

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESAROLLO INTEGRAL REGIONAL**

UNIDAD DURANGO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

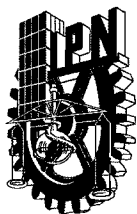
"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y QUÍMICA DE *Agave victoriae-reginae* T. MOORE (AGAVACEAE)"

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:**

ZEILA ERENDIRA ÁVILA SEVILLA

DURANGO, DGO., SEPTIEMBRE DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 11:30 horas del día 23 del mes de Agosto del 2010 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 DGO para examinar la tesis titulada:

"Caracterización molecular y química de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae)"

Presentada por el alumno:

ÁVILA

SEVILLA

ZEILA ERENDIRA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	3	3	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

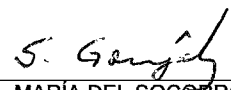
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL

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

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA

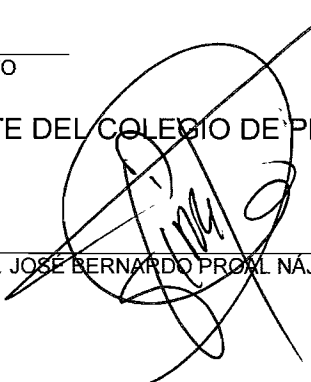

DRA. MARÍA DEL SOCORRO GONZÁLEZ
ELIZONDO


M. EN C. ELI AMANDA DELGADO ALVARADO

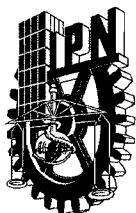

M. EN C. NÉSTOR NARANJO JIMÉNEZ


M. EN C. JOSÉ NATIVIDAD URIBE SOTO

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. JOSÉ BERNARDO PROHL NAJERA


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



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 28 de Agosto del 2009

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

ÁVILA

SEVILLA

ZEILA ERENDIRA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

B	0	8	1	3	3	2
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Maestría en Ciencias en Gestión Ambiental

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Caracterización molecular y química de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae)"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

Dra. Norma Almaraz Abarca y Dra. María del Socorro González Elizondo

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.

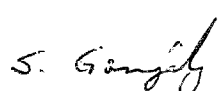
4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

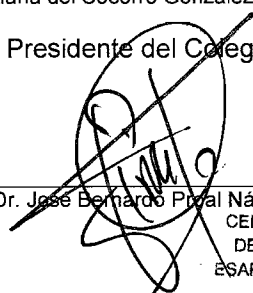

Dra. Norma Almaraz Abarca

Aspirante

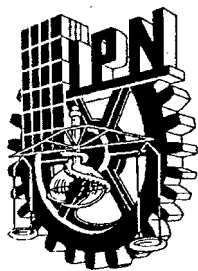

Zeila Erendira Ávila Sevilla


Dra. María del Socorro González Elizondo

Presidente del Colegio


Dr. José Bernardo Peral Nájera


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

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **DURANGO, DGO.**, el día 23 del mes Agosto del año **2010**, el (la) que suscribe **ZEILA ERENDIRA ÁVILA SEVILLA** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL** con número de registro **B081332**, adscrito a **CIIDIR-IPN UNIDAD DURANGO**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **DRA. NORMA ALMARAZ ABARCA Y LA DRA. MARÍA DEL SOCORRO GONZÁLEZ ELIZONDO** y cede los derechos del trabajo intitulado “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y QUÍMICA DE *Agave victoriae-reginae* T. MOORE (Agavaceae)**”, 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 zei-ere-avila@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Zeila Erendira Ávila Sevilla

Nombre y firma

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y en el Herbario del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Doctora Norma Almaraz Abarca y la Doctora María del Socorro González Elizondo.

Índice

GLOSARIO.....	i
LISTA DE ACRÓNIMOS	xii
RELACIÓN DE FIGURAS	xiv
RELACIÓN DE CUADROS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Aspectos botánicos de la familia Agavaceae	4
2.1.1 El género <i>Agave</i>	5
2.1.2 <i>Agave victoriae-reginae</i>	6
2.2 Importancia de los estudios de variabilidad.....	8
2.2.1 Estudios de variabilidad en el género <i>Agave</i>	10
2.3 Marcadores moleculares	11
2.3.1 Diversidad de marcadores moleculares.....	12
2.4 Marcadores moleculares basados en elementos móviles del genoma	13
2.4.1 Elementos móviles del genoma	13
2.4.2 Retrotransposones.....	14
2.4.3 Marcadores ISTR.....	15
2.5 Marcadores químicos	16

