



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD DURANGO**

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA
INTRA E INTERPOBLACIONAL DE
Agave durangensis Gentry (Agavaceae)
POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES ISTR**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN GESTIÓN AMBIENTAL

PRESENTA

ARIADNA MAYELA VARGAS ARREOLA

DIRECTORA

DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA



Victoria de Durango, Dgo. Septiembre de 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 10 de Junio del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 12 del mes de mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

VARGAS
Apellido paterno

ARREOLA
Apellido materno

ARIADNA MAYELA
Nombre(s)

Con registro: B 0 7 1 2 6 9

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"ESTUDIO DE VARIABILIDAD GENÉTICA INTRA E INTERPOBLACIONAL DE *Agave durangensis* Gentry (*Agavaceae*) POR MEDIO DE MARCADORES MOLECULARES ISTR"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

El estudio de la distribución de secuencias ISTR en dos poblaciones naturales de *Agave durangensis* y *Agave asperima* y la determinación del valor taxonómico específico de los perfiles ISTR

2.- Se designa como Director de Tesis al C. Profesor:
Dra. Norma Almaraz Abarca

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

El Director de Tesis

Dra. Norma Almaraz Abarca

El Aspirante

Vargas Arreola Ariadna Mayela

El Presidente del Colegio



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 13:00 horas del día 24 del mes de Agosto del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR IPN Durango para examinar la tesis de titulada:

"Estudio de la Variabilidad Genética intra e interpoblacional de *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae) por medio de los marcadores moleculares ISTR

Presentada por el alumno:

VARGAS

ARREOLA

ARIADNA MAYELA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	2	6	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dra. Martha González Elizondo

Dra. Gabriela Barragán Valencia

M. en C. Néstor Naranjo Jiménez

M. en C. Eli Amanda Delgado Alavarado

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. José B. Ríos Nájera



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
 DE INVESTIGACION PARA EL
 DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
 UNIDAD DURANGO



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día **24** del mes **AGOSTO** del año 2009, el (la) que suscribe **VARGAS ARREOLA ARIADNA MAYELA** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL** con número de registro **B071269**, adscrito a **CIIDIR IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de **DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Estudio de variabilidad genética intra e interpoblacional de *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae) por medio de marcadores moleculares ISTR**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **lucas_ariadna@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

VARGAS ARREOLA ARIADNA MAYELA

Nombre y firma

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, UNIDAD DURANGO, CON LA DIRECCIÓN DE LA DOCTORA NORMA ALMARAZ ABARCA Y FUE DERIVADO DEL PROYECTO “EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL COMPLEJO *Agave durangensis* PARA SU CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO SOSTENIBLE EN EL ESTADO DE DURANGO” (CLAVE SIP 20090709), EL CUAL TUVO UN APOYO DEL CONACYT (CB-2006-1-60664).

DEDICATORIA:

A mi madre celestial, Cristina, aunque la vida no le dio la oportunidad de estar conmigo en este momento gracias por todas sus bendiciones.

A mi padre, Gerardo, por su apoyo incondicional, gracias padre por confiar en mis decisiones, y aunque en ocasiones no fueron las mejores igual permaneciste a mi lado.

A mi madre terrenal, amiga y compañera de desvelos, Cristina, todo mi amor y agradecimiento infinito por todo tu apoyo.

A mis hijas, Itzel e Idaly, gracias princesas por soportar todos mis desvelos y alejamientos, por soportar mis ausencias que en pro de mi sueño sufrieron. Las amo.

Ismael mi compañero incansable de desvelos y aventuras.

A mis compañeros y amigos Evelyn, Alicia, Paula, Ma. Engracia, Samuel, Daniel, Eduardo, Margarita y Jorge; fue un honor coincidir en esta etapa de mi vida con ustedes, gracias por todo su apoyo. Lo logramos compañeros!!!

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al CIIDIR-IPN por permitirme continuar con mi sueño, a sus maestros por mostrarme nuevos caminos, nuevas enseñanzas dentro del mundo de la ciencia.

M.C. Antonio Ávila, gracias por mostrarme el lado más importante de la ciencia “el lado humano”.

A mi comité, Dra. Martha González Elizondo, M.C. Néstor Naranjo Jiménez y M.C. Elí Amanda Delgado Alvarado; mil gracias por su asesoría y contribución al progreso de este trabajo.

A la Dra. Gabriela Barraquán Valencia. Y demás personal del laboratorio de biotecnología del centro, por su apoyo en el desarrollo experimental.

A él M.C. Jesús Herrera Corral, por su grandiosa colaboración en la revisión de este documento.

A la M.C. Noelia Rivero Quintero por su apoyo en el trámite de presentación de grado.

Pero muy especialmente quiero darle las gracias a la directora de esta tesis, la Dra. Norma Almaraz, por su paciencia, por sus lecciones de vida, por sus enseñanzas, pero sobre todo por permitirme caminar a su lado durante esta etapa, su cobijo fue vital durante mi estancia en el centro.

Gracias Doctora.

ÍNDICE

	Página
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	I
RELACIÓN DE TABLAS	II
RELACIÓN DE FIGURAS	III
RELACIÓN DE ANEXOS	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 EL GÈNERO <i>Agave</i>	3
2.1.1 ETNOBIOLOGÍA DEL GÈNERO <i>Agave</i>	3
2.1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DEL GÈNERO <i>Agave</i>	4
2.1.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y TAXONÓMICOS DE <i>Agave durangensis</i>	6
2.2 MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDIOS TAXONÓMICOS Y DE VARIABILIDAD	7
2.2.1 TEORÍA CELULAR	7
2.2.2 EL MATERIAL GENÉTICO	8
2.2.3 TEORIA DE LA EVOLUCIÓN	8
2.2.4 MARCADORES GENÉTICOS	9
2.2.4.1 MARCADORES MORFOLÓGICOS	9
2.2.4.2 MARCADORES CITOGENÉTICOS	10
2.2.4.3 MARCADORES QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS	10
2.2.4.4 MARCADORES MOLECULARES	10
2.2.5 ELEMENTOS MÓVILES O TRASNPOSONES	12
2.2.5.1 TIPOS DE TRANSPOSONES	14
2.2.5.2 TIPOS DE TRANSPOSICIÓN	14
2.2.5.3 RETROTRANSPOSONES	15
2.2.6 MARCADORES MOLECULARES BASADOS EN ELEMENTOS MÓVILES DEL GENOMA	16
2.2.7 RETROTRANSPOSONES COMO FUENTE DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	17
2.2.8 UTILIDAD TAXONÓMICA DE LOS RETROTRANSPOSONES (ISTR)	18
III JUSTIFICACIÓN	19
IV OBJETIVO	19
V METODOLOGÍA	20
5.1 DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO	20
5.1.1 MUNICIPIO DE DURANGO	20
5.1.1.1 SIERRA DEL REGISTRO	20
5.1.2 MUNICIPIO DE NOMBRE DE DIOS	21
5.1.2.1 EL CARRIZAL	21
5.1.3 MUNICIPIO DE CUENCAMÉ	21

5.1.3.1	LAS MERCEDES	22
5.2	COLECTA DE MUESTRAS	22
5.2.1	EL CARRIZAL NOMBRE DE DIOS	23
5.2.2	SIERRA DE REGISTRO, DURANGO	24
5.2.3	LAS MERCEDES, CUENCAMÉ	25
5.3	EXTRACCIÓN DE ADN	26
5.3.1	CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PUREZA DEL ADN POR ESPECTROMETRÍA UV	27
5.3.2	APRECIACION DE LA INTEGRIDAD Y TAMAÑO MOLECULAR DEL ADN	28
5.3.3	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS ISTR POR PCR	28
5.3.3.1	PREPARACIÓN DE MEZCLAS DE AMPLIFICACIÓN	29
5.3.3.2	AMPLIFICACIÓN POR PCR	30
5.3.4	SEPARACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LOS FRAGMENTOS ISTR AMPLIFICADOS	30
5.4	ANÁLISIS NUMÉRICO	31
VI	RESULTADOS	32
6.1	CUANTIFICACIÓN DE PUREZA DEL ADN OBTENIDO	32
6.2	APRECIACION DEL TAMAÑO MOLECULAR E INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE ADN	40
6.3	PERFILES ELECTROFORETICOS DE AMPLIFICACION	42
6.4	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO Y VARIABILIDAD	53
VII	DISCUSIÓN	57
7.1	CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL ADN OBTENIDO	57
7.2	TAMAÑO MOLECULAR E INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE ADN	58
7.3	PERFILES ISTR	59
7.4	CAPACIDAD DE LOS MARCADORES ISTR PARA DETECTAR VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL E INTERPOBLACIONAL Y PARA DISCRIMINAR ENTRE POBLACIONES Y ESPECIES DE <i>Agave</i>	61
VIII	CONCLUSIONES	66
IX	SUGERENCIAS	67
X	BIBLIOGRAFÍA	68

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ISTR	Inverse Sequence Tagged Repeat o Repeticiones Marcadas de Secuencias Inversas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A	Adenina
G	Guanina
T	Timina
C	Citosina
LTR	Long Terminal Repeat
LINES	Long Interspersed Elements
SINES	Short Interspersed Elements
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide o Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio o Bromuro de Cetiltrimetilamonio
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
NaCl	Cloruro de Sodio
PVP	Polivinilpirrolidona
TE	Tris Base, EDTA
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RPM	Revoluciones por minuto
V	Volúmenes
°C	Grados centígrados
Dd	Didestilada
Ad	<i>Agave durangensis</i>
Aa	<i>Agave asperrima</i>

RELACIÓN DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Distribución ecológica del género <i>Agave</i> en México	4
Tabla 2. Distribución altitudinal del género <i>Agave</i> en México	5
Tabla 3. Composición del Buffer A	27
Tabla 4. Composición del Buffer B	27
Tabla 5. Composición de la mezcla de amplificación de fragmentos ISTR por PCR	29
Tabla 6. Secuencia del par de iniciadores	29
Tabla 7. Condiciones de amplificación para fragmentos ISTR por PCR.	30
Tabla 8. Relación de los valores de absorbancia a 260 nm, 240 nm, y 280 nm; y de las estimaciones de concentración y pureza para cada uno de los individuos de la población natural de <i>Agave durangensis</i> de El Carrizal, Nombre de Dios, Durango	33
Tabla 9. Relación de los valores de absorbancia a 260 nm, 240 nm, y 280 nm; y de las estimaciones de concentración y pureza para cada uno de los individuos de la población natural de <i>Agave durangensis</i> de Sierra de Registro, Durango, Durango.	34
Tabla 10. Relación de los valores de absorbancia a 260 nm, 240 nm, y 280 nm; y de las estimaciones de concentración y pureza para cada uno de los individuos de la población natural de <i>Agave asperrima</i> de Las Mercedes, Cuencamé, Durango	35
Tabla 11. Estimaciones promedio de la pureza de las muestras de ADN de <i>Agave durangensis</i> de El Carrizal, Nombre de Dios.	38
Tabla 12. Estimaciones promedio de la pureza de las muestras de ADN <i>Agave durangensis</i> de la Sierra del Registro, Durango.	38
Tabla 13. Estimaciones promedio de la pureza de las muestras de ADN de <i>Agave asperrima</i> de las Mercedes, Cuencamé.	38
Tabla 14. Matriz binaria (presencia/ausencia), de la población natural de <i>Agave durangensis</i> de El Carrizal, Nombre de Dios a partir de las Figuras 14, 15 y 16.	50
Tabla 15. Matriz binaria (presencia/ausencia), de la población natural de <i>Agave durangensis</i> de la Sierra de Registro, Durango a partir de las Figuras 17 y 18.	51
Tabla 16. Matriz binaria (presencia/ausencia), de la población natural de <i>Agave asperrima</i> ubicada en Las Mercedes, Cuencamé a partir de las Figuras 19 y 20.	52
Tabla 17. Índices de polimorfismo de cada una de las poblaciones analizadas.	53

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en El Carrizal en el municipio de Nombre de Dios, Dgo.	23
Figura 2.	Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de la población natural de la Sierra de Registro, Durango, Dgo.	24
Figura 3.	Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de Las Mercedes Cuencamé, Dgo.	25
Figura 4.	Variación de los valores de absorbancia a 260 nm, y de las relaciones A_{260}/A_{240} y A_{260}/A_{280} de la población de <i>Agave durangensis</i> de El Carrizal, Nombre de Dios	36
Figura 5.	Variación de los valores de absorbancia a 260 nm, y de las relaciones A_{260}/A_{240} y A_{260}/A_{280} de la población <i>Agave durangensis</i> de Sierra de Registro, Durango	36
Figura 6.	Variación de los valores de absorbancia a 260 nm, y de las relaciones A_{260}/A_{240} y A_{260}/A_{280} de la población de <i>Agave asperrima</i> de Las Mercedes, Cuencamé	37
Figura 7.	Espectros de absorción UV de tres muestras de ADN de la población de El Carrizal, Nombre de Dios Dgo.	39
Figura 8.	Espectros de absorción UV de tres muestras de ADN de la población de Sierra del Registro	39
Figura 9.	Espectros de absorción UV de tres muestras de ADN de la población de Las Mercedes Cuencamé	39
Figura 10.	Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población de El Carrizal, Nombre de Dios correspondientes a los individuos 003, 024, 026, 012, 013, 014, 022 y 018	40
Figura 11.	Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población natural de El Carrizal, Nombre de Dios correspondientes a los individuos 029, 001, 002, 010, 011, 015, 016, 020 y 021	40
Figura 12.	Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población natural de la Sierra del Registro, Durango correspondientes a los individuos 214, 215, 202, 205, 220, 216, 212, 203 y 201.	41
Figura 13.	Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población natural de la Sierra del Registro, Durango correspondientes a los individuos 212, 213, 202, 208, 209, 221, 225 y 226	41
Figura 14.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 001 a el 008, 010 y 011 de <i>Agave durangensis</i> de la población natural de de El Carrizal, Nombre de Dios	43
Figura 15.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 012 a la 022, 024, 027, 026, y 025 de <i>Agave durangensis</i> de la población natural de de El Carrizal, Nombre de Dios	44

Figura 16.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 023,028, 029 y 030 de <i>Agave durangensis</i> de la población natural de de El Carrizal, Nombre de Dios	45
Figura 17.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 201 a 215 de <i>Agave durangensis</i> de la población natural de la Sierra de Registro, Durango	46
Figura 18.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 216 a 226, 200, 228 a 230 de <i>Agave durangensis</i> de la población natural de la Sierra de Registro, Durango	47
Figura 19.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 301 a 315 de <i>Agave asperrima</i> de la población natural de las Mercedes, Cuencamé	48
Figura 20.	Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras 316 a 330 de <i>Agave asperrima</i> de la población natural de las Mercedes, Cuencamé	49
Figura 21.	Dendrograma correspondiente a la matriz binaria considerando todos los fragmentos ISTR amplificados y todos los individuos analizados de las tres poblaciones de estudio	54
Figura 22.	Dendrograma de comparación de las poblaciones de <i>Agave asperrima</i> de Las Mercedes, Cuencamé y <i>Agave durangensis</i> de El Carrizal, Nombre de Dios	55
Figura 23.	Dendrograma de la comparación de las poblaciones de <i>Agave asperrima</i> de Las Mercedes, Cuencamé y de <i>Agave durangensis</i> de la Sierra de Registro en Durango	56

RELACIÓN DE ANEXOS

Anexo 1	GEOREFERENCIAS DE LAS MUESTRAS DE <i>Agave durangensis</i> DE EL CARRIZAL, NOMBRE DE DIOS	76
Anexo 2	FOTOGRAFÍAS DE LOS INDIVIDUOS MUESTREADOS DE EL CARRIZAL NOMBRE DE DIOS	77
Anexo 3	GEOREFERENCIAS DE LAS MUESTRAS DE <i>Agave durangensis</i> DE LA SIERRA DE REGISTRO, DURANGO	81
Anexo 4	FOTOGRAFÍAS DE LOS INDIVIDUOS MUESTREADOS EN LA SIERRA DEL REGISTRO, DURANGO	82
Anexo 5	GEOREFERENCIAS DE LAS MUESTRAS DE <i>Agave asperrima</i> DE LAS MERCEDES, CUENCAMÉ	86

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA
INTRA E INTERPOBLACIONAL
DE *Agave durangensis* Gentry
(Agavaceae) POR MEDIO DE MARCADORES
MOLECULARES ISTR**

RESUMEN

En este trabajo se realizó la caracterización molecular de dos poblaciones naturales de *Agave durangensis* Gentry ubicadas una en El Carrizal, municipio de Nombre de Dios, y una en la Sierra de Registro, en el municipio de Durango. Con fines comparativos se realizó también una caracterización semejante de una población de *Agave asperrima* de Las Mercedes, municipio de Cuencamé, Durango. Lo anterior con el fin de estimar la variabilidad genética intra e interpoblacional de *Agave durangensis*, especie económicamente importante para el Estado de Durango ya que sustenta una industria regional de producción de mezcal, la cual ha provocado una sobreexplotación de las poblaciones naturales de esta especie. La caracterización molecular se hizo con un tipo de marcadores, llamados Repeticiones Marcadas de Secuencias Inversas (ISTR, por sus siglas en inglés), los cuales están basados en la amplificación de secuencias que separan las repeticiones terminales largas de retrotransposones. La detección de la variabilidad genética generada por eventos particulares de retrotransposición en cada una de las dos poblaciones de *Agave durangensis* y en la de la especie de referencia se realizó por medio de la comparación de los perfiles ISTR correspondientes. Esos perfiles se obtuvieron por medio de amplificación de las secuencias ISTR mediante la técnica de PCR, y la separación y visualización de esas secuencias o loci se realizó en geles de acrilamida teñidos con sales de plata. Los resultados indican que el método de extracción utilizado permitió obtener ADN en cantidad y calidad adecuadas para emplearse en análisis ISTR de poblaciones de *Agave durangensis* y *Agave asperrima*. La concentración promedio de ADN de doble hebra de las tres poblaciones estudiadas fue de 1009.47 ng/μl. Los marcadores ISTR permitieron detectar variabilidad genética en las poblaciones de *Agave* analizadas debido al polimorfismo de las secuencias amplificadas. El número total de fragmentos o loci amplificados fue 60, con tamaños moleculares de 78 a 2069 pb. Los perfiles individuales de amplificación de secuencias ISTR sometidos a un análisis de agrupamiento mostraron la separación clara entre *Agave durangensis* y *Agave asperrima*, además de permitir la diferenciación entre poblaciones de *Agave durangensis*. La alta variabilidad genética de las poblaciones de *Agave durangensis* sugiere que este taxon se encuentra en un proceso activo de especiación o bien que incluye varias entidades taxonómicas. La capacidad discriminatoria de estos marcadores a nivel individual, poblacional y específico, y la relativa accesibilidad técnica y económica hacen a los marcadores ISTR una herramienta valiosa en el control de calidad para la determinación del origen de las plantas empleadas en la elaboración de mezcal.

ABSTRACT

In this study the molecular characterization of two populations of *Agave durangensis* Gentry, from El Carrizal, Nombre de Dios and Sierra de Registro, Durango, was carried out. For comparison, a similar characterization of a population of *Agave asperrima* from Las Mercedes, Cuencamé, Durango, was also carried out, to estimate the inter- and intrapopulation variability of *Agave durangensis*, which is an economically important resource of Durango since it supports the local manufacture of mescal. This species has been over collected from its natural populations to satisfy the demand of this alcoholic beverage. The molecular characterization was made with Inverse Sequence Tagged Repeats (ISTR), which are markers based on the amplification, by PCR, of the long terminal repeats of retrotransposons. The detection of genetic variability due to particular events of retrotransposition in each population of *Agave durangensis* and in the reference species *Agave asperrima*, was realized by the comparison of the respective ISTR profiles. Those profiles were separated and visualized in acrylamide gels dyed with silver salts. The results indicate that the protocol of DNA extraction allows obtain DNA from all the samples of *Agave* of this study, in enough quantity and quality to be analyzed by ISTR. The average concentration of DNA of double strain was 1009.47 ng/μl. ISTR markers allowed detect genetic variability in the populations of *Agave* analyzed due to the polymorphism of amplified sequences. A total of 60 loci, from 78 to 2069 pb, were amplified. The individual amplification profiles of ISTR sequences analyzed by multivariate analysis showed the clear separation between *Agave durangensis* and *Agave asperrima*, and also the clear separation between the two populations of *Agave durangensis*. The high genetic variability of the populations of *Agave durangensis* suggests that this taxon is in a present active speciation process or that several taxonomic entities are coexisting. The discriminatory capacity of these markers at individual, population and specific levels and the relative technique and economic facilities make ISTR an important tool in the quality control to determine the origin of individuals collected to elaborate mescal.

I. INTRODUCCIÓN

Los agaves han sido utilizados por el hombre americano para muy diversos fines desde tiempos remotos. Algunas especies, como *Agave tequilana* (Torres y col., 2005), *Agave crassispina* (Almaraz, 1984) y *Agave durangensis* (Valenzuela-Ruiz y col., 2003), entre otras, tienen importancia económica relevante en la elaboración de bebidas alcohólicas. *Agave angustifolia* (en sus dos variedades) y *Agave potatorum* ambas utilizadas en Oaxaca también son especies económicamente importantes para la elaboración de mezcal (Angustino y col., 1995). Otras especies de *Agave* como *Agave fourcroydes* en Yucatán, son importantes debido a su uso de este como alimento humano así mismo para la elaboración de bebidas fermentadas (Colunga-GarcíaMarín y May-Pat, 1993) y debido a que es fuente de fibra (Nieves y col., 2007); por ello actualmente se están destinado trabajo y recursos para, como en el caso de *Agave durangensis*, industrializar su proceso de aprovechamiento, el cual hasta el momento es tradicional.

En el caso de *Agave durangensis*, el incremento de la demanda de mezcal ha provocado una sobreexplotación del recurso, debido a que para la elaboración de esa bebida se colectan indiscriminadamente las plantas de sus poblaciones naturales. Esta recolección está ocasionando la disminución y la fragmentación de las poblaciones silvestres de este recurso en el Estado de Durango (Valenzuela-Ruiz y col., 2003; Olivas y col., 2007).

