador de peso molecular de 1kb).

Se llevó a cabo la determinación de loci polimórficos, tomando en cuenta el criterio reportado por Sosa (2003), cuando la frecuencia del alelo es igual o menor que 0.99, esto quiere decir que las bandas fueron consideradas polimórficas cuando éstas se encontraban presente en más del 1% o en menos de 99% de las muestras analizadas. El polimorfismo detectado para cada combinación de iniciadores se reporta en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Porcentaje de polimorfismo generado con cada combinación de iniciadores para el marcador ISTR para individuos de *Agave durangensis*.

Iniciadores	Total de bandas por iniciador	Bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
F10/B1	189	173	91.53
F10/B6	261	191	73.18
F4/B71	105	64	60.95
F51/B71	132	92	69.69
F51/B101	315	240	76.19
Total de bandas	1002	760	75.84

Los marcadores ISTR usados en el presente estudio detectaron altos niveles de polimorfismo en las muestras analizadas. Se tienen reportes de estos mismos marcadores en plantas del mismo género con los cuales se ha detectado también una alta tasa de polimorfismo. Tal es el caso del trabajo reportado en *A. tequilana* (Torres-Morán et al., 2013) en el que se encontró un nivel de polimorfismo del 94%. En la misma especie, se reportaron niveles del 100% de polimorfismo (Almaraz-Abarca et al., 2013).

El análisis de agrupamiento realizado con los datos moleculares, reveló la presencia de tres grupos (Figura 7), que se separan a un nivel de 0.20 del coeficiente de Jaccard y que presentan similitud hasta de 0.97 (Agaves Ag524 y Ag20). Este rango de similitud indica la gran variabilidad detectada en estos agaves.

Los resultados obtenidos con el marcador ISTR confirman los tres grupos encontrados a partir de caracteres morfológicos en el presente estudio, así como en los reportados previamente para esta misma especie.

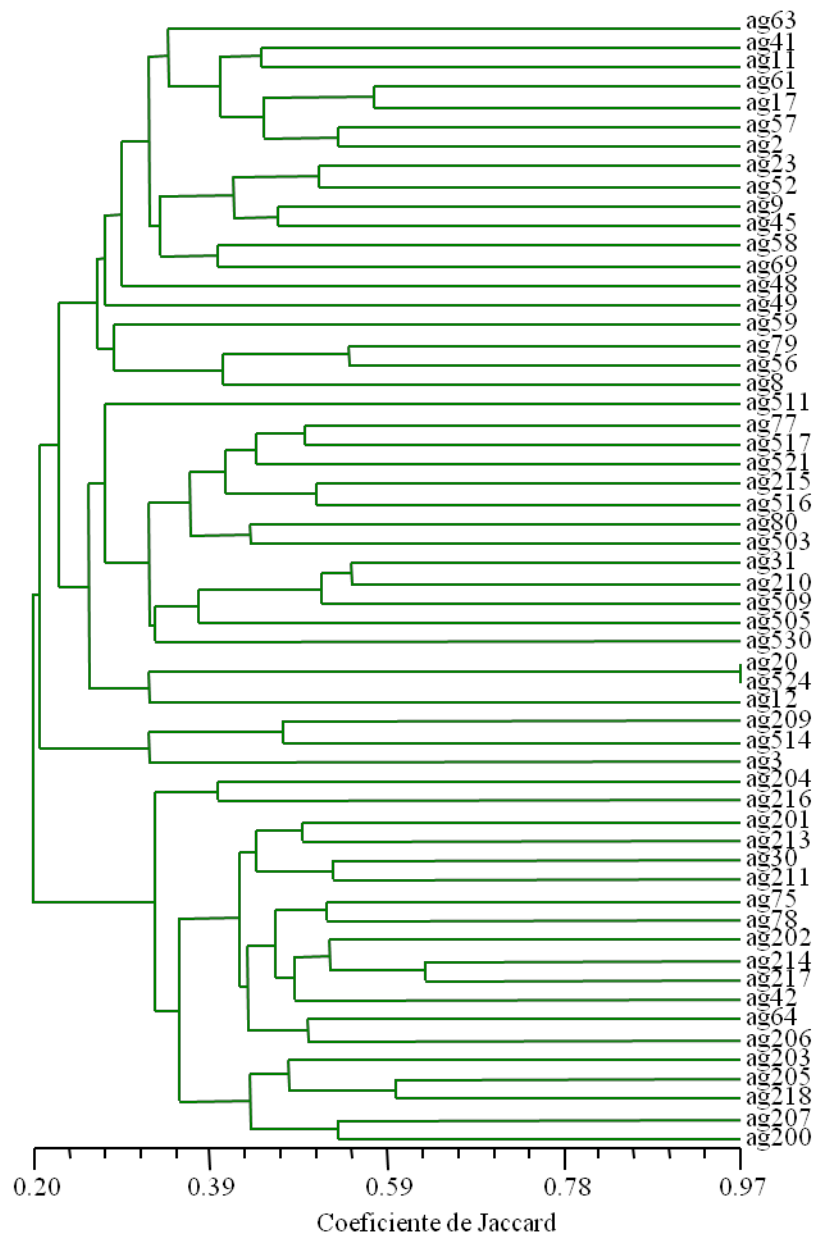


Figura 6. Dendrograma generado por el análisis de agrupamiento con datos del marcador molecular ISTR en 57 individuos de *Agave durangensis*. Se muestra la asociación de cada muestra a un grupo específico. Azul grupo I, Rojo Grupo II y Verde grupo III.