2.5.1	Los flavonoides.....	17
2.6	Antecedentes de estudios quimiotaxonómicos del género Agave.....	19
3.	JUSTIFICACIÓN.....	21
4.	OBJETIVO	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.	CONCLUSIONES	57
8.	RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS	59
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	60
	AGRADECIMIENTOS	76
	ANEXOS	77
	Anexo 1.....	77
	Anexo 2.....	82

GLOSARIO

- 1 Acilación: proceso de agregar un grupo acilo a un compuesto.
- 2 Alelopatía: fenómeno que implica la inhibición directa de una especie por otra ya sea vegetal o animal, usando sustancias tóxicas o disuasivas.
- 3 Alelos: formas alternativas que puede tener un gen, se diferencian en su secuencia y pueden manifestar modificaciones concretas de la función de ese gen.
- 4 Analito: especie química presente en una muestra de la cual se busca información analítica.
- 5 Angiosperma: planta con flores cuyas semillas se encuentran encerradas en el interior de un fruto.
- 6 Antesis: periodo de florecencia de las plantas con flores; estrictamente, es el tiempo de expansión de una flor hasta que está completamente desarrollada y en estado funcional, durante el cual ocurre el proceso de polinización.
- 7 Apiculado: provisto de una punta corta.
- 8 Bifurcado: dividido en dos partes.
- 9 Biodiversidad: reflejo de la cantidad, la variedad y la variabilidad de los organismos vivos. Incluye la diversidad dentro de una especie (diversidad genética), entre especies distintas (diversidad de especies) y entre ecosistemas (diversidad de ecosistemas).

- 10 Biosíntesis: formación de compuestos orgánicos realizado por los organismos vivos a partir de compuestos sencillos.
- 11 Carboxilación: proceso químico en el cual un grupo carboxilo (-COOH) sustituye a un átomo de hidrógeno.
- 12 Cartácea: de consistencia de papel o de pergamino.
- 13 Catalizador: sustancia que regula la velocidad a la cual se produce una reacción química sin afectar el punto final de la reacción y sin utilizarse como resultado de la misma.
- 14 Catequina: compuesto químico semejante a los flavonoides, se diferencia de éstos porque no posee un grupo carbonilo característico en el anillo C.
- 15 Células somáticas: todas las células que forman los tejidos y los órganos conformando el cuerpo de los seres vivos, se originan a partir de la célula madre y tras el proceso de diferenciación celular forman todos los otros tipos de células.
- 16 Conectivo: zona de unión entre el filamento y la antera en un estambre.
- 17 Conspicuo: notable, sobresaliente.
- 18 Citogenética: campo de la genética que comprende el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas.
- 19 Cluster: conjunto de casos relacionados en tiempo y espacio.

- 20 Cromatina: conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentran en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el cromosoma eucariótico.
- 21 Cromosomas: unidades discretas en que se organiza la cromatina del núcleo celular durante las divisiones celulares.
- 22 Deletérea: que causa o puede causar la muerte por envenenamiento.
- 23 Deltoide: de contorno triangular.
- 24 Diosmetina: flavonoide glicósido que posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carece del grupo hidroxilo en posición 3, utilizado para la elaboración de medicamentos.
- 25 Electroforesis: técnica por la cual mezclas complejas de moléculas como proteínas, ADN o ARN se separan en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica.
- 26 Endémico: característico y exclusivo de una determinada región geográfica bien delimitada.
- 27 Enzimas: proteínas catalizadoras producidas por los organismos vivos que aceleran reacciones químicas específicas.
- 28 Epoxidación: reacción química en donde los alquenos reaccionan con peroxiácidos (molécula formada por ácido oxácido y agua oxigenada) para formar epóxidos.
- 29 Epóxido: radical formado por un átomo de oxígeno unido a dos átomos de carbono, que a su vez están unidos entre sí mediante un solo enlace covalente.

- 30 Especiación: desarrollo de nuevas y diferentes combinaciones génicas en poblaciones separadas.
- 31 Espectro: distribución de la intensidad de una radiación en función de una magnitud característica, como la longitud de onda, la energía, la frecuencia o la masa.
- 32 Espiciforme: con aspecto de espiga.
- 33 Estambre: órgano vegetal masculino formado por antera y filamentos unidos por el conectivo.
- 34 Esterificación: proceso por el cual se sintetiza un éster (compuesto derivado de la reacción química entre un ácido carboxílico y un alcohol).
- 35 Etnobotánica: estudia las relaciones entre los grupos humanos y su entorno vegetal, es decir el uso y aprovechamiento de las plantas en los diferentes espacios culturales y en el tiempo.
- 36 Fenol: compuesto orgánico aromático muy tóxico e irritante.
- 37 Fenotípico: relativo al fenotipo.
- 38 Fenotipo: expresión del genotipo en un determinado ambiente.
- 39 Filamento: parte del estambre que sostiene la antera.
- 40 Filogenia: parte de la biología que se ocupa de las relaciones de parentesco entre los distintos grupos de seres vivos.