Debido a la gran variabilidad morfológica que se presenta en las hojas de *A. durangensis* de la localidad Tipo, que es la Sierra de Registro, en donde Gentry (1982) menciona una posible introgresión con genes de *Agave applanata*, algunos autores han propuesto considerar a ésta entidad taxonómica como un complejo (Valenzuela-Ruiz y col., 2003).

La recolección indiscriminada de *Agave durangensis* podría causar la pérdida de variabilidad genética y esto, a su vez conduciría, en un caso extremo, a la extinción de sus poblaciones naturales. Ese riesgo justifica la realización de estudios enfocados a determinar y monitorear la variabilidad genética existente en las poblaciones silvestres de este recurso natural tan importante para el Estado de Durango por el potencial de desarrollo económico que representa.

La caracterización genética de las poblaciones naturales contribuye a la conservación de los recursos proporcionando herramientas que describen la diversidad genética para poder entender los cambios evolutivos y la variación de los patrones genéticos de las poblaciones naturales (Sosa, 2003; Olivas y col., 2007), y los marcadores moleculares representan una herramienta valiosa para caracterizar genéticamente un recurso (Teo y col., 2005; Alonso y col., 2008).

En este trabajo se realizó la caracterización molecular de dos poblaciones de *Agave durangensis*, en la Sierra del Registro, municipio de Durango y en El Carrizal, municipio de Nombre de Dios, por medio de marcadores moleculares ISTR, para estimar la variabilidad genética intra e interpoblacional. Con fines comparativos también se caracterizó molecularmente una población de *Agave aspérrima* de Las Mercedes, Cuencamé,

Los resultados sugieren que los marcadores ISTR son lo suficientemente sensibles y polimórficos para discriminar entre especies y entre poblaciones de *Agave* y que las poblaciones naturales de *Agave durangensis*, a pesar de la reducción y fraccionamiento a que han estado sometidas, presentan una alta variabilidad, lo que sugiere un proceso actual de especiación o la coexistencia de más de una entidad taxonómica en cada población.

II. ANTECEDENTES

2.1. El Género *Agave*

2.1.1. Etnobiología del Género *Agave*

Los agaves han sido utilizados por los habitantes de Mesoamérica desde hace aproximadamente 9,000 años (Gentry, 1982). En general, antes de la llegada de los españoles la utilidad de los agaves fue integral, de ellos se obtenía la fibra para la elaboración de prendas, cuerdas y suturas (González-Elizondo y col., 2009; Ramírez, 1995). De las púas se elaboraban agujas y punzones (García-Mendoza y col., 2004); de las pencas se obtenía, y aun continua obteniéndose alimento para animales (Almaraz, 1984). Las hojas se utilizaban como tejas para el techo de las casas y canales para la conducción de agua (Muriá, 1994). Actualmente, los tallos florales (quiotes) horneados pueden ser consumidos como alimento; la sabia es tomada como aguamiel, y evaporando el agua, se obtiene una miel rica en minerales y proteínas, que fermentada produce el pulque, considerado por nuestros antepasados como una bebida ceremonial, que únicamente podían consumir los sabios, sacerdotes, ancianos y mujeres amamantando; del quiote se obtienen postes para construcción; las flores también son consumidas como alimento (Muriá y Madrigal, 1998; Ramírez, 1995).

Después de la conquista la elaboración de bebidas alcohólicas destiladas, a partir de las piñas cocidas y fermentadas de algunas especies de agaves, llamada mezcal, se popularizó impulsando una economía en torno a ella, llegando a su máximo desarrollo hacia la mitad del siglo XX (Colunga-GarcíaMarín y col., 1993).

De las múltiples especies vegetales de México que benefician al ser humano, las pertenecientes al género *Agave* han sido una de las más aprovechadas, tanto por los antiguos mesoamericanos como por las poblaciones actuales indígenas y rurales (Abundis, 2007), de ahí la importancia de incrementar su cultivo y resolver problemas

como el de la erosión y la pérdida de variabilidad genética causada por un sobre aprovechamiento.

2.1.2 Aspectos biológicos del género *Agave*

Diversos estudiosos coinciden en afirmar que México es el centro de origen y diversidad del género *Agave*, ya que en él existen en estado silvestre el mayor número de especies (Gentry, 1982; García-Mendoza y Galván, 1995). De sus aproximadamente 200 especies, 150 de ellas se pueden encontrar en la República Mexicana, y el 69% de éstas, son endémicas a dicho territorio. La distribución del género, abarca desde el sur de Estados Unidos, pasando por las tierras del estado de Florida en ese país, hasta Colombia y Venezuela incluyendo las islas del Caribe (García, 2002). En México, el género *Agave* tiene una amplia distribución, encontrándose en el 75% del territorio nacional, siendo muy diverso en las provincias áridas del centro y norte, y poco diverso en el sureste húmedo (García-Mendoza y Galván, 1995). Las especies de este género se distribuyen en una gran variedad de ambientes (García-Mendoza, 2003) como se muestra en el Tabla 1, ubicándose principalmente en vegetaciones de tipo desértico y chaparral (Olivas y col., 2007).

Tabla 1. Distribución ecológica del género *Agave* en México (tomado de García-Mendoza, 2003)

<i>Tipos de vegetación</i>	<i>Número de especies</i>
Bosque tropical perennifolio	1
Bosque tropical subcaducifolio	3
Bosque tropical caducifolio	31
Bosque espinoso	14
Pastizal	12
Desierto y chaparral	52
Bosques de coníferas y encinos	44
Bosque nublado	4

Además de encontrarse distribuido a lo amplio del territorio nacional, el género *Agave* también cuenta con una distribución de especies dependiendo de la altura a la que se desarrolla la planta; esa distribución fue descrita por García-Mendoza (2003) como se muestra en la Tabla 2. Las especies se encuentran distribuidas desde el nivel del mar, hasta los 3400 msnm, localizándose la mayor cantidad de estos entre los 1000 a 2000 msnm, aunque el mayor número de especies se encuentran a alturas menores, y reduciéndose la cantidad de especies con relación a la elevación.

Tabla 2. Distribución altitudinal del género *Agave* en México (tomado de García-Mendoza, 2003)

<i>Altitud (msnm)</i>	<i>Número de especies</i>	<i>Especies exclusivas del intervalo de latitud</i>
0-500	28	18
500-1000	42	10
1000-1500	52	11
1500-2000	51	9
2000-2500	35	8
2500-3000	4	1
3000-4000	3	3

Los elementos del género *Agave* llegan a su madurez entre los ocho y los doce años. El género alberga especies monocárpicas, es decir, que florece sólo una vez, muriendo poco tiempo después (Gentry, 1982; Abundis, 2007).

Agave durangensis crece en colonias dispersas sobre laderas rocosas y bajadas con gravas en pastizales entre los 1700 a 2600m en el sur de Durango y norte de Zacatecas (Gentry, 1982; González-Elizondo y col., 2009). Por su relativa abundancia en su área de distribución, esta especie parece no tener problemas de conservación; sin embargo, la sobreexplotación a la que ha sido sometida, además de reducir en gran cantidad el tamaño de sus poblaciones puede ser un factor muy importante en el empobrecimiento de la diversidad genética de las mismas.

2.1.3 Aspectos morfológicos y taxonómicos de *Agave durangensis*

La siguiente descripción está basada en el trabajo de González-Elizondo y col. (2009) quienes a su vez toman como punto de partida para la descripción la obra de Gentry (1982) con modificaciones de acuerdo a datos de campo.

Rosetas de tamaño medio a grande, de (70) -80 a 150(-180) cm de alto, 120 a 180-310 cm de diámetro, solitarias o densamente cespitosas, de tallo corto no evidente.

Hojas de 40 a 90-130 por 14 a 22-25 cm., ampliamente lanceoladas, más anchas en la parte media, estrechándose arriba de la base, rectas a curvadas, planas a cóncavas especialmente hacia la punta, gruesa y convexa hacia la base, ásperas, pruinosas, los márgenes profundamente crenado-mamelado; dientes prominentes, 1-2 cm., ampliamente aplanados, diversamente flexionados, separados entre sí generalmente 1-2 cm; espinas fuertes de 4-6 cm.

La inflorescencia es una panícula de 7-8 m de alto, abierta, con 18-30 ramas cortas sinuosamente extendidas, trifurcadas, sobre los $\frac{3}{4}$ superiores de un eje en zigzag; brácteas de 15 a 25 cm. de largo, escariosas y separadas.

Flores en umbelas pequeñas, 60-80 mm de largo, erectas, amarillas; ovario 30-45 mm; tépalos desiguales, marcadamente pegados a los filamentos, haciéndose coriáceos, los exteriores más largos, gruesamente redondeados en el dorso y envolviendo a los interiores; filamentos de 48 a 60 mm, algo aplanados, insertos en dos niveles 8-12 y 6- 10 mm sobre la base del tubo, anteras de 18 a 25 mm.

Los frutos o capsulas hasta 6 por 1.8 cm., oblongas, estípites cortos, con pico corto; semillas alunadas a obovadas, con alita ancha pero poco elevada.

Gentry (1982) ubica a *Agave durangensis* en la sección Ditepalae, debido a que posee tépalos dimórficos. Sin embargo, de acuerdo a ese autor, *A. durangensis* puede ser confundido con *Agave scabra* de la sección Americanae, que crece en la misma región.

En el Estado de Durango, la mayor diversidad de *Agave* se encuentra en el sur de la entidad, que es la zona donde precisamente existe un mayor aprovechamiento, de ahí que cada vez sea más difícil encontrar individuos con inflorescencia, lo que hace a la identificación de especies una tarea difícil (González-Elizondo y col., 2009).

2.2 Marcadores moleculares para estudios taxonómicos y de variabilidad

2.2.1 Teoría celular

Los postulados de Theodor Schwann y Jakob Schleiden asentaron el primer principio de la teoría celular “todos y cada uno de los organismos vivos están constituidos por una (unicelulares) o más células (multicelulares)” (Otto y Towle, 1989). Después el médico Rudolf Virchow, interesado en la especificidad celular de la patología (sólo algunas clases de células parecen implicadas en cada enfermedad) explicó lo que se considera el segundo principio de la teoría celular “Los antecesores de las células, son células preexistentes” (Alberts y col., 1990).

Posteriormente Virchow concluyó que la división de la célula es por bipartición, porque a pesar de ciertas apariencias, la división es siempre, en el fondo, binaria. Su postulado, implica la continuidad de las estirpes celulares, éstas dan origen a la existencia de líneas germinales, a través de las cuales se establece la continuidad entre padres e hijos y, por lo tanto, del concepto moderno de herencia biológica, es decir que en las células reside el material hereditario (Davies y col., 1969).

2.2.2 El material genético

El descubrimiento de la estructura molecular del ADN fue el resultado de una concatenación de descubrimientos hechos por diferentes investigadores, que James Watson y Francis Crick utilizaron para proponer su modelo de la doble hélice en 1953, (Mc Carty, 1988).

El ADN es el componente del material genético, el elemento primario de los cromosomas, y el material en el cual los genes están codificados. Los componentes del ADN son cuatro diferentes nucleótidos, cada uno de ellos está formado por un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Éstas últimas son, dos de naturaleza púrica, (la adenina y la guanina) y dos de naturaleza pirimídica, (la citosina y la timina). (Anthony, 1997).

2.2.3 Teoría de la evolución

En 1859 Charles Darwin en “El origen de las especies” afirmó en sus premisas que “entre los descendientes de un organismo hay una variación aleatoria, no determinista, que es en parte heredable; esta variabilidad puede dar lugar a diferencias de supervivencia y de éxito reproductor, haciendo que algunas características de nueva aparición se puedan extender en la población”, lo que después se convertiría en la Teoría de la Selección Natural. Darwin propuso que la evolución biológica es el proceso continuo de transformación de las especies a través de cambios producidos en sucesivas generaciones, que se ve reflejada en el cambio de las frecuencias alélicas de una población (Mickos y Freyer, 1990).

Casi al mismo tiempo que Darwin, Gregor Mendel (1865) en su Ley de Uniformidad mencionó que los individuos no son la combinación intermedia entre los genes de los padres sino que existe un tipo de información genética dominante y otra recesiva las cuales al combinarse en proporciones no intermedias dan origen a un nuevo ser (Alberts y col., 1990). En su Ley de Segregación Independiente, Mendel nos indica

que la información genética recesiva puede resurgir en generaciones posteriores, es decir, que esa información genética puede seguir compitiendo genéticamente y heredarse en generaciones siguientes.

En su tercera ley, la Ley de Combinación de Genes, Mendel indica que cada carácter heredable es independiente, es decir, que aún siendo una cadena de información genética compleja no es necesario que toda ella sea retransmitida o heredada, sino que sólo algunos caracteres independientes podrán ser heredados en las próximas generaciones (Otto y Towle, 1989). Esos conceptos han sido la base de los estudios e investigaciones enfocados a determinar las características heredables de los individuos, la variabilidad de las poblaciones y la diversidad de especies.

2.2.4 Marcadores genéticos

La variabilidad de las poblaciones ha sido estudiada utilizando diferentes atributos, entre ellos se pueden mencionar los morfológicos, los citológicos, los bioquímicos, los químicos y los moleculares (Sosa, 2003). Hasta años recientes, los perfiles de proteínas y particularmente de enzimas fueron los caracteres preferidos. En la actualidad los caracteres moleculares permiten realizar caracterizaciones independientemente de las condiciones ambientales, de la edad de los individuos y de su estadio fisiológico, por lo que se consideran muy indicativos para este tipo de estudios.

2.2.4.1 Marcadores morfológicos

Los primeros marcadores utilizados en estudios poblacionales fueron los marcadores morfológicos, los cuales identifican caracteres altamente heredables empleados sobretodo en la identificación y la verificación de la identidad de los individuos. Los marcadores morfológicos son una buena opción en estudios de variación, sin embargo, la correlación de los marcadores morfológicos con los

marcadores moleculares no siempre es satisfactoria, ya que los primeros se ven afectados por múltiples factores y en la mayoría de los casos son el resultado de la expresión de más de un gen (Infante y col., 2006)), y porque mucha de la variabilidad detectada por los marcadores moleculares se encuentra en regiones no codificantes del genoma (Lewin, 2000), es decir en regiones que no determinan el fenotipo de los organismos.

2.2.4.2 Marcadores citogenéticos

Los marcadores citogenéticos caracterizan a los individuos o grupos de individuos por su cariotipo, es decir el número y forma de sus cromosomas. La utilidad de estos caracteres para tipificar y delimitar grupos de individuos es limitada y difícil de aplicar a niveles inferiores al de especie (Infante y col., 2006). Actualmente se ha desarrollado una disciplina llamada citogenética molecular que combina técnicas de citogenética clásica y de biología molecular (Schwarzer y Helsop, 2000) que permiten tipificar a niveles infra específicos.

2.2.4.3 Marcadores químicos y bioquímicos

Los marcadores químicos, basados en los perfiles de metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, terpenos y compuestos nitrogenados y los bioquímicos, basados en perfiles de proteínas, como las de almacenamiento y de enzimas, son marcadores que han sido usados con frecuencia debido a que su variabilidad es altamente heredable (Infante y col., 2006); sin embargo, los primeros pueden verse afectados por múltiples factores ambientales y fisiológicos de las poblaciones y los segundos pueden llegar a ser muy difíciles de interpretar (Harborne y Turner, 1984).

2.2.4.4 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares permiten analizar y comparar secuencias de ADN entre diferentes individuos. El análisis de secuencias de ADN inició en la década de 1970 y se desarrolló de manera intensa durante la siguiente década cuando, se implementó la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se basa en el principio de re-asociación del ADN y la acción de la ADN polimerasa para amplificar secuencias de ácidos nucleicos in vitro, esta técnica puede producir un número grande de copias de una secuencia específica de ADN (Hoelzel y Green, 1994).

Los marcadores moleculares son el tipo de marcadores genéticos más usados actualmente debido a su abundancia y a su independencia de factores ambientales, de la edad del individuo, y de estadio fisiológico del mismo; éstos marcadores esencialmente revelan diferencias genéticas que pueden ser visualizadas mediante la electroforesis y la tinción de los geles con colorantes como el bromuro de etidio o sales de plata, o mediante su detección utilizando sondas radioactivas o fluorescentes (Sambrook y col., 1989).

Existen muchos tipos de marcadores moleculares, estos se pueden clasificar de acuerdo a la técnica que se emplea para su detección o de acuerdo al tipo de secuencia de ADN que detectan. Entre ellos se encuentran:

- Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción. ("Restriction Fragment Length Polymorphism" o RFLPs), basados en la generación de secuencias de restricción hibridación del ADN. Este marcador expresa diferencias específicas del ADN reconocidas por enzimas de restricción particulares, las cuales podrán actuar sobre cualquier ADN no metilado; son de longitud definida y cualquier mutación dentro de los sitios blanco o diana podrá cambiar el patrón de los fragmentos obtenidos, y así permitir la comparación entre genomas.

- Polimorfismos de ADN amplificados al azar, (“Random Amplified Polimorphic DNA” o RAPDs), basados en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se basa en la probabilidad de que se presenten sitios complementarios a iniciadores de 10 pb a lo largo del genoma. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento de los iniciadores, esos cambio pueden deberse a la inserción o a la delección de bases o secuencias en esos sitios (Smitler, 2005).
- Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados del ADN (“Amplification Fragment Length Polymorphism” o AFLPs), puede considerarse una combinación entre RFLPs y RAPDs (Sánchez y col., 2009).
- Repeticiones de secuencias simples (“Simple Sequence Repeats” o SSRs). Marcador mixto. Que se basa en la variación del número de repeticiones de secuencias cortas de nucleótidos (2 a 6 unidades) que se distribuyen en tándem. Se considera que cuando el ADN se está replicando, se producen errores en el proceso y más series de estas secuencias repetidas se añaden a las preexistentes. Con el tiempo, estas secuencias repetidas de longitud variable dan la diferenciación entre uno y otro individuo (Teulat y col., 2000).
- Repetición de secuencias inversas marcadas, (“Inverse Sequence Tagged Repeat”o ISTR), basados en el polimorfismo generado por los procesos de transposición de retrotransposones, se detectan por técnicas de PCR y separación en geles de acrilamida.

2.2.5 Elementos móviles o transposones

Un transposón es una secuencia de ADN que puede moverse de manera autónoma de un sitio a otro del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición. En este proceso los transposones pueden causar mutaciones y cambio en la cantidad de ADN del genoma. Anteriormente fueron conocidos como "genes saltarines" y ellos son ejemplos de elementos genéticos móviles (Kentner y col., 2003). Existe una amplia diversidad de elementos genéticos móviles y pueden ser clasificados con base en su mecanismo de transposición. Los elementos genéticos móviles de clase I, o retrotransposones, se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después al ADN por retrotranscriptasa o transcriptasa inversa, mientras que los de clase II se mueven directamente de una posición a otra en el genoma usando una transcriptasa para "copiarse" en otro locus del mismo genoma (Alix y Helsop-Harrison, 2004).

Los transposones pueden modificar el ADN de sus inmediaciones ya sea arrastrando un gen codificador de un cromosoma a otro, rompiéndolo por la mitad o haciendo que desaparezca del todo (Schulman, 2006).

En la mayoría de las especies, la mayor parte del ADN nunca se transcribe y por lo tanto no se expresa en algún polipéptido. La mayor parte de ese ADN hasta un 50% del total del genoma en algunas especies de plantas, corresponde a transposones. (Lewin. 2000; Alix y Heslop-Harrison, 2004).

Los elementos genéticos transponibles, al cambiar de posición y abandonan el lugar en el que estaban, pueden producir una delección o pérdida de bases en el sitio donde se encontraban. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen. De igual forma, si el elemento genético móvil al cambiar de posición se inserta dentro de un gen, se produce una adición de nucleótidos, lo que tendrá como consecuencia la pérdida de la función de dicho gen. Por ello, los elementos genéticos transponibles producen mutaciones (Graur y Li, 2000).

Evidencia de la existencia de los elementos móviles fue propuesta por McClintock, en sus trabajos publicados durante 1951 a 1957, en el genoma de maíz, sin embargo, su existencia no se demostró hasta mucho más tarde en bacterias (Kidwell y Lisch, 1997). En el fenómeno de la transposición no se ha encontrado una relación clara entre la secuencia donadora (lugar en el que está el transposón) y la secuencia receptora (lugar al que se incorpora el transposón). Algunos transposones muestran una preferencia por una determinada región (zona de 2000 a 3000 pares de bases), pero dentro de ella parecen insertarse al azar (Schulman, 2006).

2.2.5.1 Tipos de transposones

Los elementos móviles más sencillos son los transposones simples, Secuencias de Inserción o Elementos de Inserción (IS). Contienen una secuencia central con información para la transposasa y en los extremos una secuencia repetida en orden inverso. Esta secuencia repetida en orden inverso no es necesariamente idéntica, aunque muy parecida. Cuando un transposón simple se integra en un determinado punto del ADN aparece una repetición directa de 5-12 pb en la secuencia diana (Waugh y col., 1996).

Los transposones Compuestos (Tn), contienen un elemento de inserción (IS) en cada extremo, en orden directo o inverso y una región central que además suele contener información de otro tipo, como genes de resistencia a antibióticos o bacterias (Boeke, 2007).

2.2.5.2 Tipos de transposición

La transposición de los elementos móviles puede ser de dos tipos, según se replique el elemento mismo o no.

En la transposición conservativa el transposón se desinserta de la secuencia donadora y se incorpora en una nueva secuencia (secuencia receptora). Este

mecanismo no aumenta el número de copias del transposón en el interior de la célula (Waugh y col., 1996).

En la transposición replicativa el transposón permanece en la secuencia donadora y mediante un mecanismo combinado de replicación y recombinación se incorpora en una nueva secuencia. Esto trae con ello el aumento en el número de copias del transposón en el interior de la célula (Waugh y col., 1996).