Los marcadores ISTR han demostrado tener éxito para detectar variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de *A. durangensis*. En la Figura 6 puede detectarse que el primer grupo (Azul) está formado principalmente por agaves que provienen de la localidad

tipo de la Sierra del Registro (Ag con nomenclatura menor a 80); sin embargo también pueden encontrarse agaves de esta misma localidad en los otros dos grupos, lo que comprueba la diferencia de fenotipos presentes en cada sitio de muestreo. Esta misma situación es reportada en el estudio de perfiles fenólicos en flores de la misma especie (Almaraz-Abarca et al. 2009 y Almaraz-Abarca et al. 2013). Los niveles de variabilidad genética observados en estas poblaciones de *A. durangensis*, permiten sugerir la existencia de tres estructuras genéticas definidas dentro de este taxón.

4.3 Análisis de correspondencia entre datos morfológicos y moleculares

En el caso del presente estudio la información obtenida con marcadores morfológicos, coincide en la detección de tres grupos dentro de *Agave durangensis*, por lo que la comparación de las matrices, juega un papel importante en la validación de esta información. En el Cuadro 6, se muestra una correlación positiva de 0.39 entre las matrices comparadas. Este valor relativamente bajo, se debe probablemente a que los individuos con los que se realizó la caracterización morfológica son diferentes a los que se utilizaron para la caracterización molecular. Los individuos utilizados en cada caracterización no fueron los mismos, debido a que en algunos casos los agaves fueron colectados por los productores de mezcal de la zona; sin embargo, los resultados indican un suficiente nivel de correlación en estos individuos.

La gráfica que se muestra en la Figura 7, permite comprobar visualmente la existencia de una correlación entre las distancias de las dos matrices.

Cuadro 6. Correlación para la comparación de las matrices de similitud y de correlación derivadas de marcadores morfológicos y marcadores moleculares ISTR respectivamente.

	ISTR	Datos morfológicos
ISTR	1	
Datos morfológicos	0.39977	1

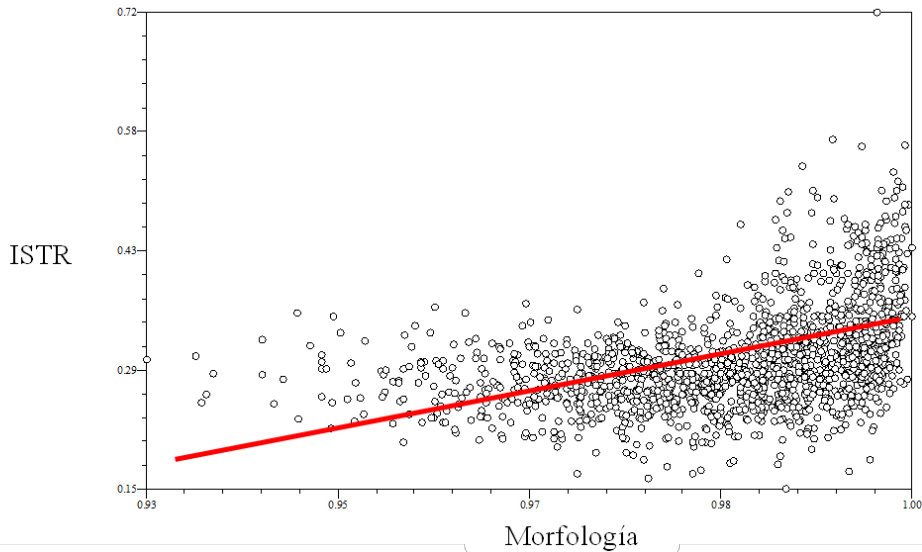


Figura 7. Comparación entre la matriz de similitud y de correlación derivadas de marcadores morfológicos y marcadores moleculares ISTR respectivamente.

La concordancia entre marcadores morfológicos y marcadores moleculares ha sido reportada en trabajos previos para especies del género *Agave*, las cuales han permitido definir los niveles de variabilidad que pueden encontrarse en este tipo de plantas. Entre los parámetros que se incluyen para estos estudios, se tienen en común medidas de altura y diámetro de planta, tamaño de hojas (largo y ancho), así como número de espinas. Esto ha sido reportado previamente por Rodríguez-Garay et al. (2009) para *A. tequilana* y *A. angustifolia* y por Avendaño-Arrazate et al. (2015) en *A. cupreata*. Así mismo, Torres-Morán et al. (2013) utilizaron parámetros morfológicos para diferenciar *A. tequilana* de las especies *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. salmiana*, y *A. maximiliana* quienes a su vez, utilizaron otro género de referencia en esta misma familia (*Furcraea* sp).

En todos estos reportes queda manifiesta la efectividad de los marcadores usados para detección de variabilidad genética. Por otra parte, *A. durangensis* es un taxón monocárpico que presenta un mecanismo de reproducción principalmente por semillas generadas por polinización cruzada, este puede ser uno de los factores que incrementa la variabilidad genética que existe en esta especie (Sosa, 2003; Almaraz-Abarca et al., 2013).

4.4 Validación de los grupos fenotípicos por ITS2

Previo a la validación se comprobó por medio de un análisis de similitud y agrupación, la formación de tres grupos en las muestras elegidas para el análisis de la secuencia de la región ITS2 (Figura 8).