- 41 Fingerprinting: técnica utilizada para distinguir entre los individuos de una misma especie utilizando muestras de su ADN.
- 42 Fitomelano: pigmento que da coloración negra, de naturaleza química aún no clara.
- 43 Fitoquímica: disciplina que estudia la composición de metabolitos secundarios de las plantas
- 44 Flujo genético: intercambio de genes entre poblaciones diferentes, normalmente relacionadas, a través de un cruzamiento.
- 45 Gameto: cada una de las células sexuales que al fusionarse, durante la fecundación, forman un nuevo individuo.
- 46 Gen: unidad funcional y física de la herencia que pasa de padres a sus descendientes. Secuencias de ADN que contienen la información necesaria para la formación de una cadena polipeptídica.
- 47 Genoma: totalidad de la información genética que posee un organismo en particular.
- 48 Genotipo: conjunto de los genes de un individuo, incluida su composición alélica.
- 49 Germoplasma: conjunto de genes que se transmite en la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras.
- 50 Glicosilación: proceso químico en el que se adiciona un glúcido a otra molécula.

- 51 Glúcido: moléculas orgánicas compuestas por carbono, hidrógeno y oxígeno.
- 52 Grupo acilo: grupo derivado de un oxoácido, normalmente un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo.
- 53 Grupo carbonilo: grupo funcional que consiste de un átomo de carbono unido a uno de oxígeno por medio de un doble enlace.
- 54 Grupo hidroxilo: grupo funcional compuesto de un átomo de oxígeno y un átomo de hidrógeno.
- 55 Hábitat: conjunto de características geográficas y ecológicas en que de manera natural se desarrolla un organismo vivo o un grupo de ellos.
- 56 Heterocigoto: individuo diploide que para un gen dado, tiene en cada uno de los cromosomas homólogos un alelo distinto.
- 57 Heterocigosidad: frecuencia media de individuos heterocigóticos, se estima calculando la frecuencia de heterocigóticos para cada locus y dividiendo por el total de loci.
- 58 Hibridación: en biología molecular, proceso de formación de híbridos.
- 59 Híbrido: organismo vivo animal o vegetal procedente del cruce de dos organismos de especies o subespecies distintas, o de alguna, o más cualidades diferentes.
- 60 Hidrocarburo: compuesto químico orgánico formado por hidrógeno y carbono en cualquiera de sus fases, líquida, sólida o gaseosa.
- 61 Hidroxilación: reacción química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH)

en un compuesto, reemplazando un átomo de hidrógeno y oxidando al compuesto.

- 62 Histonas: proteínas básicas, de baja masa molecular, muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas y en algunos procariotas.
- 63 Homólogo: poner en relación de igualdad o semejanza dos cosas.
- 64 Huella genética: secuencias característicos del material genético que diferencian a un individuo de otro.
- 65 Imbricada: hojas u órganos foliáceos dispuestos muy próximos que llegan a cubrirse unos a otros por los bordes.
- 66 Interpoblacional: relaciones que se establecen entre las poblaciones de diversos puntos geográficos.
- 67 Intrapoblacional: relaciones que existen dentro de una misma población.
- 68 Lacriforme: en forma de lágrima.
- 69 Laxo: poco denso, flojo.
- 70 Lignina: polímero de naturaleza fenólica presente en las paredes celulares de organismos del Reino Plantae.
- 71 Loci: plural de locus.
- 72 Locus: lugar que ocupa una secuencia génica en un genoma.
- 73 Malonilación: reacción química en la que interviene la molécula malonil

(molécula que se forma de la carboxilación de un acetil) que limita la biosíntesis de ácidos grasos.

- 74 Marcador molecular: secuencias específicas de ADN que permiten caracterizar o tipificar individuos o grupos de individuos.
- 75 Material genético: cualquier material de origen vegetal, animal, microbiano u otro que tenga información genética y que la transmita de una generación a la siguiente.
- 76 Metabolito: cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo.
- 77 Metilación: adición de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) a una molécula.
- 78 Método espectrométrico: método instrumental empleado en química analítica basado en la interacción de la radiación electromagnética, u otras partículas, con un analito para identificarlo o determinar su concentración.
- 79 Micropropagación: conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente in vitro.
- 80 Mutación: alteración o cambio en la información genética (genotipo) de un ser vivo, que se puede transmitir o heredar a la descendencia.
- 81 Nivel taxonómico: lugar que ocupan los organismos de un sistema de clasificación, dependiendo del grado de complejidad que tengan estos.
- 82 Nucleótido: molécula orgánica formada por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