2.2.5.3 Retrotransposones

Los retrotransposones son elementos genéticos móviles de clase I, que se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después al ADN por la acción de la retrotranscriptasa.

Los retrotransposones pueden ser similares en estructura a los retrovirus. Están presentes en todos los organismos eucariotas, y cuentan con un mecanismo de inserción similar al de los retrovirus. Son muy frecuentes en levaduras y en *Drosophila* y algo menos frecuentes en mamíferos (8% del genoma humano) (Flavel y col., 1998).

Los retrotransposones cuentan con unas estructuras de secuencias terminales largas (LTR, Long Terminal Repeats) que los limita en ambos extremos. Los LTR tienen de 250-600 pb y limitan una región central codificante que incluye los genes para la transcriptasa inversa (reversa) y para la Integrasa. Los retrovirus además de esos genes portan la información genética para producir las proteínas de la cápside, (Boeke, 2007).

El mecanismo de transposición de los retrotransposones se realiza mediante la transcripción inversa del RNA del retrotransposón, dirigida por el LTR izquierdo (LTR5'), usando la retrotranscriptasa para realizar una copia de la información del

ARN en un ADN copia (cADN), siendo integrada esta última en un nuevo sitio del genoma mediante la integrasa.

Otro tipo de retrotransposones carecen de LTR y son muy abundantes en mamíferos. Existen dos tipos: LINES (Long Interspersed Elements) de 6 Kb aproximadamente y SINES (Short Interspersed Elements) de 300 pb aproximadamente. Ambos cuentan con una región central codificante para 2 proteínas, y una región rica en A y T flanqueada por dos repeticiones directas. Cuentan con un mecanismo de transposición por RNA pol II celular a partir de un promotor situado en su extremo 5' (Waugh y col, 1996).

2.2.6 Marcadores moleculares basados en elementos móviles del genoma

Se han desarrollado varios tipos de marcadores moleculares basados en retrotransposones, que tienen aplicación a nivel de genérico, específico y subespecífico, porque permiten detectar el polimorfismo asociado con la inserción de estos elementos móviles de genoma. Existen cinco tipos principales de marcadores que detectan esa clase de polimorfismo:

- Polimorfismo de la Amplificación de Secuencias Específicas ("Sequence Specific Amplification Polymorphism" o SSAP),
- Polimorfismo de la Amplificación Inter Retrotransposones ("Inter Retrotransposon Amplification Polymorphism" o IRAP),
- Polimorfismo de la Amplificación de Microsatélites de Retrotransposones ("Retrotransposon microsatellite amplification polymorphism" o REMAP),
- Polimorfismo insercional basado en retrotransposones ("Retrotransposon Based Insertional Polymorphisms" o RBIP),
- Repeticiones Marcadas de Secuencias Inversas ("Inverse Sequence Tagged Repeat" o ISTR).

Todos esos marcadores, se basan en detectar la variabilidad que se genera durante la inserción de una copia de retrotransposones en secuencias nuevas del genoma, que crean nuevas conexiones entre el ADN genómico y las secuencias altamente específicas al final de los transposones (Wessler y col., 1995).

Los marcadores moleculares llamados ISTR están basados en la tecnología PCR, han sido comparados con otros, como los AFLPs y, los primeros presentan ventajas en términos de precio, tiempo, facilidad, flexibilidad y precisión, ya que se llevan a cabo con iniciadores universales, detectan un elevado polimorfismo, son altamente reproducibles, y se aplican a análisis de plantas, animales, humanos y microorganismos (Venturi, 2006).

2.2.7 Retrotransposones como fuente de variabilidad genética

Los retrotransposones son elementos móviles del genoma los cuales al moverse dentro del mismo causa variabilidad. Durante su transposición, que es replicativa estos elementos crean secuencias nuevas en el genoma, lo cual crea a su vez, variabilidad genética y puede generar variabilidad morfológica, ya que si la inserción ocurre dentro de un gen activo este puede perder la actividad y en caso de que ocurra dentro de algún gen inactivo, éste podría expresarse (Lightbourn y Velleux, 2003; Schulman, 2006).

Debido a que los hospederos no pueden controlar el movimiento de los retrotransposones, la expansión de estos elementos ha sido acumulativa durante la evolución de las especies. En la actualidad, estos elementos se han convertido en una herramienta útil para el estudio de los genomas y su evolución (Kazazian, 2004).

Considerando el hecho de que las características fenotípicas son en parte el resultado de la expresión genotípica, como en el caso de las isoenzimas y demás

proteínas (marcadores bioquímicos), y que en el genoma existe una gran proporción de secuencias que nunca se expresan pero que son susceptibles de producir variabilidad genética (Lewin, 1995), se puede asumir que los marcadores moleculares, incluidos los basados en retrotransposones, pueden señalar diferentes regiones del genoma por medio de la amplificación, separación y visualización de secuencias particulares y así permitir detectar la variabilidad existente en secuencias génicas y/o en secuencias no expresables, entre individuos y poblaciones.

2.2.8 Utilidad taxonómica de los retrotransposones (ISTR)

Gran parte de la variabilidad genética de las plantas es explicada por eventos de movilidad de transposones y retrotransposones (Clark y Kidwell, 1997; Pearce y col., 1999), que provocan modificación y amplificación de secuencias, o pérdida de las mismas por recombinación. Estos rearrreglos pueden formar nuevos genes, activar secuencias silenciosas o eliminar genes activos (Alberts y col., 1990).

Mediante los ISTR, los cuales son marcadores genéticos, basados en iniciadores específicos capaces de amplificar secuencias génicas particulares de retrotransposones de varios pares de bases, se ha determinado el polimorfismo y la variabilidad de individuos y poblaciones (Teo y col., 2005; Alonso y col., 2008).

Los marcadores ISTR han demostrado detectar la variabilidad intrapoblacional en diferentes grupos de plantas tales como; café (*Coffea arabica* L.) (Esayas, 2005), manzano (Tignon y col., 2001), y pera (Shi y col., 2002) además de demostrar su utilidad en algunas especies de *Agave* tales como; *Agave tequilana* (Torres y col., 2006; Torres y col., 2007), *Agave fourcroydes* (Infante y col., 2003), *Agave cocui* (Osorio y col., 2006), *Agave americana*, *Agave desmettiana*, *Agave maximiliana*, *Agave salmiana* y *Agave angustifolia* (Torres-Moran y col., 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

La recolección indiscriminada de especies de *Agave* para la elaboración de mezcal y la posible pérdida de variabilidad genética de sus poblaciones naturales justifican la realización de estudios enfocados a determinar y monitorear molecularmente la variabilidad genética existente en las poblaciones de este recurso ya que la caracterización genética de las poblaciones naturales contribuye a la conservación de los recursos proporcionando herramientas que describen la diversidad genética para poder entender los cambios evolutivos y la variación de los patrones genéticos de las poblaciones naturales (Sosa, 2003). Una de las herramientas disponibles para la caracterización genética poblaciones, son los marcadores moleculares ISTR, los cuales tienen ciertas ventajas técnicas y económicas sobre otros tipos de marcadores, por lo que se consideró su empleo en este estudio.

IV. OBJETIVO

Realizar la caracterización molecular de dos poblaciones de *Agave durangensis*, en la Sierra del Registro, municipio de Durango y en El Carrizal, municipio de Nombre de Dios, por medio de marcadores moleculares ISTR, para estimar la variabilidad genética intra e interpoblacional, y con fines comparativos también caracterizar molecularmente una población de *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé,

V. METODOLOGÍA

5.1 Descripción del área de estudio

Se analizaron dos poblaciones naturales de *Agave durangensis* del sur de Durango, una en el municipio de Durango y otra en el municipio de Nombre de Dios. Adicionalmente, se analizó, como referencia, una población de *Agave asperrima*, de Las Mercedes, en el municipio de Cuencamé, Dgo. Este Estado se encuentra al centro-norte de la República Mexicana. Está comprendido entre los paralelos 22°16' y 26°53' de latitud norte y entre los meridianos 102°29' y 107°16' de longitud oeste (INEGI, 2005).

La descripción de esta y las siguientes localidades está basada en los información de CONABIO (2009), INEGI (2005), Rzedowski (2006) y en observaciones de campo registradas durante la realización de este estudio.

5.1.1 Municipio de Durango

El municipio de Durango se localiza en la parte centro sur del Estado de Durango. Está comprendido entre los paralelos 22°40' y 26°50' de latitud norte y entre los meridianos 102°25'55" y 107°08'50" longitud oeste (INEGI, 2005).

5.1.1.1 Sierra de Registro

La Sierra de Registro se encuentra ubicada en las coordenadas geográficas 24° 00'49" N 104°26'11" O; cuenta con una textura de suelo rocoso, y una pendiente de 5%. El clima de esta localidad es semiseco templado, con una temperatura media anual de 19°C y una precipitación pluvial de 600 milímetros anuales. La vegetación es de tipo pastizal. La vegetación dominante observada en campo incluyó *Agave*

durangensis, Mezquite (*Prosopis laevigata*), Huizache (*Acacia schaffneri*), Nopal (*Opuntia durangensis*), Lechuguilla (*Agave lechuguilla*), Jarilla (*Dodonaea viscosa*).

La fauna representativa de la zona incluye, roedores (*Dipodomys phillipsii*), (*Peromyscus leucopus*); aves (*Aprimulgus ridgwayi*), (*Polioptila melanura*), (*Vireo atricapillus*); aves migratorias (*Icterus bullockii*), (*Chondestes grammacus*) y reptiles (*Aspidocelis marmorata*), (*Sceloporus slevini*).

5.1.2 Municipio de Nombre de Dios.

El municipio de Nombre de Dios se localiza al suroeste de la capital del estado, en las coordenadas 23°51' de latitud norte y a los 104°15' de longitud oeste; a una altitud de 1,730 metros sobre el nivel del mar.

5.1.2.1 El Carrizal

La localidad de El Carrizal se encuentra en las coordenadas geográficas 23° 41'20'' N y 104°15'55'' O. Cuenta con solos poco profundos y rocosos, con una pendiente de 20%; el clima de esta localidad es tipo semiseco templado; cuenta con una temperatura media anual de 16°C y una precipitación pluvial de 700.1 milímetros anuales. La vegetación en esta zona es tipo pastizal; la vegetación observada en el sitio incluye Huizache (*Acacia farnesiana*), Mezquite (*Prosopis laevigata*), Nopal (*Opuntia spp*), Sotol (*Dasylyrion durangense*), Pastos. *Boutelona gracilis* y *Boutelona curtipundula*. La fauna de esta zona es similar a la encontrada en la localidad de Sierra de Registro debido a la proximidad de ambas localidades (34 km) y la movilidad de las especies de fauna.

5.1.3 Municipio de Cuencamé

El municipio se ubica en la región oriental del estado. Las coordenadas geográficas son 24° 52' latitud norte y 103°42' longitud oeste. Su altitud es de 1,580 metros sobre el nivel medio del mar. Tiene una superficie territorial de 4,797.6 km².

5.1.3.1 Las Mercedes

La localidad de Las Mercedes, se encuentra ubicada en las coordenadas geográficas 25°02'187"N y 103°50'50" O. La textura del suelo es rocosa con una pendiente de 2 a 5 %; el clima de esta región es semiárido, seco semicálido, con una temperatura media anual de 21.1°C y una precipitación pluvial de 243.7 milímetros anuales. El tipo de vegetación en esta zona es matorral xerófilo. La vegetación predominante observada en campo incluye, Maguey (*Agave aspérrima*), Lechuguilla (*Agave lechuguilla*), Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), Leguminosas espinosas, Palma (*Yucca*), Ocotillo (*Fouquieria splendens*), Nopal (*Opuntia spp.*). La fauna encontrada en esta zona roedores (*Dipodomys phillipsii*), (*Peromyscus leucopus*); aves (*Aratinga canicularis*), (*Icterus bullockii*), (*Polioptila melanura*), (*Polioptila nigriceps*) y reptiles (*Uma paraphigas*), (*Croatalus atrox*).

5.2 Colecta de muestras

De manera aleatoria, se colectó tejido foliar de un total de 30 individuos en cada población (de acuerdo a lo sugerido por Nei, 1987). Los individuos colectados en El Carrizal, Nombre de Dios, se marcaron con los números 001 a 030; los de Sierra de Registro, Durango, con 200 a 230; y los de Las Mercedes, Cuencamé, con los números 300 a 330. De cada uno de los individuos se depositó una muestra en el Herbario CIIDIR. De cada individuo, presumiblemente de *Agave durangensis*, se tomaron fotografías y se registraron las referencias geográficas. Las georreferencias se muestran en los Anexos 1, 3, y 5 para *A. durangensis* de El Carrizal, *A. durangensis* de Sierra de Registro, y *A. asperrima* de Las Mercedes, respectivamente. Las fotografías de los individuos de *A. durangensis* de El Carrizal y de la Sierra de Registro se muestran en los anexos 2 y 4, respectivamente.

5.2.1 El Carrizal, Nombre de Dios

En un área aproximada de 0.604 Km², entre las coordenadas 23°40'55.64" N y 23°40'34.71" N, y 104° 14'01.10" O y 104°13'27.1" O, se colectaron al azar 30 individuos, presumiblemente de *A. durangensis*. En la Figura 1 se muestran los sitios alrededor de los cuales se colectaron las muestras.

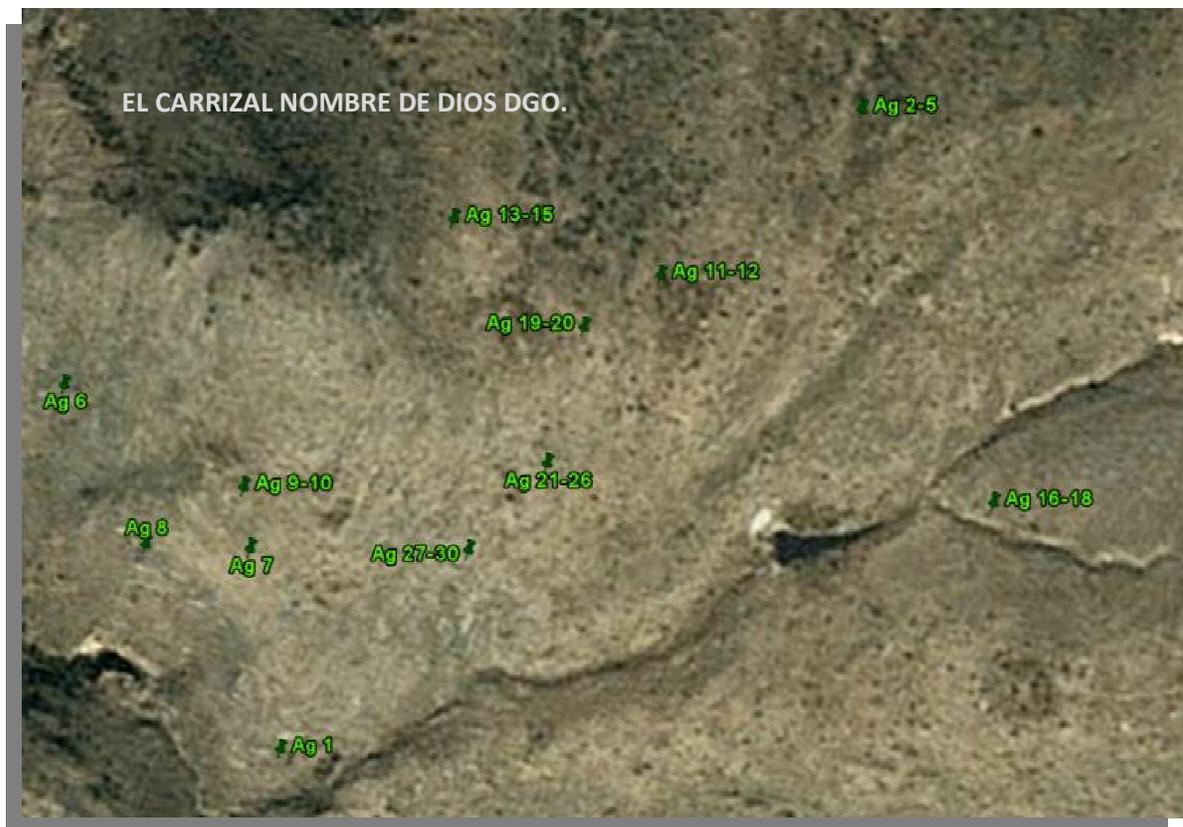


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en El Carrizal en el municipio de Nombre de Dios, Dgo.

5.2.2 Sierra de Registro, Durango

En un área aproximada de 0.227 Km², entre las coordenadas 23°59'26.72"N y 23°59'15.10"N y 104° 22'41.13"O y 104°22'20.66"O, se colectaron al azar 30 individuos, presumiblemente de *A. durangensis*. En la Figura 2 se muestran los sitios alrededor de los cuales se colectaron las muestras.



Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de la población natural de la Sierra de Registro, Durango, Dgo.

5.2.3 Las Mercedes, Cuencamé

En un área aproximada de 0.69 Km², entre las coordenadas 25°01'01.29''N y 24°59'41.85''N y 103°47'03.19''O y 103°44'46.54''O, se colectaron al azar 30 individuos, de *A. asperrima*. En la Figura 3 se muestran los sitios alrededor de los cuales se colectaron las muestras.

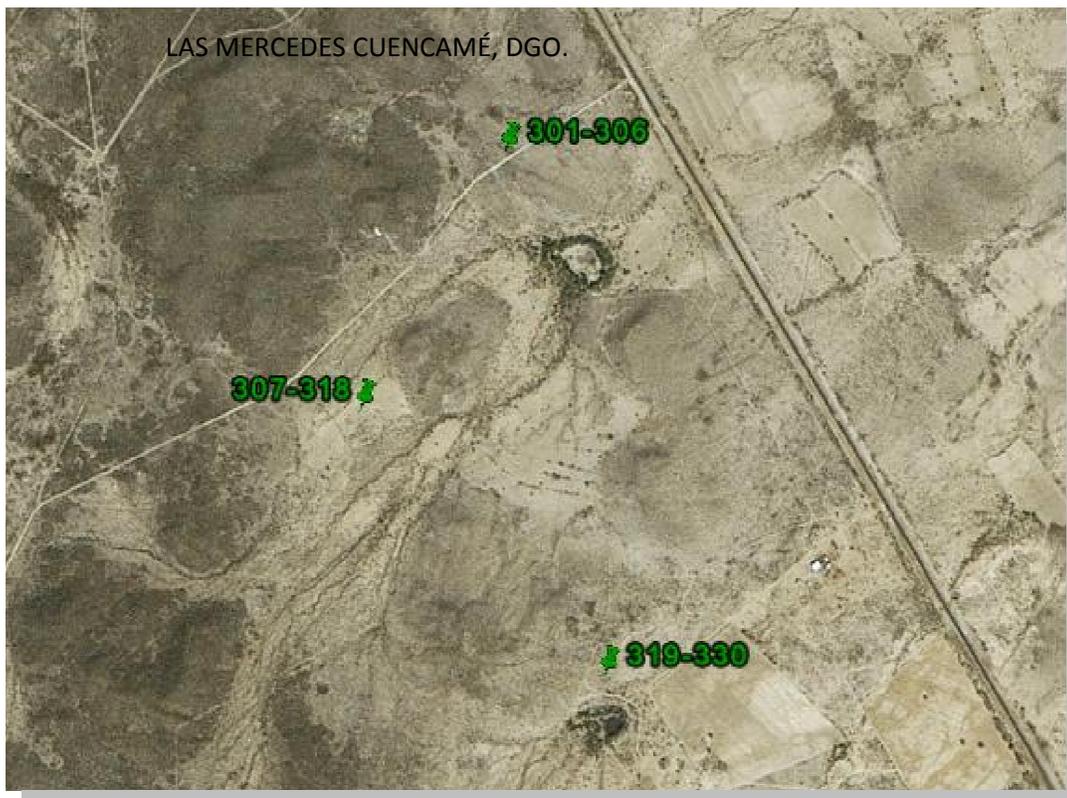


Figura 3. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de Las Mercedes Cuencamé, Dgo.

5.3 Extracción de ADN

Cada muestra de tejido foliar se trabajó de manera individual. El método de extracción utilizado fue el propuesto por Keb-Llanes y col. (2002); modificado en el Laboratorio de Biotecnología del CIIDIR-IPN-DGO. Consistió en lo siguiente:

- Pesar 0.2 g de tejido fresco.
- Homogeneizar con N₂ líquido.
- Agregar 400 µl de buffer A, (Tabla 3), 1200 µl de buffer B (Tabla 4) y 134 µl de una solución de dedocilsulfato de sodio (SDS) al 20%.
- Incubar en baño María a 65°C durante 40 minutos.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 300 µl de una solución de acetato de potasio 3 M.
- Centrifugar a 12300 RPM durante 15 minutos a 4°C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 1V de cloroformo, homogeneizar agitando lentamente.
- Centrifugar durante 10 minutos a 10000 RPM a 25°C.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 0.5V de isopropanol frío e incubar durante 20 minutos en hielo.
- Centrifugar a 12300 RPM durante 10 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla en 500 µl de etanol al 70%, centrifugar 10 minutos a 11000 RPM a 4°C y dejar secar.
- Resuspender en 600 µl de regulador TE (Tris HCL 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.0), y 60 µl de una solución de acetato de sodio a 3 M, 660 µl de isopropanol frío, e incubar 20 minutos en frío.
- Centrifugar a 12300 RPM 10 minutos.
- Agregar 0.5V de isopropanol frío e incubar durante 20 minutos en hielo.
- Centrifugar a 12300 RPM, 10 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y lavar la pastilla en 500 µl de etanol al 70%, centrifugar 10 minutos a 11000 RPM a 4°C y dejar secar totalmente.
- Resuspender en 50 µl de TE y almacenar en congelación a -20°C

Tabla 3. Composición del Buffer A

<i>Buffer A</i>	<i>Concentración</i>
CTAB	2%(P/V)
Tris-HCl	100mM pH 8.0
EDTA	20Mm
NaCl	1.4M
PVP 40	4%(P/V)
Ácido Ascórbico	0.1% (P/V)
β -mercaptoetanol	10mM

Tabla 4. Composición del Buffer B

<i>Buffer B</i>	<i>Concentración</i>
Tris HCl	100 mM pH 8.0
EDTA	50 mM
NaCl	100mM
β –mercaptoetanol	10mM

5.3.1 Cuantificación y determinación de pureza de ADN por espectrometría UV

La determinación de la concentración de las soluciones de ADN obtenidas se determinó por métodos espectrométricos estándares de acuerdo Sambrook y col. (1989). Previamente se realizó una dilución de acuerdo a lo descrito por Infante y col. (2006). El procedimiento se describe a continuación.