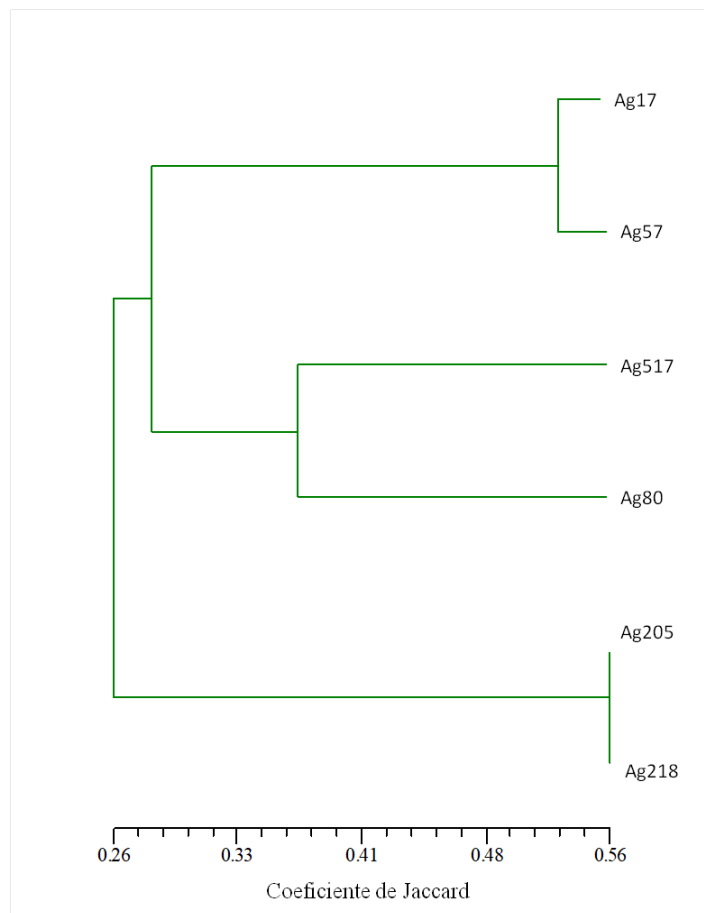


Figura 8. Comprobación de la separación en tres grupos, de las muestras de *A. durangensis* elegidas para secuenciación.

En las muestras seleccionadas de *Agave durangensis* se amplificó el fragmento esperado de 450 pb correspondiente a la región ITS2, de forma simultánea se procesaron muestras de *A. tequilana* y *A. americana*, con fines de comparación (Figura 9). Estos productos fueron clonados en el vector pGEM®-T Easy (Promega®), donde su inserción fue verificada por PCR (Figura 10A) o digestión con EcoRI. En perfil electroforético se pueden apreciar los fragmentos que corresponden al plásmido (3015pb) y al inserto (450pb) (Figura 10B).

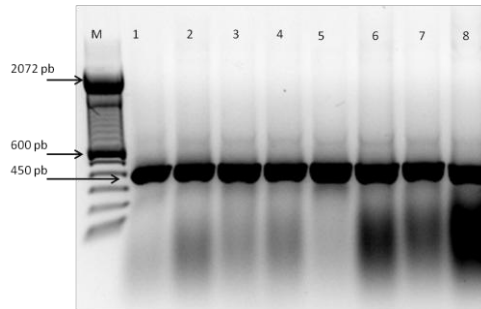


Figura 9. Gel de agarosa 1.5% amplificación del fragmento ITS2 (450 pb). Carriles del 1 – 6, *Agave durangensis*; carril 7, *A. tequilana*, carril 8, *A. americana*, M= marcador de peso molecular (100 pb)

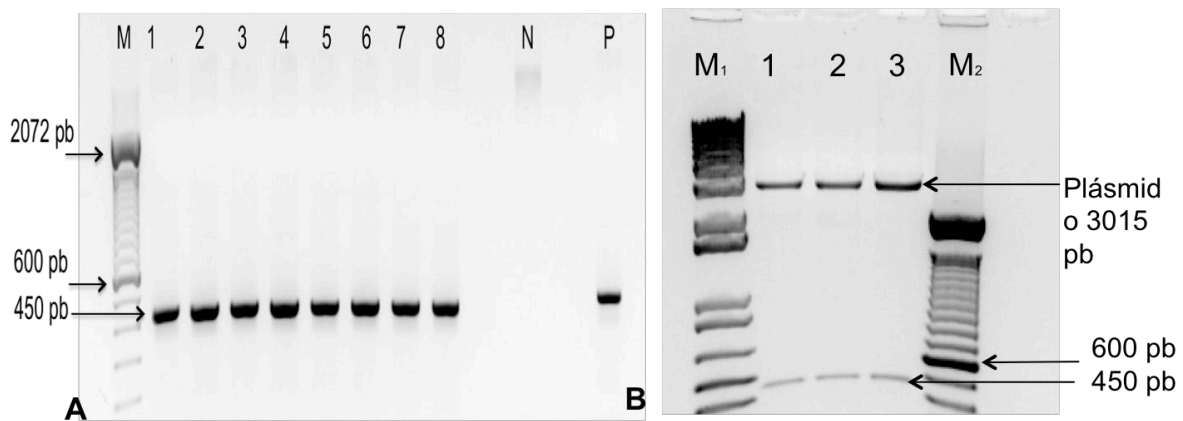


Figura 10. Confirmación de la inserción del producto de PCR en el plásmido pGEM®-T Easy. A) Electroforesis en agarosa al 1.5 % del producto de PCR amplificado a partir de ADN plásmidico. Carriles del 1 – 6, *Agave durangensis*; carril 7, *A. tequilana*, carril 8, *A. americana*, N= control negativo, P= control positivo y M= marcador de peso molecular de 100pb. B) Electroforesis en agarosa al 1.5% de la digestión del plásmido con EcoRI (Carril 1-3), M₁ = marcador de peso molecular de 1kb y M₂ = marcador de 100pb.

4.4.1 Análisis de las secuencias de la región ITS 2

Con los resultados de secuenciación se realizó un alineamiento y comparación de las secuencias utilizando el Software CLC Genomics®. Los resultados encontrados en el alineamiento de las secuencias de *Agave durangensis* y *A. tequilana* mostraron solo un nucleótido de diferencia en la muestra H2 (*Agave tequilana*) (Figura 11), esa diferencia fue suficiente para que el análisis filogenético separara a *Agave durangensis* de *A. tequilana*

(Figura 12). Puesto que se basa en un solo nucleótido de diferencia, esta separación no es relevante. Sin embargo, demuestra la capacidad de la región ITS2 para clasificar a nivel de especie.