- 83 Oligonucleótido: secuencia corta de ADN o ARN con cincuenta o menos pares de bases.
- 84 Oxoácido: ácido que contiene uno o más átomos de oxígeno unidos al átomo que le da nombre.
- 85 Panícula: inflorescencia compuesta de racimos que van decreciendo de tamaño hacia el ápice.
- 86 Pedicelo: eje que sostiene cada una de las flores de una inflorescencia.
- 87 Perfil fenólico: conjunto de compuestos fenólicos que definen a un taxon (especie, o variedad, entre otros).
- 88 Perfil genético: caracterización genética individualizada proveniente del análisis del ADN.
- 89 Polimorfismo: diferentes formas que puede presentar un marcador genético.
- 90 Polinización cruzada: transporte del polen de una planta a otra.
- 91 Progenie: descendencia de un individuo.
- 92 Quimiotaxonomía: sistematización de las relaciones taxonómicas de diferentes taxa con base en la composición de metabolitos secundarios que los caractericen y/o en las rutas biosintéticas mediante las que se forman los metabolitos secundarios.
- 93 Quercetina: flavonoide natural hidrosoluble que posee propiedades farmacológicas.

- 94 Retrotranscripción: proceso que implica la generación de una molécula de ADN de doble cadena a partir de un ARN de cadena simple.
- 95 Retrotranscriptasa: enzima de tipo ADN-polimerasa, que tiene como función sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN.
- 96 Retrotransposones: secuencias de ADN móvil que se copian e insertan en lugares diferentes del genoma a través de un ARN intermediario.
- 97 Retrovirus: virus cuyo material genético está formado por ARN, pero que se transcribe en ADN dentro de la célula hospedera gracias a la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa.
- 98 Riqueza alélica: medida del número promedio de alelos de un locus en una población.
- 99 Saponina: glicósidos de esteroides o de triterpenoides. Cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos y un elemento soluble en agua que forma una espuma cuando son agitadas en agua.
- 100 Simbiosis: hace referencia a la relación estrecha y persistente entre organismos de distintas especies.
- 101 Sinuoso: que presenta ondulaciones en las hojas.
- 102 Subulado: estrechado hacia el ápice y acabado en punta fina.
- 103 Taninos: compuestos polifenólicos, más o menos complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada, sabor astringente, con capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas.

- 104 Taxon: unidad taxonómica de cualquier nivel.
- 105 Terpenos: metabolitos secundarios constituidos por un número variable de unidades del isopreno (hidrocarburo de 5 átomos de carbono). Pueden ser moléculas lineales o cíclicas y algunos de ellos contienen estructuras de ambos tipos.
- 106 Transposición: cambio de posición de determinadas secuencias de bases de un genoma.
- 107 Transposon: elemento genético móvil con una secuencia de ADN definida, que se puede trasladar a nuevas posiciones en el genoma de las células sin pérdida de la copia en su posición original.
- 108 Variabilidad: diferencia entre los individuos de una población.
- 109 Variación somaclonal: término utilizado para describir la variación genética observada en las plantas que se han producido mediante cultivo de tejidos vegetales.
- 110 Varietal: relativo a las variedades.
- 111 Vástago: brote o tallo nuevo que surge de la cepa de una planta.

LISTA DE ACRÓNIMOS

1. A_{240} : Absorbancia a 240 nm
2. A_{260} : Absorbancia a 260 nm
3. A_{280} : Absorbancia a 280 nm
4. ADN: Ácido desoxirribonucleico.
5. AFLPs: Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados).
6. ARN: Ácido ribonucleico.
7. CITES: Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres.
8. CTAB: Hexadecyltrimethylammonium Bromide (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio).
9. EDTA: Disodium Etilendinitrilotetracetado (Etilendiaminotetraacético disódico).
10. HPLC / DAD: High Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector (Cromatografía Líquida de Alta Resolución / Detector de Arreglos de Diodos).
11. ISTR: Inverse Sequence Tagged Repeat (Repetición Marcada de Secuencias Inversas).
12. LTR: Long Terminal Repeat (Repetición Terminal Larga).
13. NOM: Norma Oficial Mexicana.
14. PAST: Palaeontological Statistics (Estadísticas Paleontológicas).
15. PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
16. PVP: Polivinil Pirrolidona.