- De la solución de ADN en TE, tomar 4 μ l y combinarlos con 496 μ l de H₂O ultrapura (dilución 1/125).
- Determinar los valores de absorbancia a 260 nm usando como blanco H₂O ultrapura.
- Determinar los valores de absorbancia a 280 nm y a 240 nm usando como blanco H₂O ultrapura.

- Estimar la concentración de cada una de las muestras de ADN, de acuerdo a la siguiente relación:

$$1 A = 50 \text{ ng}/\mu\text{l de ADN (Jofuku y Goldberg, 1988)}$$

- Estimar la pureza de acuerdo a las siguientes relaciones (Sambrook y col., 1989):

$$A_{260}/A_{280} \geq 1.8, \text{ para soluciones de ADN con cantidades aceptables de proteínas}$$

$$A_{260}/A_{240} \geq 1.7, \text{ para soluciones de ADN con cantidades aceptables de carbohidratos}$$

5.3.2 Apreciación de la integridad y del tamaño molecular del ADN

La apreciación de la integridad y del tamaño molecular de las muestras de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa (Andrews, 1991). Se prepararon geles de agarosa a una concentración de 0.8%, la cantidad de muestra depositada en los pocillos varió de 7 a 12 μl , el análisis se realizó a un voltaje constante de 80 volts.

5.3.3 Amplificación de fragmentos ISTR por PCR

El protocolo de amplificación utilizado fue el descrito por Infante y col. (2006). Este protocolo requiere preparar soluciones de ADN a una concentración de 25 ng/ μl para preparar las mezclas de amplificación que se utilizaron en la PCR para generar los fragmentos ISTR. Esas soluciones se prepararon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$V_1 C_1 = v_2 C_2$$

Donde:

V_1 : volumen inicial.

C_1 : concentración inicial.

V_2 : volumen final.

C_2 : concentración final.

5.3.3.1 Preparación de mezclas de amplificación

Se usaron tubos para PCR de 0.2 ml. La composición de esa mezcla se presenta en la Tabla 5. El volumen final fue de 20 μ l.

Tabla 5. Composición de la mezcla de amplificación de fragmentos ISTR por PCR

Componente	Concentración
Iniciador F10	0.3 μ M
Iniciador B8	0.3 μ M
Buffer 10x PCR	1x
MgCl ₂ (50mM)	3 Mm
dNTP`s	0.25 Mm
Taq Pol	1U
ADN molde	2 μ l
Volumen final	20 μ l

B8 y F10 fue el par de iniciadores utilizado en este estudio, sus secuencias se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencia del par de iniciadores.

<i>Iniciador o primer</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Secuencia (ADN)</i>
F ₁₀	18 NUCLEOTIDOS	TAA GCA AGC ATC TCG GAG
B ₈	18 NUCLEOTIDOS	ATA CCT TTC AGG GGG ATG

5.3.3.2 Amplificación por PCR

Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Infante y col. (2006) y se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de amplificación para fragmentos ISTR por PCR.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (MIN)	
95	3.00	
95	0.3	40 CICLOS
45	1.00	
72	2.00	
72	10.00	
4	∞	

Las muestras ya amplificadas se mantuvieron en congelación a -20C hasta su uso.

5.3.4 Separación y visualización de los fragmentos ISTR amplificados

Los fragmentos ISTR amplificados se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 6%, de acuerdo a métodos estándar (Sambrook y col., 1989), y se visualizaron por tinción con sales de plata, de acuerdo al método de Sanguinetti y col., (1994).

Las estimaciones de los tamaños moleculares de cada secuencia amplificada se realizaron por comparación de sus movilidades electroforéticas con las correspondientes a las de marcadores de tamaño molecular, por medio de análisis de regresión y de la interpolación en las ecuaciones que describieron la relación entre el tamaño molecular y la movilidad electroforética de las secuencias marcadoras, de acuerdo a lo descrito en el Boletín Técnico MWS-877 (Sigma).

5.4 Análisis numérico

Con los electroferogramas, conteniendo todos los fragmentos de amplificación se elaboraron matrices binarias de presencia/ausencia de bandas (secuencias o loci) vs. número de individuos. Esas matrices se sometieron a análisis de agrupamiento, por medio del programa de cómputo PAST versión 1.86b para generar los dendrogramas correspondientes. Para cada población se calculó también el índice de polimorfismo, de acuerdo a lo descrito por Sosa (2003).

VI. RESULTADOS

6.1 Cuantificación y pureza del ADN obtenido

Los registros de absorbancia a 260 nm y las estimaciones de la concentración correspondiente a cada muestra de ADN de la población de El Carrizal, Nombre de Dios; Sierra de Registro, Durango; y Las Mercedes, Cuencamé se muestran en las Tablas 8, 9 y 10, respectivamente. La variación en los registros de A_{260} nm para *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios, para *Agave durangensis* de Sierra de Registro, Durango, y para *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé se muestran en las Figuras 4, 5 y 6, respectivamente.

Tabla 8. Relación de los valores de absorbancia a 260 nm, 240 nm, y 280 nm; y de las estimaciones de concentración y pureza para cada uno de los individuos de la población natural de *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios, Durango.

Muestra	A ₂₄₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₄₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Concentración (ng/μL)
001	0.095	0.155	0.094	1.631	1.648	968.75
002	0.124	0.205	0.110	1.653	1.863	1281.25
003	0.07	0.107	0.067	1.528	1.597	668.75
004	0.097	0.155	0.095	1.597	1.631	968.75
005	0.110	0.175	0.093	1.590	1.881	1093.75
006	0.112	0.190	0.104	1.696	1.826	1187.50
007	0.065	0.117	0.075	1.800	1.560	731.25
008	0.120	0.173	0.093	1.441	1.860	1081.25
010	0.075	0.115	0.063	1.533	1.825	718.75
011	0.060	0.083	0.050	1.383	1.660	518.75
012	0.087	0.139	0.074	1.597	1.878	868.75
013	0.076	0.112	0.064	1.473	1.750	700.00
014	0.073	0.119	0.074	1.630	1.608	743.75
015	0.080	0.136	0.085	1.700	1.600	850.00
016	0.217	0.305	0.171	1.405	1.783	1906.25
017	0.133	0.216	0.109	1.624	1.981	1350.00
018	0.048	0.090	0.046	1.875	1.956	562.50
019	0.052	0.077	0.043	1.480	1.790	481.25
020	0.092	0.145	0.084	1.576	1.726	906.25
021	0.052	0.072	0.042	1.384	1.714	450.00
022	0.124	0.204	0.110	1.645	1.854	1275.00
023	0.074	0.117	0.077	1.581	1.519	731.25
024	0.086	0.133	0.076	1.546	1.750	831.25
025	0.098	0.176	0.071	1.795	2.478	1100.00
026	0.116	0.191	0.103	1.646	1.854	1193.75
027	0.076	0.131	0.074	1.723	1.770	818.75
028	0.117	0.158	0.119	1.350	1.327	987.50
029	0.069	0.100	0.054	1.446	1.851	625.00
030	0.091	0.164	0.078	1.802	2.102	1025.00

Tabla 9. Relación de los valores de absorbancia a 260 nm, 240 nm, y 280 nm; y de las estimaciones de concentración y pureza para cada uno de los individuos de la población natural de *Agave durangensis* de Sierra de Registro, Durango, Dgo.

Muestra	A ₂₄₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/A240}	A _{260/280}	Concentración (ng/μL)
200	0.147	0.261	0.127	1.78	2.06	1,631.25
201	0.025	0.065	0.026	2.60	2.50	406.25
202	0.107	0.198	0.093	1.85	2.13	1,237.50
203	0.029	0.092	0.019	3.17	4.84	575.00
204	0.016	0.073	0.010	4.56	7.30	456.25
205	0.021	0.079	0.013	3.76	6.08	493.75
206	0.119	0.249	0.096	2.09	2.59	1,556.25
207	0.065	0.155	0.049	2.38	3.16	968.75
208	0.097	0.124	0.072	1.28	1.72	775.00
209	0.111	0.157	0.086	1.41	1.83	981.25
210	0.110	0.151	0.084	1.37	1.80	943.75
211	0.120	0.168	0.062	1.40	2.71	1,050.00
212	0.166	0.244	0.129	1.47	1.89	1,525.00
213	0.109	0.150	0.085	1.38	1.76	937.50
214	0.141	0.201	0.108	1.43	1.86	1,256.25
215	0.123	0.172	0.094	1.40	1.83	1,075.00
216	0.139	0.202	0.110	1.45	1.84	1,262.50
217	0.115	0.159	0.088	1.38	1.81	993.75
218	0.044	0.080	0.038	1.82	2.11	500.00
219	0.145	0.209	0.110	1.44	1.90	1,306.25
220	0.140	0.202	0.107	1.44	1.89	1,262.50
221	0.092	0.127	0.069	1.38	1.84	793.75
222	0.064	0.075	0.046	1.17	1.63	468.75
223	0.105	0.144	0.078	1.37	1.85	900.00
224	0.096	0.127	0.071	1.32	1.79	793.75
225	0.107	0.148	0.079	1.38	1.87	925.00
226	0.214	0.318	0.165	1.49	1.93	1,987.50
228	0.106	0.194	0.092	1.83	2.11	1,212.50
229	0.224	0.344	0.180	1.54	1.91	2,150.00
230	0.196	0.296	0.180	1.51	1.64	1,850.00

Tabla 10. Relación de los valores de absorbancia a 260 nm, 240 nm, y 280 nm; y de las estimaciones de concentración y pureza para cada uno de los individuos de la población natural de *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé, Durango.

Muestra	A ₂₄₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A _{260/240}	A _{260/280}	Concentración (ng/μL)
301	0.091	0.148	0.070	1.63	2.11	925.00
302	0.068	0.128	0.061	1.88	2.10	800.00
303	0.073	0.129	0.061	1.77	2.11	806.25
304	0.071	0.112	0.053	1.58	2.11	700.00
305	0.071	0.126	0.06	1.77	2.10	787.50
306	0.037	0.070	0.031	1.89	2.26	437.50
307	0.227	0.274	0.150	1.21	1.83	1712.50
308	0.166	0.222	0.122	1.34	1.82	1387.50
309	0.083	0.131	0.066	1.58	1.98	818.75
310	0.086	0.135	0.069	1.57	1.96	843.75
311	0.133	0.169	0.091	1.27	1.86	1056.25
312	0.036	0.072	0.032	2.00	2.25	450.00
313	0.114	0.210	0.098	1.84	2.14	1312.50
314	0.037	0.065	0.030	1.76	2.17	406.25
315	0.069	0.097	0.043	1.41	2.26	606.25
316	0.094	0.170	0.079	1.81	2.15	1062.50
317	0.108	0.179	0.087	1.66	2.06	1118.75
318	0.133	0.172	0.084	1.29	2.05	1075.00
319	0.062	0.101	0.046	1.63	2.20	631.25
320	0.097	0.167	0.080	1.72	2.09	1043.75
321	0.133	0.221	0.110	1.66	2.01	1381.25
322	0.104	0.184	0.090	1.77	2.04	1150.00
323	0.154	0.241	0.120	1.56	2.01	1506.25
324	0.099	0.183	0.086	1.85	2.13	1143.75
325	0.072	0.141	0.064	1.96	2.20	881.25
326	0.089	0.151	0.074	1.70	2.04	943.75
328	0.130	0.230	0.113	1.77	2.04	1437.50
329	0.211	0.274	0.156	1.30	1.76	1712.50
330	0.234	0.298	0.175	1.27	1.70	1862.50

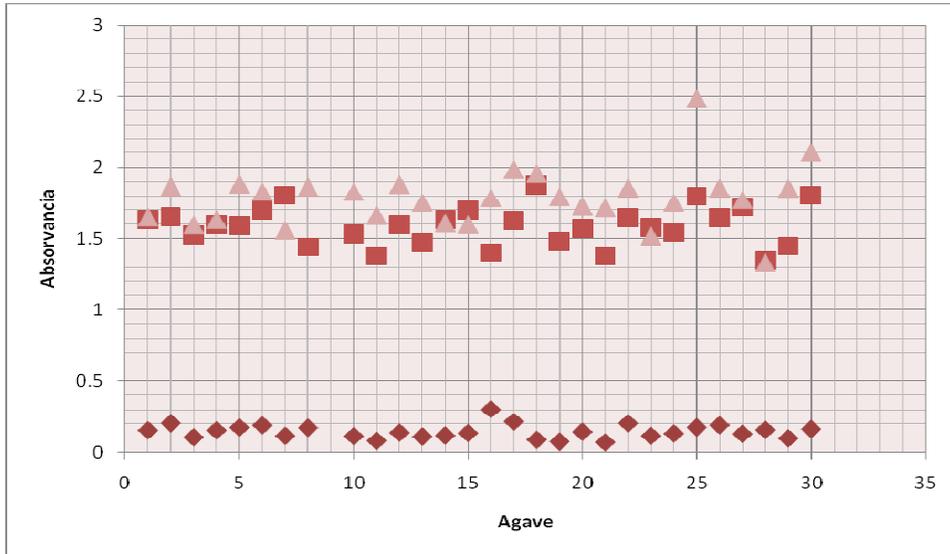


Figura 4. Variación de los valores de absorbancia a 260 nm, y de las relaciones A_{260}/A_{240} y A_{260}/A_{280} de la población de *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios.

◆ Valores de Absorbancia a 260 nm

■ Relacion A_{260}/A_{240}

▲ Relacion A_{260}/A_{280}

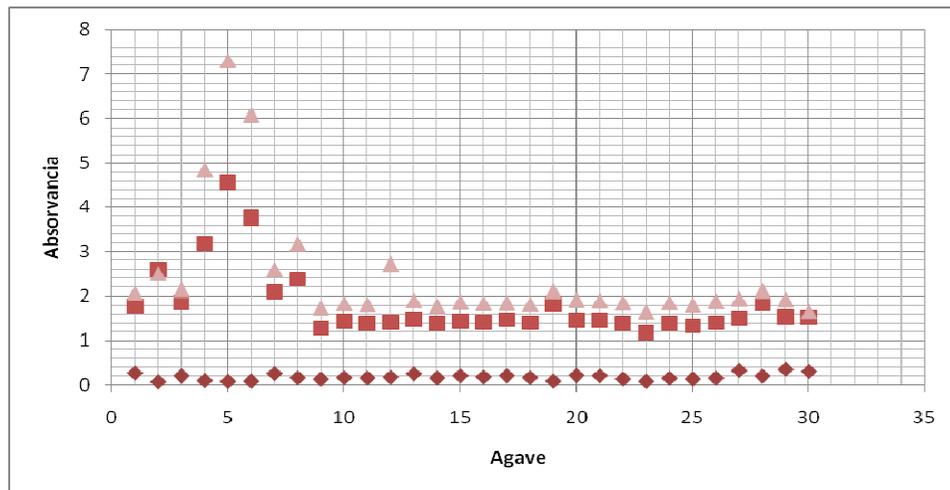


Figura 5. Variación de los valores de absorbancia a 260 nm, y de las relaciones A_{260}/A_{240} y A_{260}/A_{280} de la población *Agave durangensis* de Sierra de Registro, Durango.

◆ Valores de Absorbancia a 260 nm

■ Relacion A_{260}/A_{240}

▲ Relacion A_{260}/A_{280}

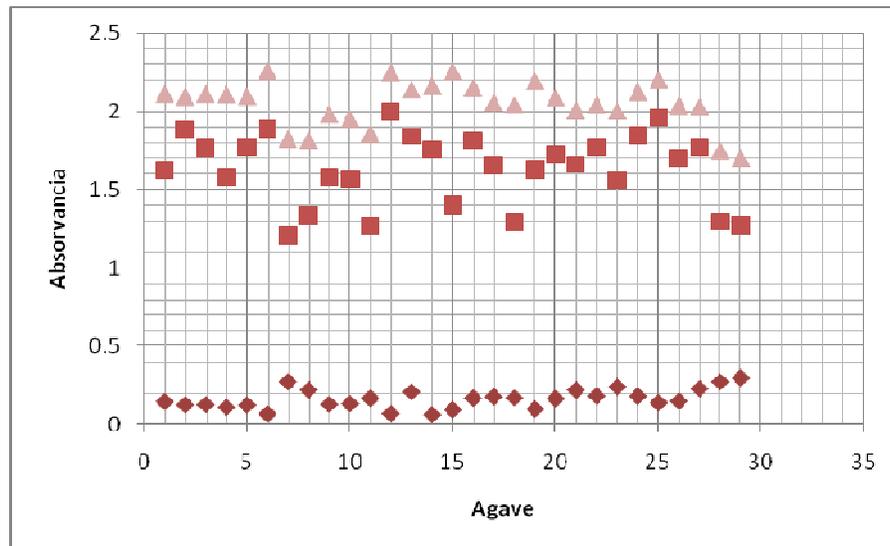


Figura 6. Variación de los valores de absorbancia a 260 nm, y de las relaciones A_{260}/A_{240} y A_{260}/A_{280} de la población de *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé.

- ◆ Valores de Absorbancia a 260 nm
- Relacion A_{260}/A_{240}
- ▲ Relacion A_{260}/A_{280}

Los valores de las lecturas de A_{280} y A_{240} , y de las proporciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{240} para las muestras de ADN de *Agave durangensis* de la población de El Carrizal, de *Agave durangensis* de Sierra de Registro, y de *Agave asperrima* de Las Mercedes se muestran en las Tablas 8, 9 y 10, respectivamente. La variabilidad en las lecturas de A_{280} y A_{240} por población se muestran en las Figuras 4,5 y 6, en el mismo orden anterior.

Las estimaciones promedio de pureza de ADN por población se muestran en las Tablas 11, 12 y 13, de *Agave durangensis* de la población de El Carrizal, de *Agave durangensis* de Sierra de Registro, y de *Agave asperrima* de Las Mercedes, respectivamente.

Tabla 11. Estimaciones promedio de la pureza de las muestras de ADN de *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios.

Criterio de pureza	Valor
A_{260}/A_{240}	1.5912 ± 0.1364
A_{260}/A_{280}	1.7811 ± 0.2067

Tabla 12. Estimaciones promedio de la pureza de las muestras de ADN de *Agave durangensis* de la Sierra del Registro, Durango.

Criterio de pureza	Valor
A_{260}/A_{240}	1.7955 ± 0.7822
A_{260}/A_{280}	2.4055 ± 1.3270

Tabla 13. Estimaciones promedio de la pureza de las muestras de ADN de *Agave asperrima* de las Mercedes, Cuencamé.

Criterio de pureza	Valor
A_{260}/A_{240}	1.6357 ± 0.2249
A_{260}/A_{280}	2.0526 ± 0.1452

En las Figuras 7, 8 y 9, se muestran algunos ejemplos de los espectros de absorción de las soluciones de ADN obtenido de individuos de las tres poblaciones de *Agave* analizadas.

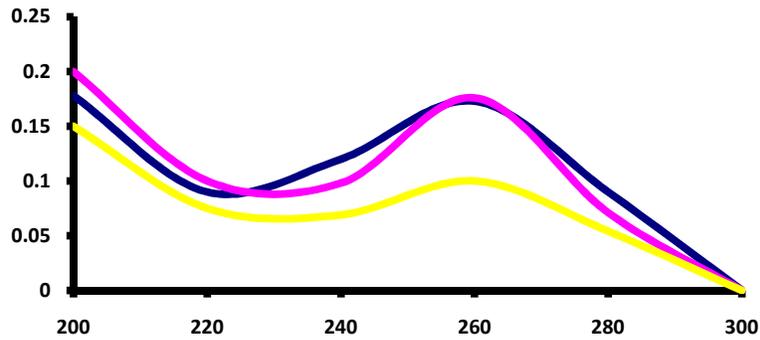


Figura 7. Espectros de absorción UV de tres muestras de ADN de la población de El Carrizal, Nombre de Dios Dgo.

— Ag 008 — Ag 025 — Ag 029

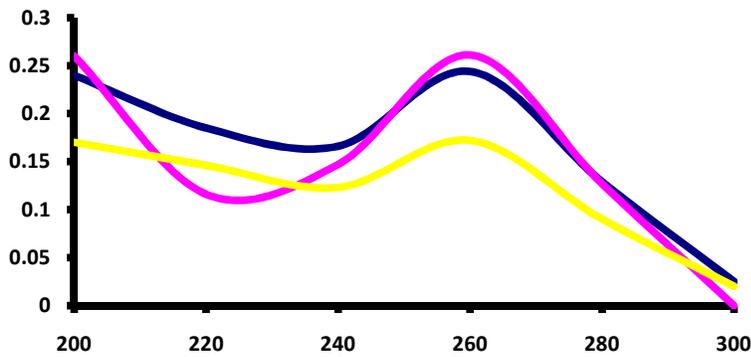


Figura 8. Espectros de absorción UV de tres muestras de ADN de la población de Sierra del Registro.