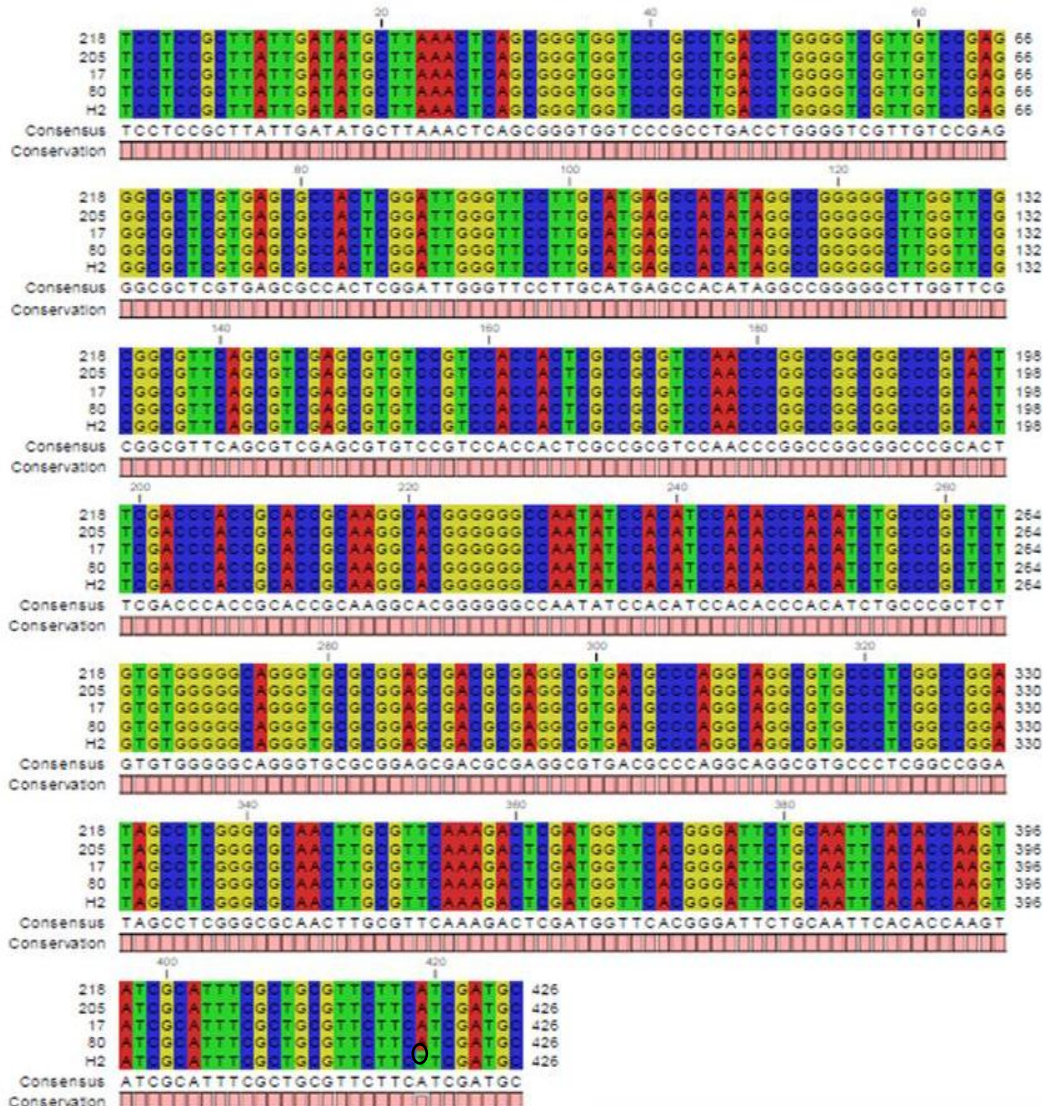


Figura 21. Alineamiento de las secuencias (426pb) de la región ITS 2 de *Agave durangensis* y *A. tequilana* Weber, donde se muestra la diferencia entre ambas especies.

La comparación de las secuencias ITS2 de *A. durangensis* con las reportadas en GeneBank (AM884828.1; AM884829.1 y AM884836.1), presenta altos porcentajes de identidad con *A. rhodacantha* (99%), *A. gentry* (99%) y *A. salmiana* (90%). Estos resultados corresponden con la semejanza fenotípica que comparte *A. durangensis* con estas especies. Debido a que no se observaron diferencias nucleotídicas en la región ITS2 entre las

muestras de *A. durangensis* sugiere que su poder de discriminación entre los fenotipos fue limitado, por lo tanto, se sugiere utilizar la región ITS completa en posteriores estudios, considerando que la región ITS1 presenta mayor variación (White, et al., 1990) y complementar con las regiones matK y rbcL de cloroplasto (Freudenstein et al., 2017).