17. RAPDs: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico).
18. RFLPs: Random Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción).
19. SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sodio).
20. SSR: Simple Sequence Repeats (Secuencias Simples Repetidas).
21. TIR: Terminal Inverted Repeats (Terminales Repetidas Inversas).
22. Tris base: Tris-hidroximetilaminometano.
23. TR: Tiempo de Retención

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.	Localización de los sitios de colecta de <i>Agave victoriae-reginae</i>	27
Figura 2.	Sitio de muestreo e individuo en Mezquital, Durango de <i>Agave victoriae-reginae</i>	28
Figura 3.	Sitio de muestreo e individuo en Lerdo, Durango de <i>Agave victoriae-reginae</i>	28
Figura 4.	Sitio de muestreo e individuo en Viesca, Coahuila de <i>Agave victoriae-reginae</i>	29
Figura 5.	Sitio de muestreo e individuo en Ramos-Arizpe, Coahuila de <i>Agave victoriae-reginae</i>	29
Figura 6.	Sitio de muestreo e individuo en Arteaga, Coahuila de <i>Agave victoriae-reginae</i>	29
Figura 7.	Sitio de muestreo e individuo en Bustamante, Nuevo León de <i>Agave victoriae-reginae</i>	30
Figura 8.	Sitio de muestreo e individuo en Mina, Nuevo León de <i>Agave victoriae-reginae</i>	30
Figura 9.	Sitio de muestreo e individuo en Santa Catarina, Nuevo León de <i>Agave victoriae-reginae</i>	30
Figura 10.	Migración vs. tamaño molecular del marcador molecular	35
Figura 11.	Linealización de los valores de migración vs. tamaño molecular del marcador molecular	35
Figura 12.	Gel de agarosa de muestras de <i>Agave victoriae-reginae</i>	41
Figura 13.	Gel de agarosa de muestras de <i>Agave lechuguilla</i>	42

- Figura 14. Dendograma, basado en los perfiles ISTR, de *Agave victoriae-reginae* y *Agave lechuguilla* 47
- Figura 15. Dendograma, basado en los perfiles fenólicos de *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla* y *Agave striata* 55

RELACIÓN DE CUADROS

Cuadro 1.	Sitios de colecta de <i>Agave victoriae-reginae</i>	24
Cuadro 2.	Sitios de colecta de <i>A. striata</i> y <i>A. lechuguilla</i>	31
Cuadro 3.	Número de individuos muestreados en cada población estudiada	31
Cuadro 4.	Valores de absorbancia a 260 nm, a 280 nm, de la relación de A_{260} y A_{280} , y de la concentración de ADN obtenido para <i>Agave victoriae-reginae</i>	38
Cuadro 5.	Valores de absorbancia a 260 nm, a 280 nm, de la relación de A_{260} y A_{280} , y de la concentración de ADN obtenido para <i>Agave lechuguilla</i>	40
Cuadro 6.	Matriz binaria (presencia/ausencia) de los fragmentos de ISTR	43
Cuadro 7.	Total de bandas polimórficas y no polimórficas de <i>A. victoriae-reginae</i> y <i>A. lechuguilla</i>	44
Cuadro 8.	Relación de todos los compuestos fenólicos resueltos, sus tiempos de retención, e identificación química	50
Cuadro 9.	Matriz binaria (presencia/ausencia) de los compuestos fenólicos detectados	54

RESUMEN

Estudios basados en perfiles enzimáticos han sugerido que existe una alta variabilidad genética dentro y entre las diferentes poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, y que la variabilidad entre las poblaciones es similar a la que se encuentra entre especies o subespecies diferentes en otros. En este trabajo se determinó la importancia de los perfiles fenólicos foliares y de los marcadores moleculares ISTR para detectar la variabilidad genética de poblaciones naturales de *Agave victoriae-reginae*. *Agave lechuguilla* se usó como especie de referencia en el análisis molecular y *Agave striata* y *Agave lechuguilla* en el análisis químico. Los perfiles fenólicos y de amplificación ISTR de muestras foliares de individuos de ocho poblaciones diferentes de *Agave victoriae-reginae*, una de *Agave lechuguilla* y una de *Agave striata* fueron obtenidos a partir de un extracto etanólico crudo, por un método en gradiente de HPLC/DAD, y por métodos de PCR y electroforesis en geles de acrilamida teñidos con sales de plata, respectivamente. Los compuestos fenólicos resueltos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y comportamiento espectral con los correspondientes a estándares y de acuerdo a lo reportado en la bibliografía. Las secuencias o loci amplificados se caracterizaron por su tamaño molecular (pb). Con ambos tipos de resultados se elaboraron matrices binarias de presencia/ausencia que se sometieron a análisis de conglomerados (cluster). Se detectó un total de 100 compuestos fenólicos, los cuales fueron de dos tipos: ácidos fenólicos y flavonoides. De estos últimos, derivados glicósidos de quercetina y derivados glicósidos de canferol fueron los más abundantes. Los ácidos fenólicos predominaron en los perfiles foliares de *Agave victoriae-reginae* y en *Agave lechuguilla*, mientras que en *Agave striata* los flavonoides fueron codominantes con los ácidos fenólicos. Los perfiles fenólicos foliares pudieron discriminar entre las tres especies de *Agave*. Los perfiles de amplificación ISTR generaron en total 23 secuencias entre 153 y 804 pb. Algunas de esas secuencias son características de cada población. La variabilidad encontrada en ambos tipos de perfiles apoya la posición de algunos autores de considerar a la población de Mezquital, Durango como una especie independiente.