— Ag 201c — Ag 207a — Ag 220

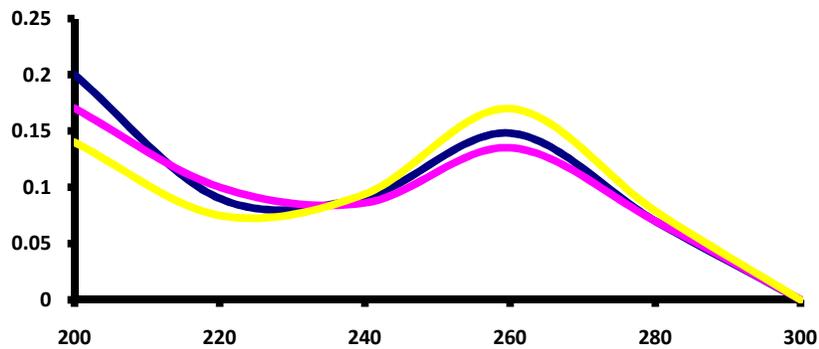


Figura 9. Espectros de absorción UV de tres muestras de ADN de la población de Las Mercedes Cuencamé.

— Ag 301 — Ag 310 — Ag 316

6.2 Apreciación del tamaño molecular e Integridad de las muestras de ADN

La estimación del tamaño molecular y la integridad de las muestras de ADN analizadas se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Los electroferogramas de las muestras de ADN de los individuos de las tres poblaciones se muestran en las Figuras 10, 11, 12 y 13



Figura 10. Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población de El Carrizal, Nombre de Dios. Muestras de izquierda a derecha individuos correspondiente a 003, 024, 026, 012,013, 014, 022 y 018.

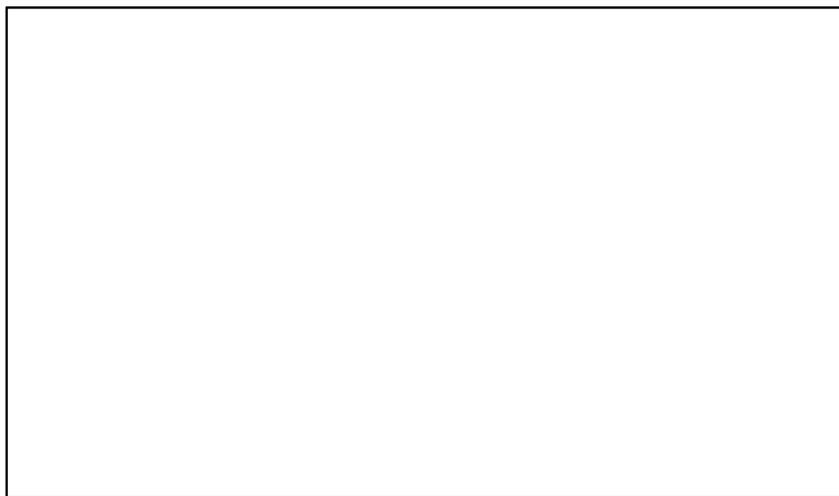


Figura 11. Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población natural de El Carrizal, Nombre de Dios. Muestras de izquierda a derecha de los individuos correspondientes a 029, 001, 002, 010, 011, 015, 016, 020 y 021.

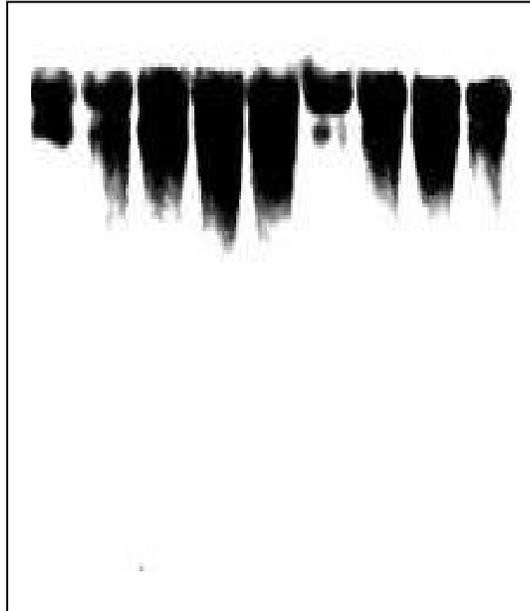


Figura 12. Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población natural de la Sierra de Registro, Durango. Muestras de izquierda a derecha correspondientes a los individuos 214, 215, 210, 205, 220, 216, 212, 203 y 201.

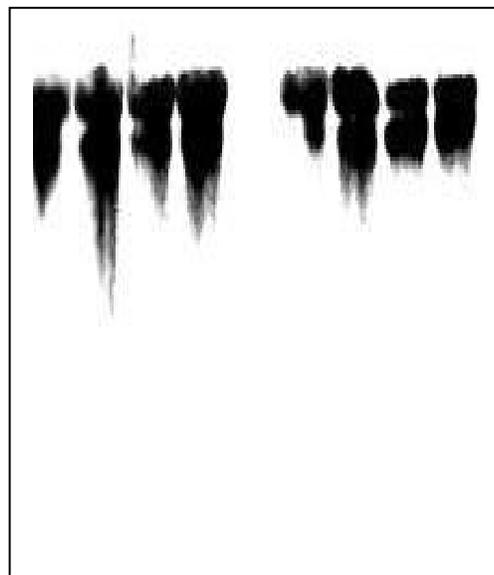


Figura 13. Gel de agarosa al 0.8% con muestras de la población natural de la Sierra del Registro, Durango. Muestras de izquierda a derecha correspondientes a los individuos 211, 213, 202, 208, 209, 221, 225 y 226.

6.3 Perfiles electroforéticos de amplificación

La amplificación de las secuencias ISTR se realizaron por la técnica de PCR, se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 6%, y se visualizaron por medio de tinción con sales de plata. En las Figuras 14 a 16 se muestran los electroferogramas de los individuos de *Agave durangensis* muestreados en la población de El Carrizal, Nombre de Dios; en las Figuras 17 y 18, los correspondientes a los individuos de *Agave durangensis* de La Sierra de Registro, Durango; y en las Figuras 19 y 20, a los individuos de *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé.

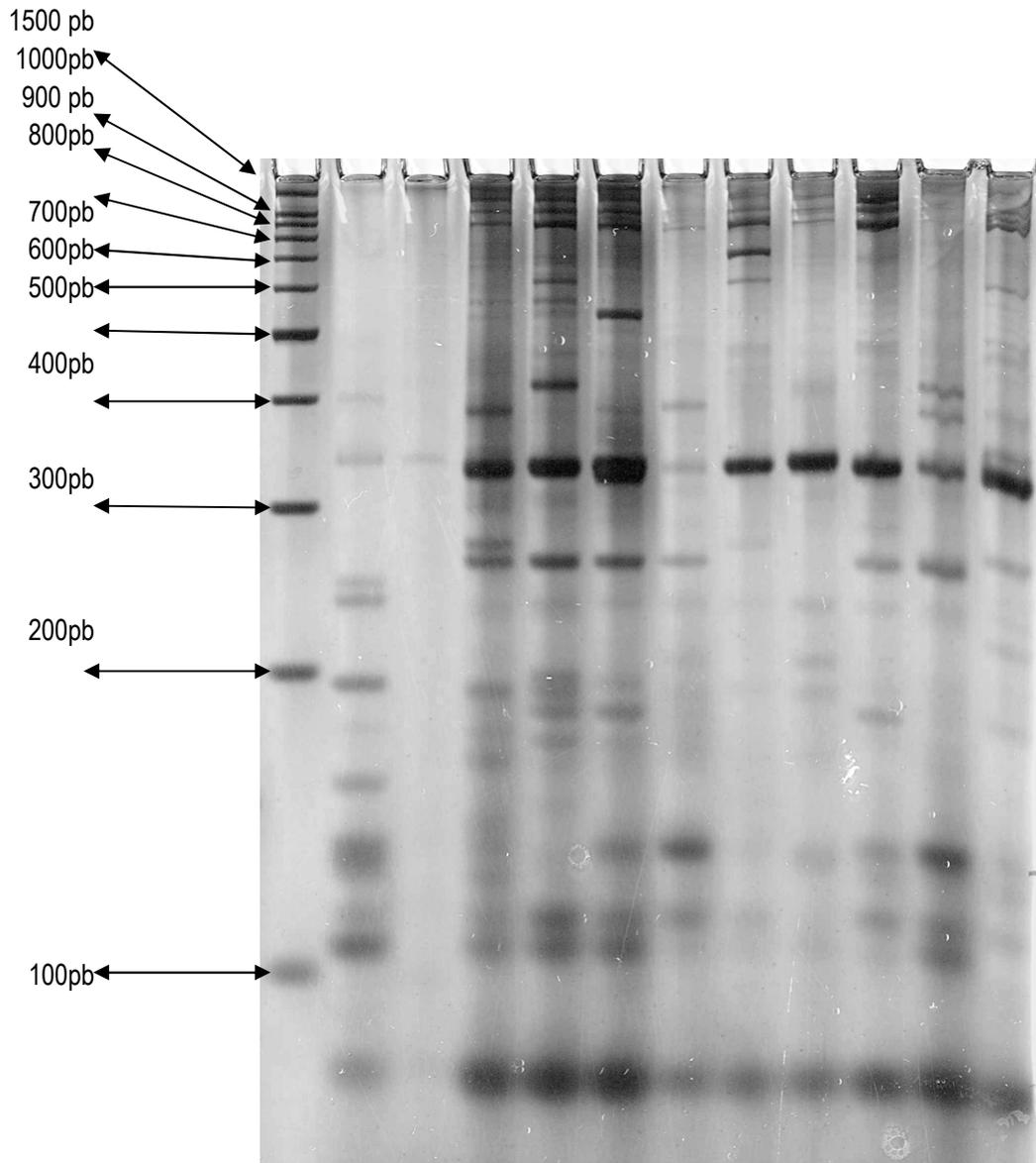


Figura 14. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave durangensis* de la población natural de El Carrizal, Nombre de Dios. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular (M), carril 2: individuo 001, carriles 4 a10: individuos 002 a 008, carriles 11 y 12: individuos 010 y 011.

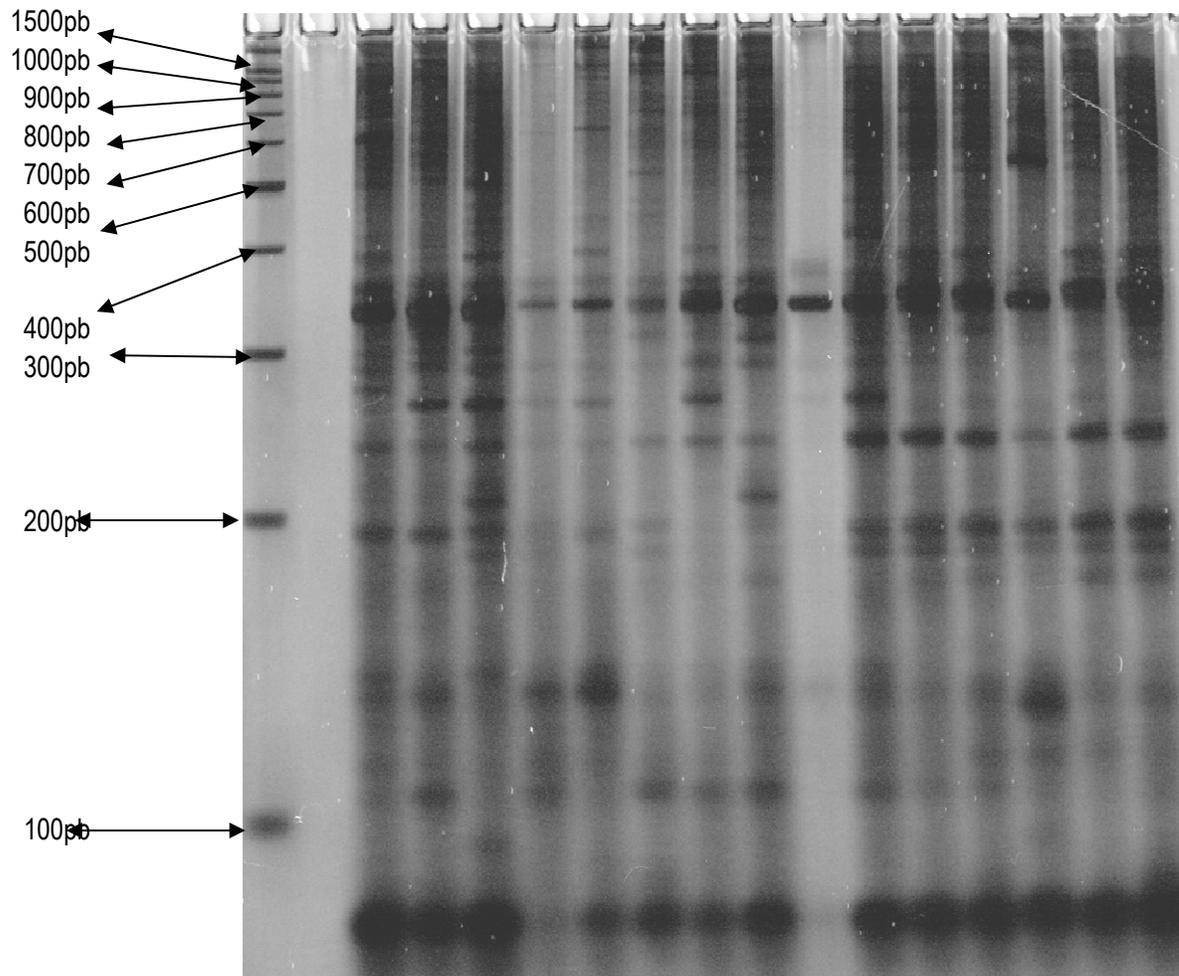


Figura 15. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave durangensis* de la población natural de El Carrizal, Nombre de Dios. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular (M), carriles 3 al 13: individuo 012 al 022, carril 14: individuo 024, carril 15: individuo 027, carril 16: individuo 026 y carril 17: individuo 025.

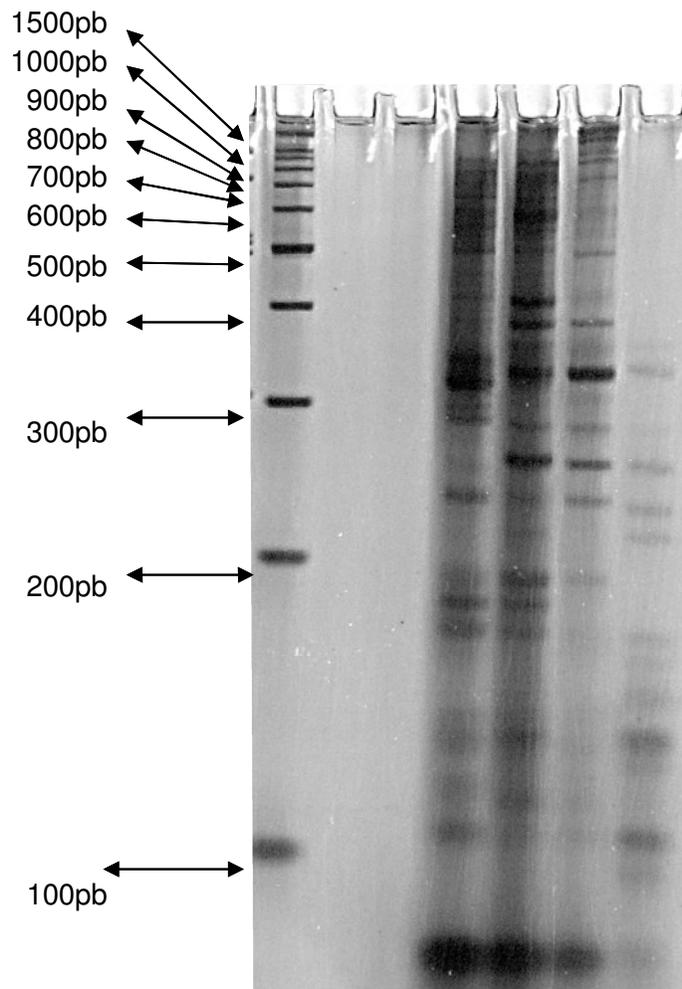


Figura 16. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave durangensis* de la población natural de El Carrizal, Nombre de Dios. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular (M), carril 4: individuo 023, carriles 5 a7: individuos 028 a 030.

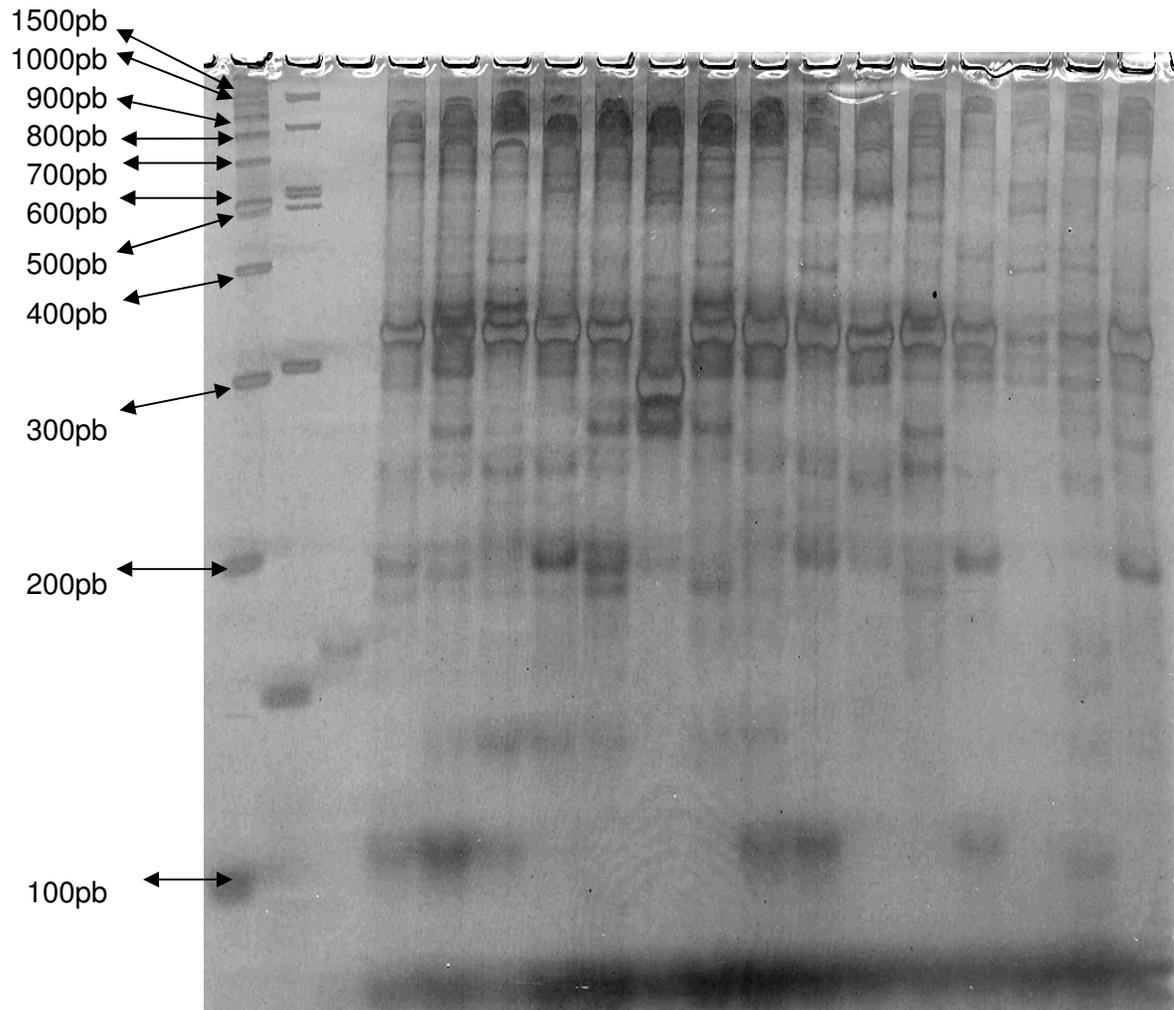


Figura 17. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave durangensis* de la población natural de la Sierra de Registro, Durango. De derecha a izquierda, carriles 1 al 15: individuos 201 al 215, carriles 16 y 17 marcadores de peso molecular (M).