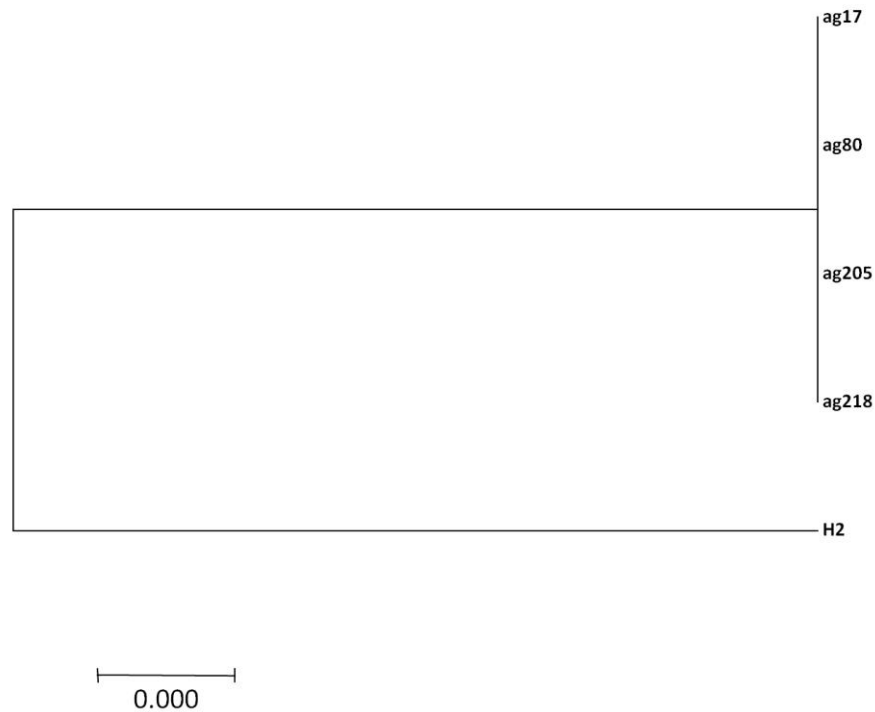


Figura 32. Dendrograma de las secuencias de DNA de *A. durangensis* y *A. tequilana* Weber, donde se muestra la relación de las muestras analizadas.

V Conclusiones

Los marcadores morfológicos y moleculares comprobaron la existencia de tres grupos dentro de *A. durangensis* del estado de Durango.

Se identificó una correspondencia entre datos morfológicos y datos moleculares detectados con el marcador ISTR.

Los marcadores ISTR permiten evaluar la variabilidad genética presente dentro de *Agave durangensis*.

La utilización de datos morfológicos y moleculares proporciona información que puede ser utilizada en estudios taxonómicos de delimitación de este grupo de agaves.

La región ITS2 permitió la discriminación específica dentro del género *Agave*, aún con una variación en una sola base nucleotídica.

La comparación de las secuencias nucleotídicas de la región ITS2 permitió relacionar a *Agave durangensis* con las especies *A. rhodacantha*, *A. gentry* y *A. salmiana*.

VI Literatura citada

- Almaraz-Abarca, N., E.A. Delgado-Alvarado, M.I. Torres-Morán, J. Herrera-Corral y J.N. Uribe-Soto. 2013. Genetic Variability in Natural Populations of *Agave durangensis* (Agavaceae) Revealed by Morphological and Molecular Traits. *The Southwestern Naturalist*. 58(3): 314-324.
- Almaraz-Abarca, N., E.A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J.A. Ávila-Reyes y R. Muñiz-Martínez. 2009. Profiling of phenolic compounds of somatic and reproductive tissues of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences*. 6: 1076-1085.
- Almaraz-Abarca, N., Hernández-Vargas, V., Torres-Morán, I., Delgado-Alvarado, A., OreaLara, G., Cifuentes-Díaz de León, A., Ávila-Reyes, J. A., Herrera-Corral, J., Uribe-Soto, N., Muñiz-Martínez, R., Naranho-Jiménez, N. 2011. *Agave durangensis*. Instituto Politécnico Nacional-CONACYT-COCYTED. México.APG III, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*.161:105–121
- Arias, D. 2016. Análisis del sistema Agroindustrial maguey-mezcal en el Estado de Oaxaca. Monografía Universidad Veracruzana. p.16.
- Armenise, L., M.C. Simeone, R. Piredda y B. Schirone. 2012. Validation of DNA barcoding as an efficient tool for taxon identification and detection of species diversity in Italian conifers. *European Journal of Forest Research*. 131: 1337–1353.
- Avendaño-Arrazate, G.H., L. Iracheta-Donjuan, J.C. Godínez-Aguilar, P. López-Gómez y A. Barrios-Ayala. 2015. Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *International Journal of Experimental Botany*. 84: 148-162.
- Bauer, N., T. Horvat, I.V. BirušVičić y V. Zoldoš. 2009. Nucleotide sequence, structural organization and length heterogeneity of ribosomal DNA intergenic spacer in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. *Molecular Genetics and Genomics*. pp 281:207–221.
- Bogler DJ, Pires JC, Francisco-Ortega J. 2006. Phylogeny of Agavaceae based on ndhF, rbcL and ITS sequences: implications of molecular data for classification. In: Columbus JT, Friar EA, Hamilton CW, Porter JM, Prince LM, Simpson MG eds. *Monocots: comparative biology and evolution*. Claremont, CA: Rancho Santa Ana Botanic Garden, 313–328.
- Castellanos-Hernández, O.A., R. Lépez-Ildefonso, G.E. Castellanos-Enríquez, A. Rodríguez-Sahagún y M.I. Torres-Morán. 2017. Relaciones genéticas basadas en marcadores ISTR entre formas silvestres, cultivadas e intermedias de frijol de guía colectado en Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana*. 118: 53-63
- Cássio, V.B., W.E. Higgins, R.L. Dressler, W.M. Whitten, M.A. Soto-Arenas y M.W. Chase. 2009. A phylogenetic study of Lealiinae (Orchidaceae) base don combined nuclear and plastid DNA sequence. *Annals of Botany* 104(3): pp 417-430.