ABSTRACT

Studies based on enzymatic profiles have indicated that a high genetic variability is present inside and among natural populations of *Agave victoriae-reginae*, and that the level of variation among populations is similar to the variation found among species or subspecies in other groups. The aim of the present study was to assess the foliar phenolic profiles and the ISTR profiles to detect genetic variability and as specific taxonomic tools for *Agave victoriae-reginae*. *Agave lechuguilla* and *Agave striata* were used as references and were analyzed in the same manner. Foliar samples of individuals of eight populations of *Agave victoriae-reginae*, one of *Agave lechuguilla*, and one of *Agave striata* were collected and analyzed for their phenolic composition and for their ISTR amplification profiles. The phenolic profiles were obtained from an ethanolic extract by a gradient method of HPLC/DAD. The detected phenolic compounds were identified by direct comparisons of retention times and UV spectra with those of standards and according to the information previously reported. The ISTR profiles were obtained by a PCR method; the amplified sequences were separated in acrylamide gels, and stained with silver salts. The different sequences were characterized by their molecular size (pb). Binary matrices of presence/absence were elaborated with the results of both analyses. The matrices were analyzed by a cluster analysis. A hundred phenolic compounds were detected, which were of two types: phenolic acids and flavonoids. Among the flavonoids, glycoside derivatives of quercetin and kaempferol were the most abundant. The phenolic acids were the dominant compounds in the foliar profiles of *Agave victoriae-reginae* and *Agave lechuguilla*, while in *Agave striata* the flavonoids and phenolic acids were codominant. The foliar phenolic profiles clearly discriminated among the three species of *Agave*. The ISTR profiles gave a total of 23 different sequences with molecular sizes between 153 and 804 pb. Some of those sequences were typical of each population. Both kinds of profiles support the position of some authors about considering the population of Mezquital, Durango as an independent species.

1. INTRODUCCIÓN

Agave victoriae-reginae T. Moore es una de las aproximadamente 166 especies del género *Agave* y forma parte del subgénero *Littaea*. Es una de las especies ornamentales más importantes de ese género. Su popularidad como especie ornamental, entre otras razones, la han llevado a condiciones de peligro, debido a fuerte extracción que se realizaba de sus poblaciones naturales. Ese saqueo llegó a ser de tal magnitud que para su protección, el gobierno mexicano la colocó en un estatus de en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2001).

Agave victoriae-reginae ha sido considerada como endémica del Desierto Chihuahuense de México. Poblaciones naturales de esta especie se encuentran al oeste del estado de Nuevo León, en la parte central y sur de Coahuila y al noreste del estado de Durango. Sin embargo, existen también poblaciones al sur del estado de Durango, las cuales se encuentran fuera del límite de lo que es considerado el Desierto Chihuahuense.

Altos niveles de variabilidad genética han sido reportados dentro y entre las poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. Los altos niveles de diferenciación entre tres grupos de poblaciones han sido considerados por Martínez Palacios y col. (1999) llevado de cómo de magnitud similar a la que separa a especies o subespecies distintas en otros grupos de plantas.

Diferentes marcadores, además de los morfológicos, han sido buscados y utilizados para abordar diferentes problemáticas taxonómicas en grupos muy diversos de plantas. Entre esos marcadores se encuentran los caracteres químicos y los moleculares. Los perfiles de flavonoides son un tipo de marcadores químicos que se consideran con una tendencia especie-específica, esta propiedad, entre otras, ha hecho que sean ampliamente usados en estudios quimiotaxonómicos. Sin embargo, a pesar de las importantes controversias taxonómicas de delimitación específica de

muchas especies del género *Agave*, estudios enfocados en determinar el valor taxonómico de los perfiles fenólicos en ese género son más bien escasos. *Agave americana*, *Agave barbadensis* y *Agave durangensis* son de las pocas especies de *Agave* que han sido estudiadas para conocer su composición fenólica, aunque con fines diferentes a los taxonómicos en las dos primeras.