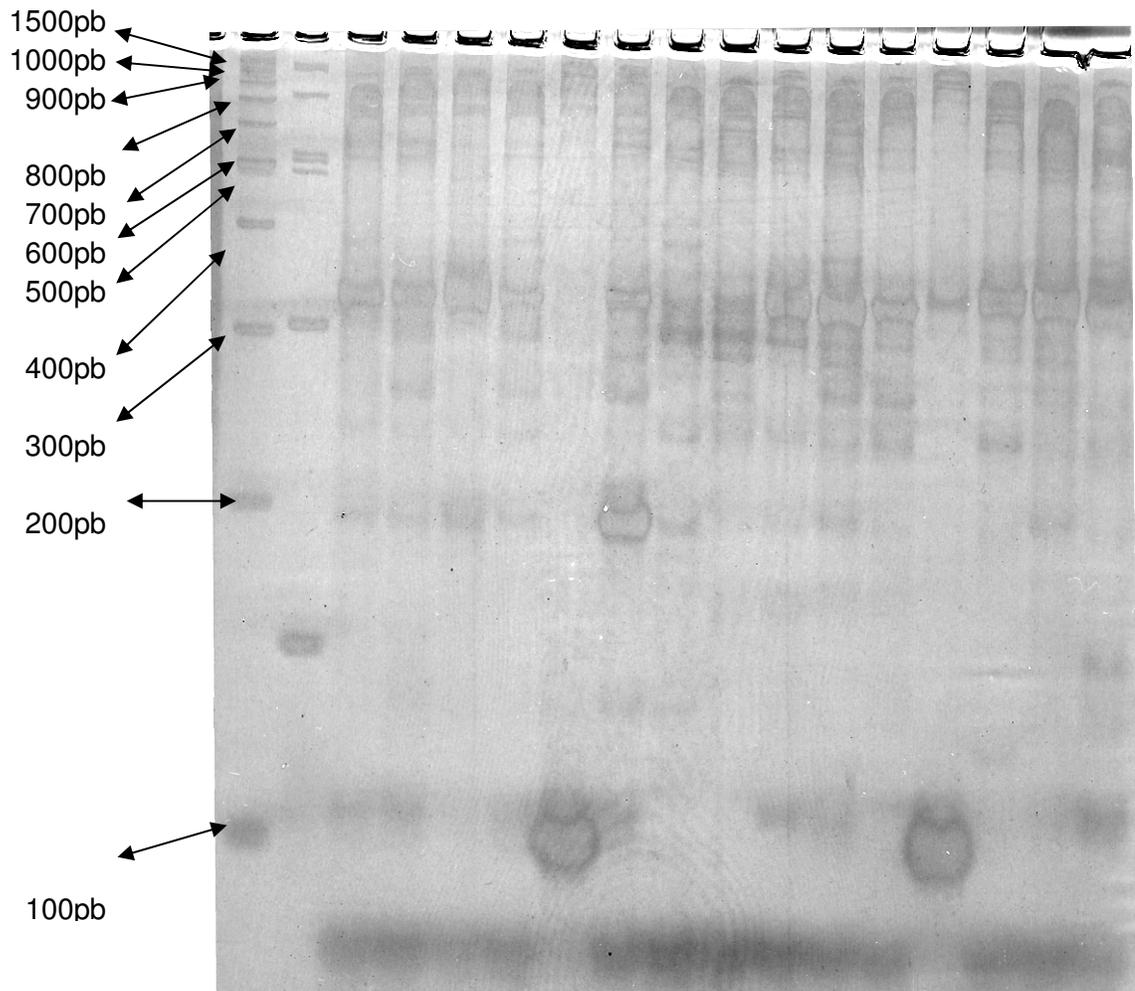


Figura 18. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave durangensis* de la población natural de la Sierra de Registro, Durango. De izquierda a derecha, carriles 1 y 2: marcadores de peso molecular (M), carriles 3 al 13: individuos 216 al 226, carril 14: individuo 200, carriles 15 al 17: individuos 228 al 230.

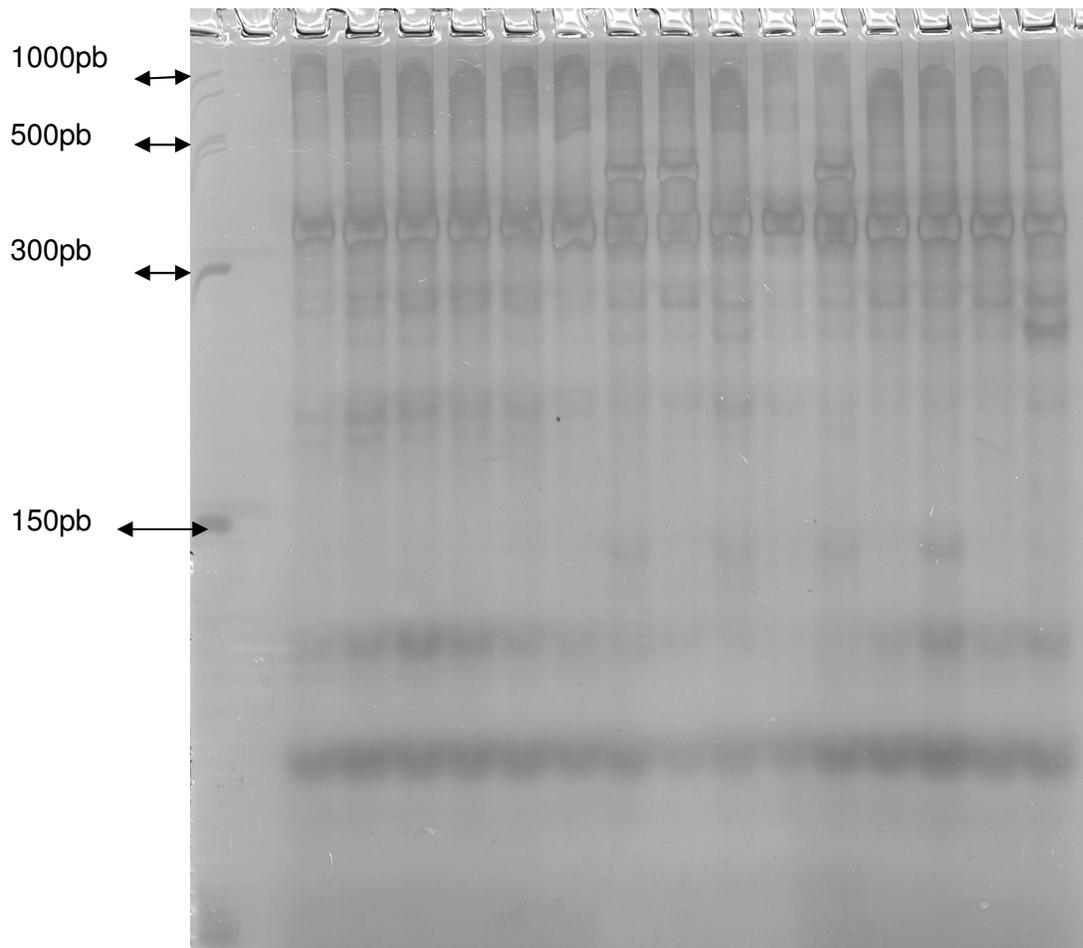


Figura 19. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave asperrima* de la población natural de las Mercedes, Cuencamé. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular (M), carriles 3 al 17: individuos 301 al 315.

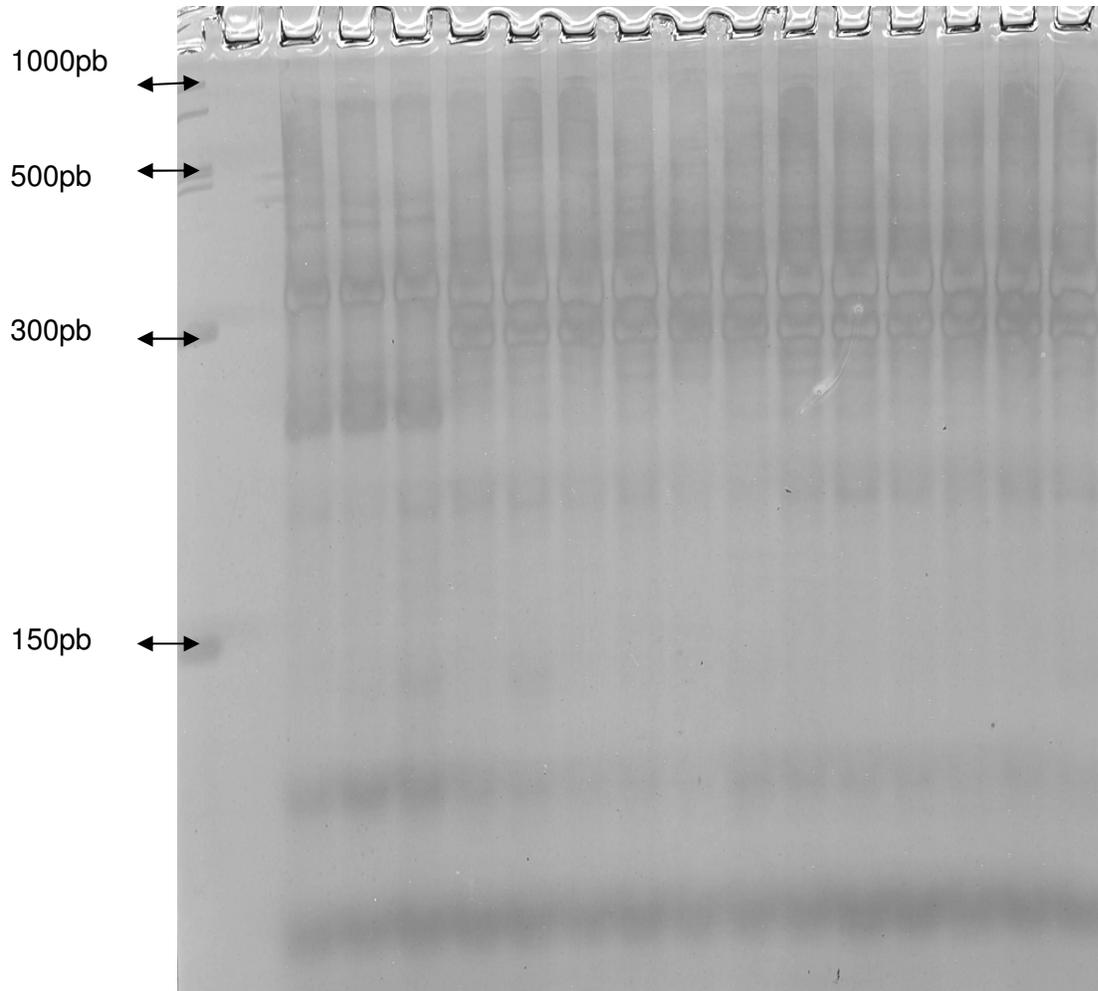


Figura 20. Patrón electroforético de los productos de PCR a partir de ADN obtenido de las muestras de *Agave asperrima* de la población natural de las Mercedes, Cuencamé. De izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular (M), carriles 3 al 17: individuos 316 al 330.

Las tablas 14, 15 y 16 muestran la relación de los fragmentos ISTR amplificados con los iniciadores F₁₀ y B₈ para cada una de las poblaciones analizadas y los tamaños moleculares correspondientes.

Tabla 14. Matriz binaria (presencia/ausencia) para la población natural de *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios, a partir de las Figuras 14, 15 y 16.

Frag.	TM calculado (pb)	TM																													
		001	002	003	004	005	006	007	008	010	011	012	013	014	015	016	017	018	019	020	021	022	024	027	026	025	023	028	029	030	
1	2069	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
2	1582	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
3	1308	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
4	1129	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
8	765	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
11	600	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
13	538	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	
15	508	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	
17	470	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
22	400	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	
26	360	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
27	346	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
30	314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
31	308	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
35	286	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
36	281	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
39	256	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
41	229	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
43	213	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
46	202	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
48	188	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
49	174	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
50	146	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	
53	124	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
54	113	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	
59	78	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
total		9	16	16	13	11	12	8	12	13	12	9	11	12	9	11	8	10	11	6	16	14	14	10	9	8	18	18	16	10	

TM: tamaño molecular

Tabla 15. Matriz binaria (presencia/ausencia) de fragmentos ISTR amplificados por PCR, a partir de las Figuras 17 y 18, para la población natural de *Agave durangensis* de La Sierra de Registro, Durango.

Frag.	TM calculado (pb)	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	228	229	230
		6	904	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
7	827	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
9	714	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
11	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
14	523	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
16	482	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
17	470	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
25	364	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	360	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
27	346	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	339	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	308	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
36	281	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
37	275	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
40	251	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
45	206	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
49	174	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
51	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
55	99	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
total		10	11	9	8	10	9	11	8	9	8	11	11	12	13	10	9	10	7	8	3	9	8	10	10	8	10	7	12	9	10

TM: tamaño molecular

Tabla 16. Matriz binaria (presencia/ausencia) de los fragmentos ISTR amplificados por PCR, a partir de las Figuras 19 y 20, para la población referencia de *Agave asperrima* ubicada en Las Mercedes, Cuencamé.

Frag.	TM calculado (pb)	330	329	328	327	326	325	324	323	322	321	320	319	318	317	316	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	
		6	904	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
7	827	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
11	600	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13	538	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	
14	523	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	508	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	
18	448	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	
20	428	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
21	409	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
23	392	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
24	376	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
29	320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
34	291	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
42	221	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	213	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
44	209	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
57	94	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
total		9	9	10	10	12	12	12	9	10	9	12	9	10	10	10	10	10	10	10	10	11	10	10	11	10	9	14	9	11	10	10

TM: tamaño molecular

6.4 Análisis de agrupamiento y variabilidad

Con los electroferogramas resultantes de los análisis electroforéticos de cada población se elaboraron los perfiles de amplificación ISTR de cada individuo, de cada población y de cada especie de *Agave* analizada. Con los perfiles ISTR se elaboraron las matrices binarias de presencia/ausencia de cada secuencia ISTR amplificada vs. cada individuo analizado. Las tablas 14, 15 y 16 muestran las matrices de *Agave durangensis* de la población de El Carrizal, Nombre de Dios, de *Agave durangensis* de la población de la Sierra de Registro, y de *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé, respectivamente.

Con los perfiles de amplificación se calculó también el nivel de polimorfismo. La tabla con los valores para cada población se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Índices de polimorfismo de cada una de las poblaciones analizadas

POBLACION	BANDAS POLIMORFICAS	BANDAS NO POLIMORFICAS	POLIMORFISMO
EL CARRIZAL (1-30)	26	2	92.30%
EL REGISTRO (200-230)	20	0	100%
LAS MERCEDES (300-330)	18	4	77.77%

Las matrices binarias fueron sometidas a análisis de agrupamiento. Los dendrogramas obtenidos se muestran en las figuras 21, 22 y 23, para la comparación de las tres poblaciones de *Agave* analizadas, para la comparación entre *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios y *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé; y para la comparación de *Agave durangensis* de Sierra de Registro, Durango y *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé, respectivamente.

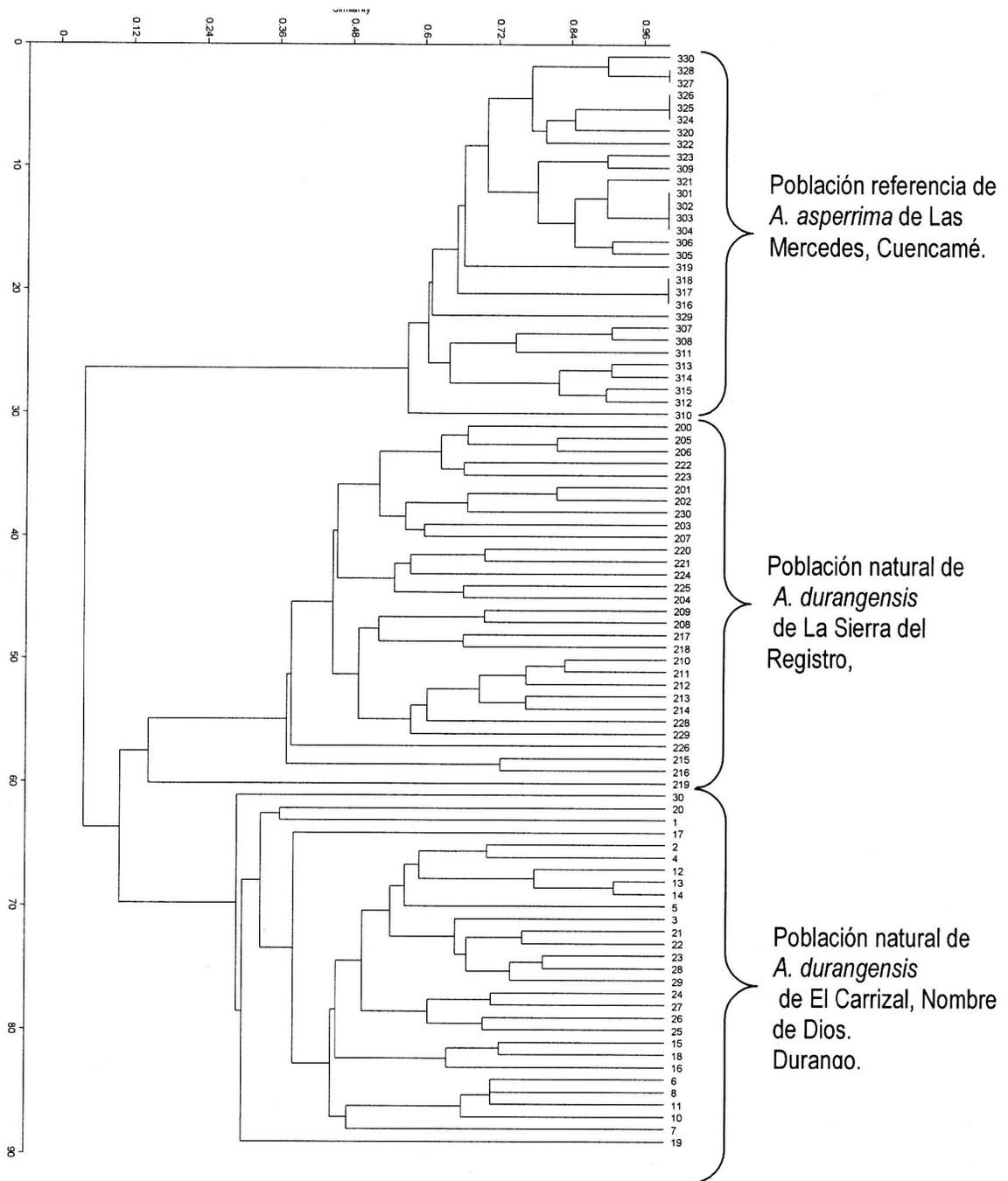


Figura 21. Dendrograma correspondiente a la matriz binaria considerando todos los fragmentos ISTR amplificados y todos los individuos analizados de las tres poblaciones de estudio.

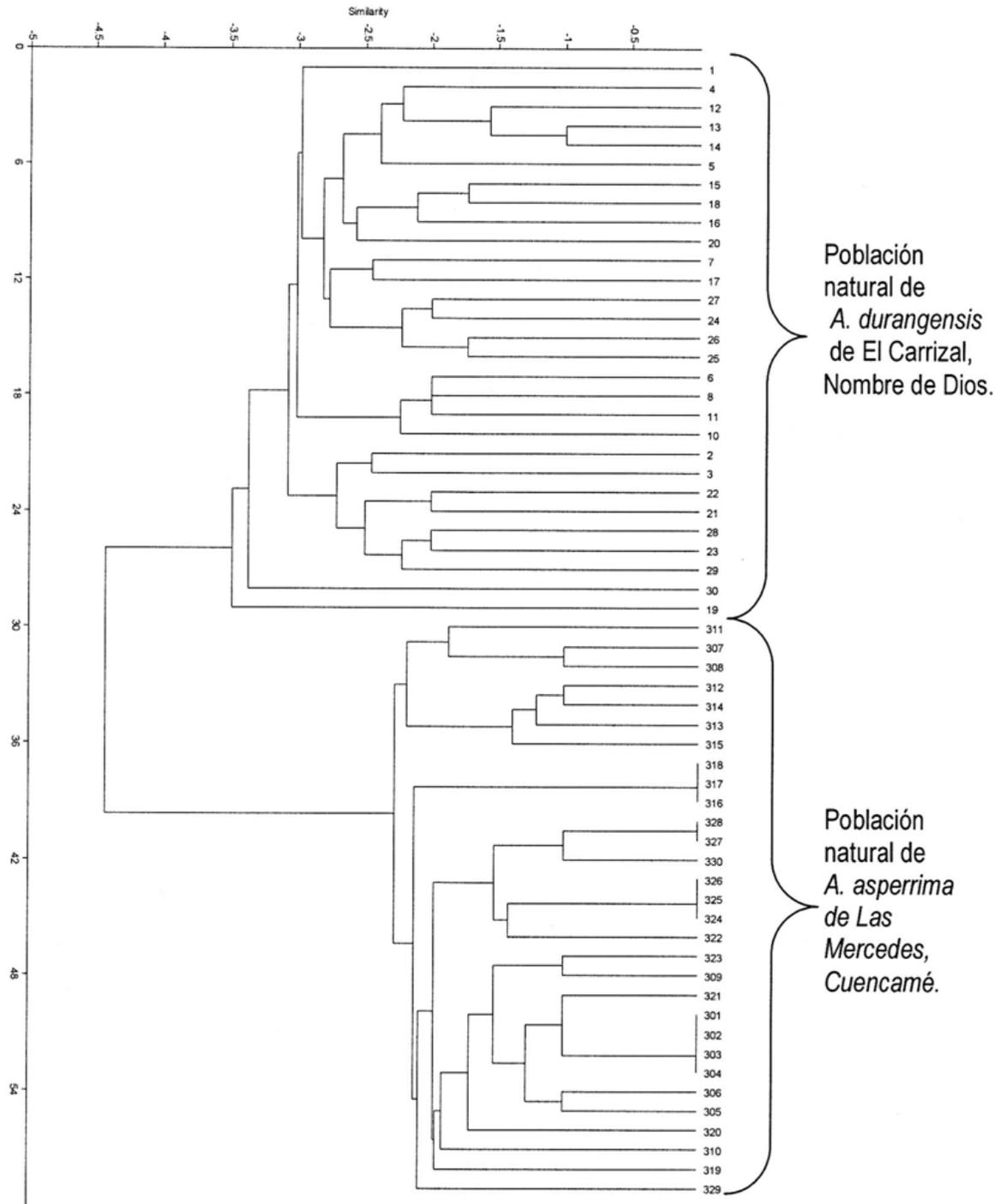


Figura 22. Dendrograma de comparación de las poblaciones de *Agave asperima* de Las Mercedes, Cuencamé y *Agave durangensis* de El Carrizal, Nombre de Dios.