- Cohen, S.N., A.C. Chang, H.W. Boyer y R.B. Helling. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 70(11): 3240-4.
- Chacón, J., S. Madriñán, M.W. Chase y J.J. Bruhl. 2006. Molecular phylogenetics of *Oreobolus* (Cyperaceae) and the origin and diversification of the American species. *Taxon*. 55: 359.
- Chávez-Ávila, V.M., y A. Martínez-Palacios. 1996. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad de México - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Proyecto No. B147. México, D.F.
- Dávila, M., M. Castillo y H. Laurentín. 2007. Uso de marcadores ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífica en *Agave*. *Revista Facultad Agronomía (Maracay)*. 33: 93-111.
- 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*. *Plan Molecular Biology Reporter*. 22: 29-35.
- Dunning, L.T. y V. Savolainen. 2010. Broad-scale amplification of matK for DNA barcoding plants, a technical note. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1(164): 1-9.
- Eguiarte, L., E. Aguirre-Planter, X. Aguirre, R. Colín, A. González, M. Rocha, E. Scheinvar, L. Trejo y V. Souza. 2013. From Isozymes to Genomics: Population Genetics and Conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review*. 79:483–506.
- Fernández-Mazuecos, M. J.L. Blanco-Pastor y P. Vargas. 2013. A phylogeny of Toadflaxes (*Linaria* mill.) based on nuclear internal transcribed spacer sequences: systematic and evolutionary consequences. *International Journal of Plant Sciences* 174(2). Pp 234-249.
- Flores-Maya, S., J.C. Moreno-Ramírez, S. Romero-Rangel y C. Rojas-Centeno. 2010. Análisis morfológico y cariológico de *Agave karwinskii* ZUCC. Y *Agave macroacantha* ZUCC. En el municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla. *BIOCYT*. 3(11). Pp181-196.
- Freudenstein, J.V., M.B. Broe y B.T. Sinn. 2017. Biodiversity and the Species Concept- Lineages Are Not Enough. *Systematic Biology*. 66(4): 644-656.
- García-Mendoza, A., y R. Galván. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56: 7-24.
- Gentry H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. 669.
- Godoy-Díaz, G.C. y H.G. Núñez-Palenius. 20015. Micropropagación de *Agave durangensis* en un sistema de inmersión temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*. 1(2): 60-65.

- Good-Ávila, S.V., V. Souza, B.S. Gaut y L.E. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 103: 9124-9129.
- Graham, S.W., J.M. Zgurski, M.C. McPherson. 2006. Robust inference of monocot deep phylogeny using an expanded multigene plastid data set. In: Columbus JT, Friar EA, Hamilton CW, Porter JM, Prince LM, Simpson MG, editors. *Monocots: comparative biology and evolution*. Claremont, CA: Rancho Santa Ana Botanic Garden; pp. 3–21.
- Hebert. P.D., A. Cywinska, S.L. Ball y J.R. deWaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society.* 270: 213-321.
- Hillis, D.M. y S.K. Davies. 1988 Ribosomal DNA: intraespecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction, *Systematic Zoology.* 37(1): pp.63-66.
- Hollingsworth, M.L., A.A. Clark, L.L. Forrest, J. Richardson, R.T. Pennington, D.G. Long, R. Cowan, M.W. Chase, M. Gaudeul y P. Hollingsworth. 2009. Selecting barcoding loci for plants: Evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources.* 9: 439–457.
- Hollingsworth, P.M., S.W. Graham y D.P. Little. 2011. Choosung and Using a Plant DNA Barcode. *Plos One.* 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
- Hoyos, R., S. Uribe y I. Velez. 2012a. Typification of Colombian specimens of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: *Psychodidae*) by “Barcoding”. *Revista Colombiana de Entomología* 38: 134-140.
- Hutchinson, J. 1936. *The Families of flowering plants: Arranged according to a new system base don their probable phylogeny.* Macmillan and co. pp 79.
- IMPI. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. 1991. *Ley de Propiedad Industrial.* Diario Oficial de la Federación, 27 junio.
- Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverría y M. Keb-Llanes, 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science.* 164: 223-230.
- Infante, D., S. Molina, J. Demey y E. Gámez. 2006. Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequence-tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reporter.* 24: 205-217.
- Jazen, D.H. 2009. *A DNA barcode for land plants.* University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, *PNAS.* 106(31): 12794-97.
- Jobes, D. y L. Thien. 1997. A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene in useful diagnostic marker for plant Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. *Plant Molecular Biology Reporter.* 15: 326–334.
- Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero y D. Infante. 2002. A rapid an simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plan Molecular Biology Reportes.* 20: 299.

- Kim, J.H. D.K. Kim, F. Forest, M.F. Fay y M.W. Chase. 2010. Molecular phylogenetics of Ruscaceae sensu lato and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany*. 106(5): pp. 775-790.
- Kress, W.J. y D.L. Erickson. 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLOS ONE*. 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Levin, R.A., J. Watson y L. Bohs. 2005. A four-gene study of evolutionary relationships in *Solanum* section *Acanthophora*. *American Journal of Botany* 92: 603-612.
- Li, D.Z., L.M. Gao, H.T. Li, H. Wang, X.J. Ge, J.Q. Liu, Z.D. Chen, S.L. Zhou, S.L. Chen, J.B. Yang, C.X. Fu, C.X. Zeng, H.F. Yan, Y.J. Zhu, Y.S. Sun, S.Y. Chen, L. Zhao, K. Wang, T. Yang y G.W. Duan. 2011. China Plant BOL Group. 49(108): 19641-19646.
- Manly, B.F.J. 1997. *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*, 2nd end. London: Chapman & Hall.
- Montalvo, G., M. Ortíz, E. Quiala, M. Keb-Llanes, L.M. Rojas, M. Bautista, M. Esquivel, A. Quiroz, W. Rohde y L.F. Sánchez. 2010. Primer reporte del empleo de marcadores ISTR en Cactaceae (*Pilosocereus* sp). *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(2): 223-229.
- Nieto-Feliner, G. y J. Rosselló. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (44): 911–919.
- Olivas, E., J.R. Valdez, A. Aldrete, M.J. González y G. Vera. 2007. Áreas con aptitudes para establecer plantaciones de maguey cenizo: Definición mediante análisis multicriterio y SIG. *Revista de fitotecnia mexicana*. 30(4): 411-419.
- Parra, J.G. 2015. Variación genética y diferenciación en poblaciones de *Agave kerchovae* Lem. Usando marcadores de cloroplasto. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Tesis. Ciudad de México.
- Pires, J.C., I.J. Maureira, T.J. Givnish. 2006. Phylogeny, genome size, and chromosome evolution of Asparagales. In: Columbus JT, Friar EA, Hamilton CW, Porter JM, Prince LM, Simpson MG, editors. *Monocots: comparative biology and evolution*. Claremont, CA: Rancho Santa Ana Botanic Garden. pp. 287–304.
- Quijada, A. 1996. La región de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) del DNA Ribosomal del Núcleo (nrDNA): Detección de Hibridación y Variación Intraespecífica en Pinos. Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México. pp61.
- Rivera, C. J., 1983. Estudio citogenético y fitogeográfico de *Agave* aff. *tequilana* y *A. karwinskii* en los valles de Tehuacán, Puebla y centrales de Oaxaca. 218 p. (Tesis profesional, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México).
- Rocha, M., S. Good-Avila, F. Molina-Freaner, H.T. Arita, M. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B.S. Gaut, V. Souza y L.E. Eguiarte. 2006. Pollination biology