Los perfiles de amplificación de los marcadores moleculares ISTR, debido a su carácter universal dentro del reino vegetal y su relativa facilidad de análisis, han sido empleados en estudios de variabilidad genética de diferentes grupos de plantas, como coco, pera, aguacate, y algunas especies del género *Agave*, como *Agave cocui*, *Agave tequilana* y *Agave durangensis*. El alto nivel de polimorfismo presentado por estos marcadores ha hecho que se consideren como una herramienta valiosa para detectar variabilidad intra e interespecífica en todos esos grupos de plantas.

El presente estudio se desarrolló con el objetivo de determinar los perfiles fenólicos foliares y los perfiles ISTR de *Agave victoriae-reginae* para establecer la variabilidad que existe dentro y entre las diferentes poblaciones, registrar el valor de esos dos tipos de marcadores como herramientas para evaluar las relaciones taxonómicas entre las diferentes poblaciones, y para evaluar el estatus de la población de Mezquital, Durango, localizada fuera del Desierto Chihuahuense.

Para cumplir con ese objetivo se colectaron muestras de tejido foliar de ocho diferentes poblaciones naturales de *Agave victoriae-reginae* localizadas a lo largo de toda su área de distribución. A partir de eso tejidos se aislaron, de manera individual, los compuestos fenólicos y el material genético. Los perfiles fenólicos se determinaron por medio de un método en gradiente de HPLC/DAD y los perfiles ISTR se obtuvieron con un método de amplificación de PCR, separación de las secuencias en geles de acrilamida, y la visualización de esas bandas con sales de plata. Muestras de *Agave lechuguilla* y de *Agave striata* fueron usadas como referencia y se analizaron de la misma manera. Con los resultados de ambos análisis se crearon matrices binarias de presencia/ausencia, que fueron sometidas a análisis de cluster.

Los resultados sugieren que ambos perfiles, fenólicos, formados principalmente por ácidos fenólicos y flavonoides; y ISTR, a pesar de la variabilidad intrapoblacional que presentan, discriminan claramente entre las tres especies de *Agave* analizadas. Además, la separación de la población de *Agave victoriae-reginae* de la población de Mezquital, apreciada por el análisis de cluster de ambos perfiles, apoya la posición de algunos autores de considerar a esa población como una especie diferente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos botánicos de la familia Agavaceae

La familia Agavaceae fue propuesta por Endlicher (1836-1840, 1841, citado por García-Mendoza y Galván, 1995), con base en el tipo nomenclatural del género *Agave*. Desde el establecimiento de esta familia, no ha habido consenso en su delimitación. En estudios más recientes, que toman en cuenta caracteres morfológicos, citoquímicos, químicos, biogeográficos (Dahlgren y col., 1985), bioquímicos y moleculares (Eguiarte y col., 1994; Bogler y Simpson, 1995) se acepta dividir a la familia Agavaceae en dos subfamilias: *Yuccoideae*, con ovario súpero, que incluye a los géneros *Yucca* y *Hesperaloë*, y *Agavoideae* con los géneros *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* (García-Mendoza y Galván, 1995).

Algunas de las diferencias que presenta la familia Agavaceae con respecto a otras relacionadas, Amaryllidaceae o Liliaceae, es que la primera tiene semillas con fitomelano que les da la pigmentación negra; flores grandes, bisexuales; y frutos triloculares con más de dos óvulos (García-Mendoza y Galván, 1995).

La familia Agavaceae es endémica del continente Americano y se encuentra desde el sur de Canadá hasta el norte de Sudamérica e islas del Caribe. Agavaceae alcanza los máximos niveles de riqueza y diversidad en México, y este país se considera su centro de origen (García-Mendoza, 1995). Actualmente se reconocen 300 especies organizadas en nueve géneros (Rocha y col., 2006; Good-Avila y col., 2006). México alberga alrededor de 217 especies (y 258 taxa si se consideran niveles infraespecíficos), lo cual representa el 75% del total de las especies de la familia. Los estados con mayor diversidad de agaváceas, son: Oaxaca con 52 taxa, Durango y Puebla con 43, Sonora y Jalisco con 40, Coahuila con 35, Chihuahua con 34, San Luis Potosí con 33, y Nuevo León y Zacatecas con 29 (García-Mendoza y Galván, 1995).

En los diferentes géneros de la familia Agavaceae se pueden apreciar diferentes mecanismos de reproducción. Algunas especies tardan muchos años para alcanzar

la etapa reproductiva y ésta se presenta una sola vez en su ciclo de vida, mientras que otras pueden reproducirse cada año (Rocha y col., 2006).