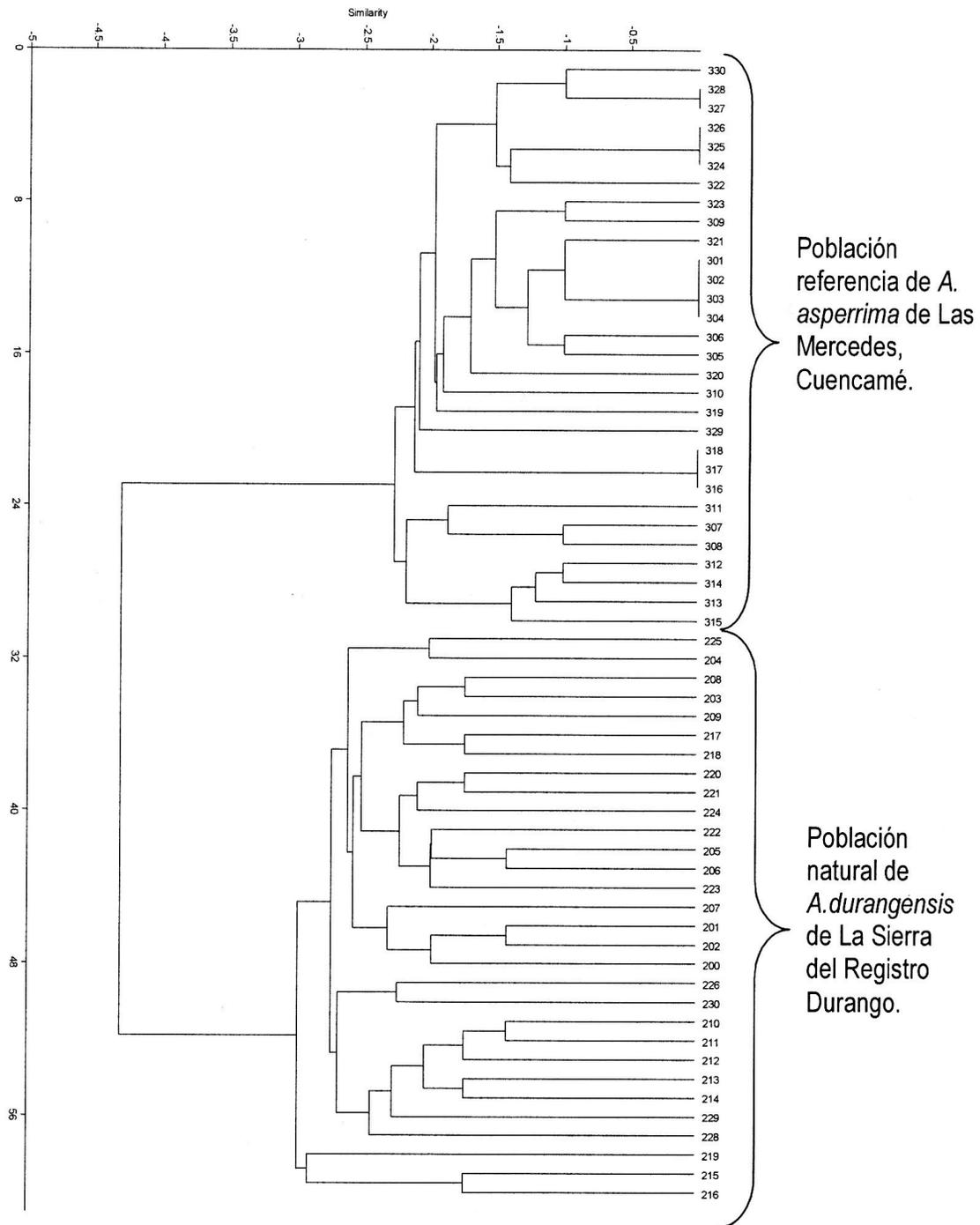


Figura 23. Dendrograma de la comparación de las poblaciones de *Agave asperima* de Las Mercedes, Cuencamé y de *Agave durangensis* de la Sierra de Registro en Durango.

VII. DISCUSIÓN

7.1 Cuantificación y pureza del ADN obtenido

La cantidad de ADN obtenido para la población natural de El Carrizal, en el municipio de Nombre de Dios, varió de 450 a 1906.25 ng/ μ l, con un promedio de 918.10 ± 312.78 (Tabla 8, Figura 4). Para la población de Sierra de Registro el valor mínimo obtenido fue de 406.25 y el máximo de 2150.00 ng/ μ L, con un promedio de 1075.83 ± 455.43 (Tabla 9, Figura 5); mientras que para la población de *Agave asperrima* de Las Mercedes, Cuencamé, la cantidad de ADN obtenido varió de 437.50 a 1712.50 ng/ μ L, con un promedio de 1075.83 ± 455.435 (Tabla 10, Figura 6). La concentración promedio de ADN de doble hebra de las tres poblaciones estudiadas fue de 1009.47 ng/ μ l. En todos los casos la cantidad obtenida fue más que suficiente para realizar los análisis de ISTR, ya que el método correspondiente requiere una concentración de 25ng/ μ l.

De acuerdo a Sambrook y col (1989) una solución de ADN con un valor de la proporción A_{260}/A_{280} mayor a 1,8 es un ADN que contiene una cantidad de proteínas contaminantes que no interfieren en los análisis moleculares con PCR o con enzimas de restricción. Los valores de esa proporción para las muestras de ADN de *Agave durangensis* de la población de El Carrizal, se muestran en la Tabla 8. En ella se puede observar que no todas las muestras cumplen con ese criterio de pureza con respecto a proteínas, sin embargo todas las muestras pudieron ser amplificadas por medio de PCR para generar los perfiles ISTR. Esto confirma lo manifestado por otros autores (Infante y col.,2006) acerca de que una de las ventajas de los marcadores ISTR es que no requiere ADN de alta pureza. Los valores de la proporción A_{260}/A_{280} para las muestras de las poblaciones de *Agave durangensis* de la Sierra de Registro y de *Agave asperrima* de Las Mercedes se muestran en las tablas 9 y 10 respectivamente. En ellas se puede observar algo semejante a lo descrito para la población de El Carrizal.

La contaminación de ADN con residuos de carbohidratos puede ser un problema importante que no permite la amplificación de secuencias por PCR (Sosa, 2003). La contaminación de muestras de ADN con ese tipo de compuestos se puede estimar con los valores de la proporción A_{260}/A_{240} , valores mayores de 1.7 indican una proporción adecuada de ADN con respecto a carbohidratos (Sambrook y col., 2006). Los valores de esa proporción para las muestras de El Carrizal, Sierra de Registro y Cuencamé se presentan en las Tablas 8, 9 y 10, respectivamente. En ellas se observa que, como en el caso de la estimación de contaminación con proteínas, no todas las muestras cumplieron con el criterio de pureza, sin embargo, todas pudieron utilizarse para amplificar secuencias ISTR por medio de PCR.

Además de las proporciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{240} para estimar la pureza de las muestras de ADN obtenidas en este estudio, se registraron los espectros de absorción UV de cada una de ellas para tener una imagen más clara de su pureza. La forma de los espectros UV de la mayoría de las muestras de ADN analizadas tuvieron la forma mostrada en las Figuras 7, 8 y 9, las cuales tienden a ser una curva normal, indicando que se trata de muestras de ADN con un grado de pureza adecuado para analizarse con PCR.

7.2 Tamaño molecular e Integridad de las muestras de ADN

En los análisis electroforéticos los elementos de una muestra que tienen un tamaño molecular grande quedan rezagados durante la migración con relación a los elementos de tamaño molecular pequeño (Andrews, 1991). Los electroferogramas de las muestras de ADN de este estudio (Figuras 10, 11, 12 y 13) muestran bandas definidas cerca de los pocillos de depósito de muestras de los geles de agarosa al 0.8%, lo que indica que las muestras de ADN tuvieron una migración electroforética muy baja y por lo tanto un tamaño molecular alto, lo cual es deseable en todo estudio molecular.

La evaluación de la integridad de muestras de ADN se realizó por medio de análisis electroforéticos en geles de agarosa al 0.8%. La intensidad de un fondo o barrido (background) es indicativo del grado de integridad de una muestra de ADN. En las muestras de ADN de los diferentes individuos analizados en este estudio se observó un barrido mínimo (Figuras 10 a 13), lo que indica que esas muestras no sufrieron una degradación considerable durante el proceso de aislamiento. Lo cual es deseable en cualquier estudio molecular, ya que la detección de marcadores por medio de la técnica de PCR, se basa en la amplificación de secuencias determinadas complementarias a los iniciadores que se empleen, y si existe una alta proporción de degradación existirá una probabilidad mayor de que las secuencias complementarias se encuentren fragmentadas y no permitan la amplificación.

7.3 Perfiles ISTR

La reproducibilidad y consistencia de los perfiles ISTR de cada individuo analizado se demostró amplificando cada muestra de ADN con la misma combinación de iniciadores por duplicado y en diferentes días. Los perfiles fueron reproducibles.

Un total de 60 fragmentos o loci fueron amplificados a partir de todas las poblaciones analizadas. Veintiséis fragmentos o loci ISTR de tamaños moleculares que variaron de 78 pb a 2069 pb, a fueron amplificados para los individuos, asumidos, con una base morfológica como *Agave durangensis*, de la población de El Carrizal (Tabla 14, Figuras 14,15 y 16). Estos valores sugieren que la longitud de las secuencias de retrotransposones del tipo *copia-like* en los que están basados los marcadores ISTR pueden variar de 78 pb a 2069 pb en la población de *Agave durangensis* de El Carrizal. Veinte secuencias ISTR, de 99 pb a 904 pb fueron amplificadas para los individuos de *Agave durangensis* de Sierra de Registro (Tabla 15, Figuras 17 y 18). Para esta población, que representa la localidad "Tipo" (Gentry, 1982), la longitud de las secuencias de retrotransposones varió de 99 pb a 904 pb. El número de loci ISTR

amplificados para la población de referencia *A. asperrima*, de Las Mercedes, Cuencamé, fue 18, los cuales variaron en tamaño de 61pb a 904 pb.

Los resultados obtenidos para las especies de *Agave* analizadas en este estudio contrastan con los reportados para otras especies de plantas caracterizadas con marcadores ISTR (Rohde, 1996; Demey y col., 2004; Sensi y col., 1996), en los que se informa de un número más elevado de secuencias amplificadas, particularmente con los reportados para *Agave fourcroydes*, en la cual de 94 a 111 loci fueron detectados (Demey y col., 2004). Los resultados de este estudio también contrastan con los 43 a 135 loci amplificados con AFLPs para ocho especies de *Agave* (Infante y col., 2006) y con las 93 a 262 loci amplificadas también con AFLPs de algunas variedades de *Agave tequilana* (Gil-Vega y col., 2006), pero están de acuerdo con los resultados de Torres y col., (2007) obtenidos con diferentes plantaciones de *Agave tequilana* Weber var. azul, quienes reportaron perfiles ISTR formados por 35 loci, usando el mismo par de iniciadores que en el presente estudio; y con los resultados de Infante y col. (2006), quienes reportan 24 a 48 loci amplificados obtenidos con marcadores ISTR en ocho especies de *Agave*.

Cierta variabilidad en los perfiles individuales en cada una de las tres poblaciones analizadas en este estudio fue detectada. Para *Agave durangensis* de la población de El Carrizal, los perfiles individuales variaron de 18 en los individuos 023 y 028 a 8 en los individuos 007, 017 y 025 (Tabla 14). Para esta misma especie pero de la población de Sierra de Registro, los perfiles individuales variaron de 13 en el individuo 213 a 3 en el individuo 219 (Tabla 15); mientras que para *Agave asperrima*, esa variación osciló entre 14 fragmentos en el individuo 311 a 9 en los individuos 310, 312, 319, 321, 323, 329 y 330 (Tabla 16). La mayor variabilidad en los perfiles ISTR individuales se encuentra en *Agave durangensis* de la población de la Sierra de Registro, Durango, y la mayor homogeneidad se detectó para *Agave asperrima*,

encontrándose incluso 12 individuos (Figura 23) genéticamente homogéneos con respecto a los marcadores ISTR.

A pesar de la variabilidad individual detectada en los perfiles ISTR se pudieron encontrar fragmentos como el de 78 pb (Tabla 14), que se encuentra presente en todos los individuos de *Agave durangensis* de la población de El Carrizal, el cual podría representar un marcador poblacional con el cual tipificarla. Sin embargo, bajo las condiciones de análisis de este trabajo para la población de *Agave durangensis* de la localidad Tipo, no se encontró ningún loci que estuviera presente en todos los 30 individuos analizados (Tabla 15), lo que sugiere una alta variabilidad genética en esa población (comparada con la encontrada en *Agave asperrima*, mencionada a continuación). Esa variación genética podría estar reflejando un proceso de evolución actual en este taxón. Contrario al caso de *Agave durangensis*, la especie de referencia, *Agave asperrima*, mostró cuatro loci (de 392, 376, 94 y 61pb) que se encuentran en todos los 30 individuos analizados (Tabla 16), los cuales además de sugerir una mayor homogeneidad genética podrían considerarse como marcadores poblacionales típicos.

7.4 Capacidad de los marcadores ISTR para detectar variabilidad intrapoblacional e interpoblacional y para discriminar entre poblaciones y especies de *Agave*

La variabilidad intrapoblacional en los perfiles ISTR de *Agave durangensis* y *Agave asperrima* puede apreciarse en las matrices binarias de las Tablas 14, 15 y 16. Sin embargo, la presentación de esa variabilidad en términos de índices de variabilidad puede dar una idea comparativa más clara. Uno de los índices que estiman la variabilidad genética poblacional es el índice de polimorfismo, o proporción de genes polimórficos, el cual mide la cantidad de loci variables en una población, varía entre 0 y 100%, se calcula por el cociente de el número de loci polimórficos entre el número

total de loci analizados (Sosa, 2003), mientras mayor sea el valor de este índice para una población, mayor variabilidad genética está presente en esa población.

De las 20 secuencias amplificadas de los 30 individuos analizados de *A. durangensis* de la Sierra del Registro, Durango, todas fueron polimórficas (al 99%), lo que representa un índice de polimorfismo del 100% para esta población; de los 26 loci amplificadas entre los 30 individuos analizados de *A. durangensis* del Carrizal, Nombre de Dios, 24 fueron polimórficos (al 99%), esto representa un polimorfismo de 92.30%; mientras que de las 18 secuencias ISTR amplificadas para *Agave asperrima*, 14 fueron polimórficas, lo que representa un polimorfismo del 77.77% para esta población.

De acuerdo a varios autores (Francisco-Ortega y col., 1996; Silvertown y Charlesworth, 2001) los niveles de variabilidad genética de una población están definidos por cuatro factores principales, que son la capacidad de dispersión o migración, los mecanismos de reproducción y de cruzamiento de la especie, la deriva génica y la selección natural. Sosa (2003) considera que los mecanismos de reproducción y cruzamiento son los más importantes en la definición de los niveles de variabilidad genética de poblaciones naturales vegetales, siendo los grupos de fecundación cruzada los que presentan niveles de variabilidad genética más alta (Silvertown y Charlesworth, 2001). *Agave durangensis* es una especie de fecundación cruzada, con polinización zoófila, que presenta un mecanismo de dispersión de semilla mediado por el viento, lo que podría explicar la alta variabilidad encontrada en sus poblaciones naturales.

La amplitud de la distribución geográfica de una especie también es un factor determinante en la definición del grado de variabilidad de una población natural vegetal, mientras más grande sea la distribución, mayor será la variabilidad (Gitzendanner y Soltis, 2000; Sosa, 2003). La distribución geográfica de *Agave*

durangensis es más bien reducida limitada al sur de Durango y Norte de Zacatecas (Gentry, 1982; González-Elizondo y col., 2009) muestra, contrariamente a lo reportado para especies con este tipo de distribución, niveles de variabilidad genética más altos que los de otras especies de plantas también con distribución geográfica restringida, como *Gossypum tomentosum* (Frankham, 1997). Por lo que la distribución geográfica restringida no se considera como un factor determinante del alto grado de variabilidad encontrado en las dos poblaciones analizadas de *Agave durangensis*.

Hasta donde fue posible revisar para la realización de este estudio, no existen resultados reportados sobre la variabilidad genética de poblaciones naturales de *Agave durangensis*, por esa razón no fue posible establecer comparaciones de los valores de índices de polimorfismo estimados en este estudio para esa especie de *Agave*, con algunos previamente reportados. Sin embargo, la comparación de los índices de polimorfismo, estimados a partir de los perfiles ISTR, calculados en este estudio para dos poblaciones de *Agave durangensis* y una de *Agave asperrima*, con los valores reportados para otras especies también de fecundación cruzada y distribución geográfica reducida (endémica), estimados con RAPDS, como *Phoenix canariensis* Chabaud, de 41.8 % (González-Pérez, 2001) y *Cistus symbhytifolius* Lam, de 38.5% (Batista y col., 2001), sugiere que la población de la localidad Tipo de *Agave durangensis* tiene una alta variabilidad genética.

En la literatura revisada para este trabajo no se encontraron reportes sobre la biología reproductiva de *Agave durangensis*, sin embargo, las observaciones hechas en campo durante la realización de este estudio, la estructura floral y el hecho de que especies del mismo género son polinizadas por alguna o varias especies de murciélagos (Rocha y col., 2005; Rocha y col., 2006), sugieren que esta especie probablemente es polinizada por ese grupo de mamíferos. Un mecanismo de reproducción de ese tipo permitiría un alto intercambio intra e interpoblacional de gametos, permitiendo mantener una alta variabilidad genética dentro de cada

población a pesar de la disminución y fragmentación que están sufriendo sus poblaciones naturales debido a la sobreexplotación a la que han estado sometidas a causa de la sobrerrecolección para la elaboración de mezcal. En otras especies de plantas alógamas, es decir plantas en las que la fecundación se lleva a cabo con gametos originados en individuos diferentes, niveles altos de variabilidad son determinados por ese carácter de alogamia (Francisco-Ortega y col., 1996). La alta presión ambiental, debido a la elevada sobreexplotación a la que han estado sometidas desde hace varias décadas, las poblaciones naturales de *Agave durangensis* (Valenzuela-Ruiz y col., 2003) y en general los cambios ambientales actuales, pueden haber favorecido de alguna manera la ocurrencia de procesos de retrotransposición y como consecuencia procesos de acumulación progresiva de mutaciones y variaciones genéticas, incrementando la variabilidad de las poblaciones de esa especie. Ese tipo de variaciones han sido reportadas como producidas por retrotransposones en otras especies de plantas (SanMiguel y Bennetzen, 1998).

La alta variabilidad encontrada en las dos poblaciones de *Agave durangensis* analizadas en este estudio podría sugerir que se encuentran en un proceso actual de especiación, como ha sido sugerido para otras especies alógamas, altamente variables de la Sierra Madre Occidental del Estado de Durango, como son varias especies del género *Pinus* (García y González-Elizondo, 2003), y en varias especies de la familia *Cactaceae* (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). La variabilidad genética de una población también puede apreciarse con un análisis de agrupamiento (discriminación). Esos análisis además permiten apreciar la capacidad de diversos marcadores para discriminar entre poblaciones, especies e incluso niveles taxonómicos jerárquicos superiores (Turpeinen y col., 2001; Almaraz-Abarca y col., 2006;). Las matrices binarias de presencia/ausencia de secuencias ISTR generadas con los resultados del análisis molecular de este trabajo (Tablas 14, 15 y 16) se sometieron a análisis de agrupamiento para, además de detectar la variabilidad intrapoblacional, evaluar la capacidad de las secuencias amplificadas ISTR como marcadores para discriminar entre las poblaciones y entre las especies

de *Agave* analizadas. El análisis fenético de las dos poblaciones de *Agave durangensis* y de la población de referencia *Agave asperrima* (Figura 21), destaca, en primera instancia, la separación, a un índice de similitud de Dice, menor a 0.12 (un valor de 1 indica igualdad), de todos los individuos de *Agave asperrima* de las dos poblaciones de *Agave durangensis*. Estos resultados y los reportados por Torres-Morán y col. (2008), para siete diferentes especies de *Agave*, sugieren que los ISTR utilizados en este estudio son marcadores taxonómicos específicos valiosos para el género *Agave*.

Otro aspecto que se puede destacar de los resultados del análisis fenético es la separación clara de las dos poblaciones de *Agave durangensis*, a un valor de índice de similitud de 0.30, lo que sugiere que estos marcadores moleculares pueden utilizarse para la tipificación de poblaciones de ese taxon. Las tasas de cambio de la distribución de diferentes marcadores moleculares varían entre poblaciones, de acuerdo a Sunnucks (2000), debido a la acción diferencial de procesos como recombinación, mutación, y presión selectiva. Esto podría explicar porque las dos poblaciones de *Agave durangensis*, (Sierra de Registro y El Carrizal), separadas una de la otra por aproximadamente 30 Km y por la existencia de barreras geográficas como el cause del río Tunal y unas quebradas de aproximadamente 2072 m de altura, son separadas claramente una de la otra en el análisis de discriminación. Diferencias semejantes en la distribución de los marcadores ISTR han sido utilizadas para diferenciar entre poblaciones de otras especies de plantas como café (*Coffea arábica* L.) (Esayas, 2005), además de demostrar su eficacia para caracterizar algunas especies de *Agave* como; *Agave tequilana* (Torres y col., 2006; Torres y col., 2007), *Agave fourcroydes* (Infante y col., 2003), *Agave cocui* (Osorio y col., 2006), *Agave americana*, *Agave desmettiana*, *Agave maximiliana*, *Agave salmiana* y *Agave angustifolia* (Torres-Moran y col., 2008). Otros marcadores que han sido utilizados para discriminar entre poblaciones de plantas son los microsatélites y los AFLPs, empleados por Teulat y col. (2000) para separar y caracterizar varias poblaciones de coco.

VIII. CONCLUSIONES

1. El método de extracción de ADN utilizado permitió obtener este ácido nucleico en cantidad y calidad adecuadas para emplearse en análisis ISTR de poblaciones de *Agave durangensis* y *Agave asperrima*.
2. Los marcadores ISTR utilizados para este estudio fueron polimórficos en las dos especies de *Agave* analizados.
3. Los marcadores ISTR pueden ser útiles para la tipificación individual, poblacional y específica de *Agave*.
4. De acuerdo a los marcadores ISTR la población natural de *Agave durangensis* ubicada en la Sierra del Registro, Durango presenta una alta variabilidad genética, mayor que la de El Carrizal. Esa alta variabilidad puede estar representando un proceso activo de especiación, la presencia de híbridos, o la presencia de más de una entidad taxonómica.
5. La población genéticamente más homogénea fue la de *Agave asperrima* ubicada en Las Mercedes, municipio de Cuencamé.
6. La tipificación con ISTR puede aplicarse para la determinación del origen botánico e incluso poblacional de individuos de *Agave*. Ésto, y el ser altamente polimórficos, además de técnica y económicamente accesibles, da valor a estos marcadores como herramienta en el control de calidad de la determinación de las plantas de *Agave* que se emplean en la manufactura de mezcal.