- and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 329-344.
- Rodríguez-Arevalo, I., E. Mattana, L. García, U. Liu, R. Lira, P. Davila, A. Hudson, H.W. Pritchard y T. Ulian. 2016. Conserving seeds of useful wild plants in Mexico: main issues and recomendations. *Genetics Resources and Crop Evolution* 64-66: 1141-1190.
- Rodríguez-Garay, B., J.A. Lomelí-Sención, E. Tapia-Campos, A. Gutiérrez-Mora, J. García-Galindo, J.M. Rodríguez-Domínguez, D. López-Urbina e I. Vicente Ramírez. 2009. Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. *Cultivos y Productos industriales* 29: 220-228
- Rohde, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetics and Plant Breeding*. 50: 249-261.
- Rohlf, F.J. 2009. NTSYS-pc. Numerical taxonomy system. ver. 2.21 c. Exeter Software. Setauket, New York.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, van der Mark P. 2005. MrBayes 3.1 Manual. <http://mrbayes.csit.fsu.edu/manual.php>. Consultado 01/11/2017.
- Rosas-Médina, I., A. Colmenero-Robles., N. Naranjo-Jímenez y J.H. Rodríguez-García. 2013. El mezcal de Durango, México. *Vidsupra* 5(2): pp 113-117.
- Rosas, J.C. 2005. Variabilidad genética de *Agave marmorata* ROEZL. en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Evaluación de efectos de manejo. Tesis, Universidad Nacional Autónoma, Ciudad de México. pp58.
- Sanguinetti, C.J., E. Díaz Nieto y A.J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques*. 17: 14-21.
- Salazar, G.A., L.I. Cabrera, S. Madriñan y M.W. Chase. 2009. Phylogenetic relationship of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany*. 104: 403-416.
- Sambrook, D.J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol.1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Singh, G. 2010. *Plant Systematics and integrate approach*. Sience Publisher, 3^a. ed. Jersey USA. pp 558.
- Shaw, J., B. Lickey, J. Beck, S. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. Siripun, C. Winder, E. Schilling y R. Small. 2005. The tortoise and the hare II: relative of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142–166.
- Song, J. L. Shi, D. Li, Y. Sun, Y. Niu, Z. Chen, H. Lou, X. Pang, Z. Sun, C. Liu, A. Lv, Y. Deng, Z. Larson-Rabin, M. Wilkinson y S. Chen. 2012. Extensive pyrissequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *PLoS One* 7(8): e43971.

- Sosa, P. 2003. Conservación genética de endemismos vegetales amenazados de las Islas Canarias. Proyecto de Investigación. Inédito. Universidad de Las Palmas Gran Canaria.
- Torres-Morán, M.I. 2009. Caracterización molecular del complejo *Agave durangensis* por medio de marcadores ISTR. Tesis doctorado. Instituto Politécnico Nacional, Durango, México. 83.
- Torres-Morán, M.I., N. Almaraz-Abarca, A. P. Velazco-Ramírez, V. Hernández-Vargas, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, C. Oliver-Salvador. 2008. Taxonomic Significance of ISTR to Discriminate Species In Agavaceae. American Journal of Agricultural and Biological Sciences Vol. 3(4): pp. 661-665.
- Torres-Morán, M.I., M. Escoto-Delgadillo, S. Molina-Moret, D.M. Rivera-Rodríguez, A.P. Velasco-Ramírez, D. Infante y L. Portillo. 2010. Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 103: 403–409.
- Torres-Morán, M.I., N. Almaraz-Abarca y M. Escoto-Delgadillo. 2012. Review Article: ISTR, a Retrotransposons-Based Marker to Assess Plant Genome Variability with Special Emphasis in the Genera *Zea* and *Agave*. American Journal of Plant Sciences. 3: 1820-1826.
- Torres-Morán, M.I., A.P. Velasco-Ramírez, S.A. Hurtado-de la Peña, A. Rodríguez-García y S. Mena-Munguía. 2013. Variability and genetic structure in a commercial field of tequila plants *Agave tequilana* Weber (Agavaceae). American Journal of Agricultural and Biological Science. 8(1): 44-53.
- Vargas, A.M. 2009. Estudio de la variabilidad genética intra e interpoblacional de *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae) por medio de marcadores moleculares ISTR. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Durango, México.
- Valenzuela-Ruiz, J.F., O.H. Velasco y M.A. Marcos. 2003. Desarrollo Sustentable de Agave Mezcalero en Durango. CIIDIR . Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango – Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 171. Nombre de Dios, Durango.
- Venturi S. 2006. Retrotransposns, the Most Commune Class of Transposable Elements in Eukaryotis. Display a High Degree of Heterogeneity and Insetional Polymorphism, Both Withing and Betwen Species. Theorical and Applied Genetic 112: 440-444.
- Verduzco-Martínez, J., C.I. Prado-Rojas y R. Mercado-Hernández. 2009. Caracterización e identificación taxonómica del maguey. Memorias del VII Simposium-Taller Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México. Revista Salud Pública y Nutrición 2: 75-90.
- White, T.J., T.D. Bruns, S.B. Lee y J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to methods and applications. (M. Innis, D. Gelfeand, j. Sninsky, y T. White, Eds.) Academic Press: 315 - 322.