IX. SUGERENCIAS

1. La problemática de delimitación específica de *Agave durangensis*, su potencial económico para soportar una industria mezcalera en el Estado de Durango, y el riesgo actual de reducción y fraccionamiento que sufren sus poblaciones naturales avalan el desarrollo de un número mayor de estudios morfológicos, ecológicos, bioquímicos y moleculares, que permitan conocer más este recurso natural y generen información para su conservación y aprovechamiento sostenible.
2. La tipificación con marcadores moleculares ISTR podría ser un aspecto importante en trabajos enfocados a la selección de líneas o genotipos valiosos de *Agave durangensis* para la elaboración de mezcal.
3. La caracterización molecular con marcadores ISTR podría emplearse en el monitoreo de las poblaciones naturales de *Agave durangensis* y de otras especies de *Agave* para conocer los niveles de variabilidad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- **Abundis B.** 2007. Manual de Producción y Paquete Tecnológico. Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Puebla. México.
- **Alberts B.**, Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. 1990. Biología Molecular de la Célula. Ediciones Omega S.A. 2° Ed. España.
- **Alix K., Helslop-Harrison J.** 2004. The Diversity of Retroelements in Diploid and Allotetraploid Brassica Species. *Plant Molecular Biology* 54: 895-909
- **Almaraz-Abarca N.**, González-Elizondo S., Tena-Flores J., Avila-Reyes J., Herrera-Corral J., Naranjo-Jiménez N. 2006. Foliar Flavonoids Distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (Coniferales: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington. USA.* 119: 426-436
- **Almaraz N.** 1984. Estudio Etnobotánico de los *Agaves* del Altiplano Potosino. Tesis. UNAM. México.
- **Alonso M.**, Cueto J., Santos Y., Llauger R., Rodríguez M., Wolfgang R. 2008. Estimación de la Variabilidad Genética entre Ecotipos de Cocoteros Presentes en Cuba por ISTR. *Revista Colombiana de Biotecnología. Colombia* 10: 6-13
- **Andrews A.** 1991. Electrophoresis of Nucleic Acids. *Essential Molecular Biology. A practical Approach Series.* IRL PRESS. 1:89-126
- **Augustino A.**, Martínez M., Palma F. Córdoba F. 1995. La Distribución, Usos y Algunas Características Químicas, de los *Agaves* de Oaxaca (México). *Interciencia. México.* 20: 14-19
- **Anthony R.** 1997. Microbiología Química. 2º Ed. Alambra. España.
- **Batista, F.**, Bañares A., Cajaupé-Castells J., Carqué E., Marreo-Gómez M., Sosa P. 2001. Allozyme Diversity in Three Endemic Species of *Cistus* (Cistaceae) From the Canary Island: Intraspecific Comparisons and Implications for Genetic Conservation. *American Journal of Botany. USA* 88: 1582-1592
- **Bravo-Hollis H., Sánchez-Mejorada R.** 1991. Las Cactáceas de México. UNAM. México 1: 743

-
- **Boeke J.** 2007. The Unusual Phylogenetic Distribution of Retrotransposons: A hypothesis. *Genome*. 13: 1975-1983.
 - **Clark J., Kidwell M.** 1997. A Phulogenetic Perspective on P Transposable Element Evolution in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 94: 11428-11433
 - **Colunga-GarcíaMarín P., May-Pat F.** 1993. Agave Studies in Yucatan, México. I. Past and Present Germplasm Diversity and Uses. *Economic Botany* 47: 312-327
 - **Colunga-GarcíaMarín P., Coello-Coello J., Espejo-Peniche L., Fuente-Moreno L.** 1993. Agave Studies in Yucatan, México II. Nutritional Value of the Inflorescence Peduncle and Incipient Domestication. *Economic Botany* 47: 328-334
 - **CONABIO.** 2009. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Banco de Información de Flora y Fauna para el Estado de Durango. www.conabio.gob.mx consultada el 30 de julio del 2009
 - **Davies D., Giovanelli J., Ap-Rees T.** 1969. *Bioquímica Vegetal*. Omega S.A. España.
 - **Demey, J., Gámez E., Molina S., Infante D.** 2004. Comparative Study of the Discriminating Capacity of AFLP and ISTR Markers for Genetic Analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology*. 22: 29-35
 - **Esayas A.,** 2005. Molecular Genetic Diversity Study of Forest Coffee Tree (*Coffea arabiga* L.) Population in Ethiopia: Implication for Conservation and Breeding. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*. 79:1-10
 - **Flavel A., Knox M., Pearce S., Elis N.** 1998. Retrotransposons Based Insertion Polimorphisms (RBIP) for High Throughpot Marker Analysis. *The Plant Journal*. 16: 643-650
 - **Francisco-Ortega, J., Crawford D., Santos-Guerra A., Carvalho J.** 1996. Isozyme Differentiation in the Endemic Genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in the Macaronesian Islands. *Plant Systematics and Evolution* 202: 137-152

-
- **Frankham R.** 1997. Do Island Populations Have Less Genetic Variation Than Mainland Populations?. *Heredity*. 78:311-327
 - **García A.** 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal.USA* 74:177-187
 - **García A., González-Elizondo M.** 2003. Pinaceas de Durango. 2ªEdición. SEMARNAT CONAFOR. México.
 - **García-Mendoza A., Galván R.** 1995. Riqueza de las Familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica en México*. México 56: 7-24
 - **García-Mendoza A.** 2003. Distribución del Género *Agave* (Agavaceae) en México. *Amaranto*. México 16: 2-11
 - **García-Mendoza A.,** Ordonez M., Briones M. 2004. Biodiversidad de Oaxaca. UNAM, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza: Word Wildlife Found.
 - **Gentry H.** 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. USA.
 - **Gil-Vega, K.,** Díaz C., Nava-Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP Analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170: 904-909
 - **Gitzendanner M., Soltis P.** 2000. Patterns of Genetic Variation y Rare and Widespread Plant Congeners. *American Journal of Botany* 87:783-792
 - **González-Elizondo M.,** Galván R., López L., Reséndiz L., González S. 2009. *Agaves Magueyes, Lechuguillas y Noas del Estado de Durango y sus Alrededores*. CIIDIR IPN, CONABIO, COCyTED.
 - **González-Pérez, M. A.** 2001. Caracterización Molecular de la Palmera Canaria (*Phoenix canariensis*) Como Base Para su Conservación. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
 - **Graur D.,** Li W. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. 2ªEd. Sinauer Associates, Inc. USA.

-
- **Hammer O.**, Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST, Paleontological Statistical Software Package for Education and data Analysis. *Paleontologia Electronica* 4: 9pp
 - **Harborne W., Turner L.** 1984. *Plant Chemosystematics*. Academic press London. 562.
 - **Hoelzel A., Green A.** 1994. Analysis of Populations Level Variation by Sequences PCR Amplified DNA. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach* (Hoelzel, A. ed). IRL Press. Oxford: 159-188
 - **INEGI.** 2005. Anuario estadístico Durango. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática y Gobierno de Estado de Durango. Aguascalientes Ags. CD.
 - **Infante D.**, Celis C., Molina S., Almaraz N., Delgado E., Naranjo N., Herrera J., Ávila J., Torres M., Morales M. 2006. Curso Utilización del ISTR para Identificación de Variabilidad en *Agaves*. IDEA. IPN. CUCBA.
 - **Infante D.**, González G., Peraza L., Keb-Llanes M. 2003. Asexual Genetic Variability in *Agave fourcroydes*. *Plant science*, 164: 223-230
 - **Jofuku K.**, Goldberg R. 1988. Analysis of Plant Gene Structure. In: *Plant Molecular Biology the Practical Approach* (Show, C.H. ed) IRL Press. Oxford:37-66
 - **Kazazian H. H.** 2004. Mobile Elements Drivers of Genome Evolution. *Science* 303: 1626-1632
 - **Keb-Llanes M.**, González G., Chi-Manzanero B., Infante D. 2002. A Rapid a Simple Method for Small Scale DNA Extraction in Agavaceae an Other Tropical Plants. *Plant Molecular Biology* 20: 299
 - **Kentner E.**, Michael L., Wessler A., Wessler S. 2003. Characterization of High-Copy-Number Retrotransposons From the Large Genomes of the Louisiana Iris Species and Their Use as Molecular Markers. *Genetics Society of America* 164: 685-697

-
- **Kidwell M.G.**, Lish D. 1997. Transposable Elements as Sources of Variation in Animals and Plants. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 94:7704-7711
 - **Lewin B.** 1995. *Genes V*. University Press. USA.
 - **Lewin B.** 2000. *Genes VII*. Oxford University Press. USA.
 - **Lightbourn G.**, Veilleux R. 2003. Retrotransposon Based Markers to Characterize Somatic Hybrids and Assess Variation Induced by Protoplast Fusion of Monoploid Potato. *Acta Horticulturae*. ISHS 619:235-242
 - **Mc Carty M.** 1988. *El Principio Transformador, Como se Descubrió que los Genes Están Hechos de DNA*. Reverte. México.
 - **Mickos D. y Freyer G.** 1990. *DNA Science*. Carolina Biological Suplí Compañy. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
 - **Muriá J.** 1994. *El Agave Histórico, Momentos del Tequila*. Revista *El tequila Arte Tradicional de México* 27
 - **Muriá J. y Madrigal P.** 1998. *Una Bebida Llamada Tequila*. Colegio de Jalisco.
 - **Nei M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
 - **Nieves G.**, Luquin H., Ayala J. 2007. *Fibras y Artesanías*. En: *Agaves del Occidente de México*. (Eds. Vazquez-Garcia J., Chazaro B., Hernández G., Flores E., Vargas Y.) U de G, CUCBA-CUCSH. México. Pp.119-122
 - **Olivas U.**, Valdés J., Aldrete A., González M., Guillen M., Vera G. 2007. Áreas con Aptitud para Establecer Plantaciones de Maguey Cenizo: Definición Mediante Análisis Multicriterio y SIG. *Sociedad Mexicana de Fitogenética Fitotecnia* 30: 411-416
 - **Osorio Z.**, Infante D., Molina S. 2006. Asexual Genetic Variability in *Agave cocui* Trelease. *Boletín Nakari*, 17:1-7
 - **Otto J. y Towle A.**, 1989. *Biología Moderna*. 11° Ed. Mc Graw Hill. México.

-
- **Pearce, S.**, Stuart-Royers C., Knox M., Kumar A., Ellis T., Flavell A. 1999. Rapid Isolation of Plant Ty1-Copia Group Retrotransposons LTR Sequences for Molecular Marker Studies. *The Plant Journal* 19: 711-717
 - **Ramírez, J.**, 1995. Los Magueyes, Plants With Thousand of Uses. CONABIO. México. *Biodiversitas Magazine* 1: 1-7
 - **Rocha M.**, Valera A., Eguiarte L. 2005. Reproductive Ecology of Five Sympatric *Agave Litteae* (Agavaceae) Species in Central Mexico. *American Journal of Botany* 92: 1330-1341
 - **Rocha M.**, Good-Avila S., Molina-Freaner F., Arita H., Castillo A., García-Mendoza A., Silva-Montellano A., Gaut B., Souza V., Eguiarte L., 2006. Pollination Biology and Adaptive Radiation of Agavaceae, With Special Emphasis on the Genus *Agave*. *Aliso* 22: 327-342
 - **Rohde, W.**, 1996. Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) Analysis, a Novel and Universal PCR Based Technique for Genome Analysis in Plant and Animal kingdom. *Journal Botany* 89: 312-326
 - **Rzendowski J.** 2006. *Vegetación de México*. 1ª Ed. Digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México
 - **Sambrook J.**, Fritsch F. E., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 1. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - **Sánchez F.**, Moreno S., Esqueda M., Barraza A., Robert M. 2009. Genetic Variability of Wild *Agave angustiflora* Populations Based on AFLP: A Basic Study for Conservation. *Journal of Arid Environments*. 73:611-616
 - **Sanguinetti C.**, Diaz E., Simpson A. 1994. Rapid Silver Staining and Recovery of PCR Products Separated on Polyacrilamide Gels. *Biotechniques* 17: 914-921
 - **SanMiguel P., Bennetzen J.** 1998. Evidence That a Recent Increase in Maize Genome Size Was Caused by the Massive Amplification of Intergene Retrotransposons. *Annals of Botany* 82: 37-44
 - **Schwarzer T., Helsop P.** 2000. *Practical In Situ Hybridization*. Springer-Verlag. USA.

-
- **Schulman A.** 2006. *Molecular Markers to Assess Genetic Diversity*. Springer Science+ Business
 - **Sensi E.**, Vignani R., Rohde W., Biricolti S. 1996. Characterization of Genetic Biodiversity With *Vitis vinifera* Sangiovese and Colorino Genotypes by AFLP and ISTR DNA Marker Technology. *Vitis*, 35: 183-188
 - **Shi Y. Z.**, Yamamoto T., Hayashi T. 2002. The Japanese Pear Genome Program III. Copia-Like Retrotransposon in Pear. *Acta Horticulturae ISHS* 587:247-252
 - **SIGMA** Chemical Company. 1988. SDS Molecular Weight Markers. Technical Bulletin No. MVS-877 USA:1-8
 - **Silvertown, J. W. Charlesworth D.** 2001. *Introduction to Plant Population Biology*. Blackwell Science, pp. 125.
 - **Smitler P.** 2005. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Stock Identification Methods*, 371-387.
 - **Sosa P.** 2003. *Conservación Genética de Endemismos Vegetales Amenazados de las Islas Canarias*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
 - **Sunnucks P.** 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*. 15: 199-203
 - **Teo C.**, Tan S., Ho C., Zaman Q., Othman Y., Heslop-Harrison J. 2005. Genome Constitution and Classification Using Retrotransposon-Based Markers in Orphan Crop Banana. *Journal of plant Biology* 48: 96-105
 - **Teulat B.**, Aldam C., Trehin R., Lebrun P., Baker J., Arnold G., Karp A., Baudouin L., Rognon F. 2000. An Analysis of Genetic Diversity in Coonut (*cocos nucifera*) Populations From Across the Geographic Range Using Sequence-Tagged Microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theor. Appl. Genetic* 100:764-771
 - **Tignon M.**, Watillon B., Kettman R. 2001. Identification of Copia-Like Retrotransposable Elements by Apple. *Acta Horticulturae*. ISHS 546:515-520

-
- **Torres M.**, Infante D., Sanchez M., Morales A., Santerre. 2005. Diversidad Genética en *Agave tequilana* Weber var. Azul Proveniente de Micropropagación. Boletín Nakari 14 : edición digital.
 - **Torres M.**, Morales M., de la Cruz L., Villalobos A. 2006. Identification of Polymorphisms Among Offshoots and Micropropagated Plants of *Agave tequilana* and *Agave cocui* Using ISTRs. Scientia CUCBA 8:203-206
 - **Torres M.**, Morales M. nuño R., Santacruz F., Rodríguez A. 2007. Variability in *Agave tequilana* Wever var azul detected in micropropagation at a molecular level. Bol. Nakari. 18: 3-5.
 - **Torres-Moran M.**, Almaraz-Abarca N., Velazco-Ramírez A., Hernández-Vargas V., Orea-Lara G., Cifuentes-Díaz de León A., Oliver- Salvador C. 2008. Taxonomic Significance of ISTR to Discrimínate Species In *Agavaceae*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 3: 661-665
 - **Turpeinen T.**, Tenhola T., Manninen O., Nevo E., Nissila E. 2001. Microsatelite Diversity Associated With Ecological Factors in *Hordeum spontaneum* Populations in Israel. Molecular Ecology 10:1577-1591
 - **Valenzuela-Ruiz J.**, Velasco O., Márquez M. 2003 Desarrollo Sustentable del *Agave Mezcalero* en Durango. SEP, CIIDIR-IPN-Dgo., SAGDR. México.
 - **Venturi S.** 2006. Retrotransposns, the Most Commune Class of Transposable Elements in Eukaryotis. Display a High Degree of Heterogeneity and Insertional Polymorphism, Both Withing and Betwen Species. In theorical and Aplied Genetic 112:440-444
 - **Waugh R.**, Mc Lean K., Flavell A., Pearce S., Kumar A., Thomas B., Powell W. 1996. Genetic Distribution of Bare-1-Like Retrotransposable Elements in the Barley Genome Revealed by Sequence-Specific Amplification Polymorphisms (S-SAP). Molecular Genetics 253: 687-694
 - **Wessler S.**, Bureau T., White S. 1995. LTR- Retrotransposons and Mites, Important Players in the Evolution of Plants Genomes. Current Opinion in Genetics and Development 6:814-821

ANEXOS

ANEXO 1

Georreferencias de las muestras de *Agave durangensis*, de El Carrizal, Nombre de Dios

NÚMERO DE MUESTRA	NÚMERO DE REGISTRO	GEORREFERENCIA
001	001	23°40.3'10.4" 104°14'76"
002	002	23°40'70" 104°13.6'31"
003	003	23°40'70" 104°13.6'31"
004	004	23°40'70" 104°13.6'31"
005	005	23°40'70" 104°13.6'31"
006	006	23°40'74" 104°13.6'38"
007	007	23°40'73" 104°13.6'42"
008	008	23°40'74" 104°13.6'43"
009	009	23°40'76" 104°13.6'46"
010	010	23°40'76" 104°13.6'46"
011	011	23°40'79" 104°13.6'49"
012	012	23°40'79" 104°13.6'49"
013	013	23°40'81" 104°13.6'51"
014	014	23°40'79" 104°13.6'51"
015	015	23°40'82" 104°13.6'54"
016	016	23°40'06" 104°13.6'19"
017	017	23°40'63" 104°13.6'23"
018	018	23°40'61" 104°13.6'25"
019	019	23°40'67" 104°13.6'45"
020	020	23°40'67" 104°13.6'45"
021	021	23°40'62" 104°13.6'42"
022	022	23°40'62" 104°13.6'42"
023	023	23°40'62" 104°13.6'42"
024	024	23°40'62" 104°13.6'42"
025	025	23°40'62" 104°13.6'42"
026	026	23°40'62" 104°13.6'42"
027	027	23°40'67" 104°13.6'37"
028	028	23°40'66" 104°13.6'37"
029	029	23°40.1'06" 104°13.5'96"
030	030	23°40.1'08" 104°13.5'92"

ANEXO 2

Fotografías de los individuos muestreados de El Carrizal, Nombre de Dios.





Ag 8



Ag 10



Ag 11



Ag 12



Ag 13



Ag 14



Ag 15



Ag 16





ANEXO 3.

Georreferencias de las muestras de *Agave durangensis* de la Sierra de Registro, Durango

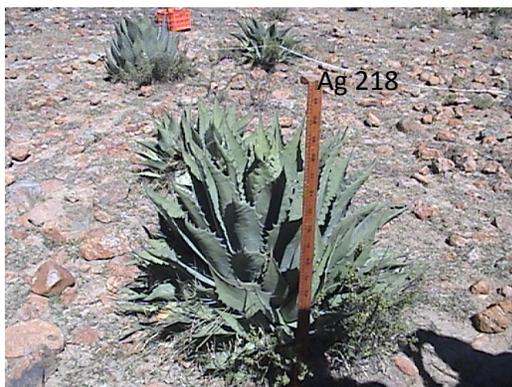
NÚMERO DE MUESTRA	NÚMERO DE REGISTRO	GEORREFERENCIA
001	200	23°59.4'38" 104°22.5'13"
002	201	23°59.4'38" 104°22.5'13"
003	202	23°59.4'38" 104°22.5'13"
004	203	23°59.4'38" 104°22.5'13"
005	204	23°59.4'38" 104°22.5'13"
006	205	23°59.4'38" 104°22.5'13"
007	206	23°59.4'38" 104°22.5'13"
008	207	24°59.4'28" 104°22.5'13"
009	208	24°59.4'28" 104°22.5'13"
010	209	24°59.4'28" 104°22.5'13"
011	210	24°59.4'28" 104°22.5'13"
012	211	24°59.4'28" 104°22.5'13"
013	212	24°59.4'28" 104°22.5'13"
014	213	24°59.4'28" 104°22.5'13"
015	214	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
016	215	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
017	216	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
018	217	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
019	218	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
020	219	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
021	220	24°59'24.3" 104°22.'35.1"
022	221	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
023	222	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
024	223	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
025	224	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
026	225	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
027	226	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
028	227	24°59.8'24" 104°22.'36.4"
029	228	24°59'27.4" 104°22.'35.9"
030	229	24°59'27.4" 104°22.'35.9"
031	230	24°59'27.4" 104°22.'35.9"

ANEXO 4.

Fotografías de los individuos muestreados en La Sierra de Registro, Durango









ANEXO 5.

Georreferencias de las muestras de *Agave aspérrima* de Las Mercedes, Cuencamé

NÚMERO DE MUESTRA	NUMERO DE REGISTRO	GEORREFERENCIAS
1	301	25°0.1'0.5" 103°45'51.5"
2	302	25°0.1'0.5" 103°45'51.5"
3	303	25°0.1'0.5" 103°45'51.5"
4	304	25°0.1'0.5" 103°45'51.5"
5	305	25°0.1'0.5" 103°45'51.5"
6	306	25°0.1'0.5" 103°45'51.5"
7	307	25°0.1'0.8" 103°45'52.9"
8	308	25°0.1'0.8" 103°45'52.9"
9	309	25°0.1'0.8" 103°45'52.9"
10	310	25°0.1'0.8" 103°45'52.9"
11	311	25°0.1'0.8" 103°45'52.9"
12	312	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
13	313	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
14	314	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
15	315	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
16	316	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
17	317	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
18	318	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
19	319	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
20	320	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
21	321	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
22	322	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
23	323	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
24	324	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
25	325	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
26	326	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
27	327	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
28	328	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
29	329	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"
30	330	25°0.0'0.8" 103°45'52.5"