Yao, H., J. Song, C. Liu, K. Luo, J. Han, Y. Li, X. Pang, X. Hongxi, Z. Yingjie, X. Peigen y C. Shilin. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. Plos One. 5(10): e 13102.

VII Anexos

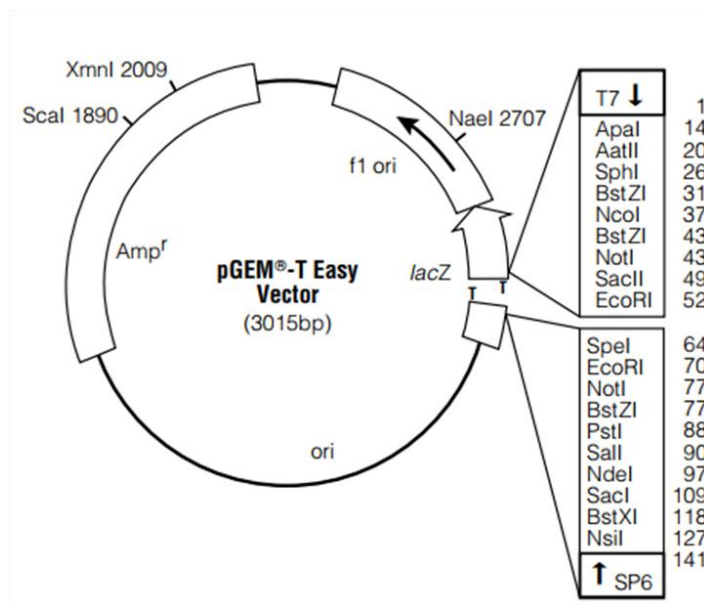


Figura 1. Diagrama del vector de clonación pGEM Promega ®

Protocolo de clonación

Ligación con tampón de ligación rápida 2X

1. Centrifugue brevemente el vector pGEM®-T Easy Vector en tubos de ADN para recoger el contenido del fondo del tubo.
2. Prepare las reacciones de ligación como se describe a continuación. Realizar una agitación en vortex al tampón de ligadura rápida 2X vigorosamente antes de cada uso. Use tubos de 0,5 mL que se sabe tienen baja capacidad de unión al ADN.

Reactivos	Reacción estándar	Control Positivo	Control negativo
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5µl	5µl	5µl
pGEM®-T or pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1µl	1µl	1µl
PCR product	Xµl	-	-
Control Insert DNA	-	2µl	-
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1µl	1µl	1µl

Deionized water to a final volume of	10µl	10µl	10µl
---	------	------	------

3. Mezcle las reacciones pipeteando. Incubar las reacciones 1 hora a temperatura ambiente. Alternativamente, incube las reacciones durante la noche a 4 ° C para el número máximo de transformantes.

Transformación de células competentes de alta eficiencia JM109

1. Prepare placas LB / ampicilina / IPTG / X-Gal.
2. Centrifugue brevemente las reacciones de ligación. Agregue 2µl de cada reacción de ligadura a un tubo estéril de 1.5 mL en hielo. Prepare un tubo de control con 0.1 ng de plásmido sin cortar.
3. Coloque las células competentes de alta eficiencia JM109 en un baño de hielo hasta que solo descongelado (5 minutos). Mezcle las celdas moviendo suavemente el tubo.
4. Transfiera cuidadosamente 50µl de células a los tubos de reacción de ligadura del Paso 2.
5. Use 100µl de células para el tubo de control de ADN sin cortar. Agite los tubos suavemente e incube en hielo durante 20 minutos.
6. Caliente las células durante 45-50 segundos en un baño de agua a exactamente 42 ° C. NO SACUDIR. Inmediatamente devuelva los tubos al hielo durante 2 minutos.
7. Agregue 950 µl de medio SOC a temperatura ambiente a las transformaciones de la reacción de ligadura y 900 µl al tubo de control de ADN sin cortar. Incubar durante 1,5 horas a 37 ° C con agitación (~ 150rpm).

8. Platee 100 µl de cada cultivo de transformación en placas duplicadas de LB / ampicilina / IPTG / X-Gal. Para el control de ADN no cortado, se recomienda una dilución de 1:10 con SOC.
9. Incube las placas durante la noche a 37 ° C. Seleccione colonias blancas.

Protocolo extracción de ADN de Plásmido

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Protocolo de centrifugación

Lisis y purificación

1. Centrifugar el Pellet 1-10 mL de cultivo bacteriano en medio líquido durante 5 minutos.
2. Resuspender completamente el sedimento con 250 µl de solución de resuspensión celular.
3. Agregue 250µl de solución de lisis celular a cada muestra; invierta 4 veces para mezclar.
4. Agregue 10µl de solución de proteasa alcalina; invierta 4 veces para mezclar. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregue 350µl de solución de neutralización; invierta 4 veces para mezclar.
6. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Separación del DNA plasmídico

7. Inserte la columna de centrifugado en el tubo de recolección.

8. Decante limpia el lisado en columna de centrifugado.
9. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente. Deseche el flujo y vuelva a insertar la columna en el tubo de recogida.

Lavado

10. Agregue 750µl de solución de lavado (etanol añadido). Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto. Deseche el flujo de entrada y vuelva a insertar la columna en el tubo de recolección.
11. Repita el paso 10 con 250µl de solución de lavado.
12. Centrifugar a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Elución

13. Transfiera la Columna de Giro a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL, teniendo cuidado de no transferir restos de la solución de lavado de la columna el tubo estéril de centrifugado. Si la columna tiene solución de lavado, centrifuga 1 minuto a velocidad máxima, luego transfiera la columna de centrifugado a un nuevo tubo de microcentrifuga estéril de 1.5mL.
14. Agregue 100µl de agua sin nucleasas a la columna de centrifugado. Centrifuga en la parte superior a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Deseche la columna y almacene ADN a -20 ° C o menos.