2.1.1 El Género *Agave*

Linneo fue el primero en describir al género *Agave*, el cual se encuentra ubicado dentro de la familia Agavaceae. Este género es quizá el más conocido de la familia Agavaceae, debido a las importantes relaciones etnobotánicas que se han originado entre sus elementos y las diversas culturas del continente Americano (Gentry, 1982; Granados-Sánchez, 1999). *Agave* es también el género más grande de la familia, incluye aproximadamente 166 especies (Good-Ávila y col., 2006; Rocha y col., 2006), de las cuales 125 se encuentran en México, con un alto nivel de endemismo (alrededor del 51%), lo que convierte a este país en el de mayor riqueza y diversidad de especies de *Agave*. Este género es relativamente joven, tiene entre 7.8 y 10.1 millones de años (Good-Avila y col., 2006).

Los usos dados a las diversas especies del género *Agave* han sido muy diversos. Las culturas prehispánicas las utilizaban para obtener alimentos, miel y vinagre; para elaborar textiles y calzado; y para fabricar herramientas, entre otros usos (Saldívar y Vargas-Rodríguez, 2007). En el presente, se usan principalmente en la elaboración de tequila y mezcal, y algunas especies como ornato (Cházaro y col., 2007).

Gentry (1982) divide al género en dos subgéneros, *Littaea* y *Agave*, de acuerdo al tipo de inflorescencia. En *Littaea*, las especies presentan inflorescencias espiciformes, mientras que en *Agave*, las especies tienen inflorescencias en forma de panícula.

El género *Agave* tiene una relevante importancia ecológica, ya que proporciona refugio y alimento para una gama muy amplia de especies animales, desde insectos hasta mamíferos, gracias entre otros aspectos a la gran cantidad de polen y néctar que producen sus flores (Gentry, 1982; Eguiarte y Souza, 2007). Esas especies animales representan los mecanismos de polinización para el género. Los murciélagos (Rocha y col., 2005), abejas, pájaros (Good-Avila y col., 2006), colibrís y

polillas (Martínez-Palacios y col., 1999) son los principales polinizadores de las especies del género *Agave*.

Los estados de la República Mexicana con mayor número de agaves son: Oaxaca con 32, Puebla con 31, Sonora con 30 y Durango con 24 (García-Mendoza y Galván, 1995). Más recientemente, González-Elizondo y col. (2009) reportaron 29 especies para el estado de Durango.

2.1.2 *Agave victoriae-reginae*

Agave victoriae-reginae T. Moore es una especie del subgénero *Littaea* que se desarrolla principalmente sobre afloramientos de caliza, por lo general sobre paredes verticales. Esta es una de las especies de *Agave* ornamental más popular (Martínez-Palacios y col., 1999). Eso ha provocado que esta especie haya sido saqueada de sus poblaciones naturales, de tal manera que actualmente se encuentra catalogada como especie en peligro por el gobierno mexicano (NOM-059-Ecol-2001) y enlistada en la CITES (1995). Las poblaciones que crecen sobre afloramientos de caliza planos casi han sido erradicadas y las únicas poblaciones sanas ahora son encontradas sobre sitios casi inaccesibles sobre las paredes de caliza de cañones (Martínez-Palacios y col., 1999).

Agave victoriae-reginae muestra altos niveles de variación genética dentro de la misma población y entre poblaciones. Estos niveles altos de diferenciación observada entre las poblaciones de *A. victoriae-reginae* podrían deberse a los altos niveles de flujo genético (Martínez-Palacios y col., 1999).

De acuerdo con González-Elizondo y col. (2009) la descripción morfológica de *Agave victoriae-reginae* es la siguiente: rosetas: pequeñas, compactas, solitarias o con vástagos, con tallo corto no visible (o visible en plantas cultivadas). Hojas: cortas, verdes con marcas blancas muy conspicuas, densa o laxamente imbricadas, 15-20(-25) x 4-6 cm, linear ovadas, agudas o truncadas o redondeadas en la punta, rígidas, gruesas, planas a cóncavas de arriba, fuertemente aquilladas a redondeadas abajo; margen córneo blanco, usualmente sin dientes, 2-5 mm de ancho, continuo hasta la

base; espina terminal 0.5-3 cm de largo, (Gentry, 1982, reporta espinas terminales 1-3, 1.5-3 cm largo), de sección triangular a cónica, subulada, muy ancha en la base, acanalada y abierta arriba, redondeadamente aquillada abajo, negra, decurrente, con frecuencia con dos espinas laterales más pequeñas. Inflorescencia: espigada, 3-5 m de alto, erecta, densamente cubierta de flores en la mitad superior, brácteas cartáceas, deltoides, largamente atenuadas. Flores: en pares o tríos sobre pedicelos bifurcados, cortos y firmes, 40-46 mm, de colores variados, los tépalos y estambres frecuentemente teñidos de rojo o púrpura; tépalos casi iguales, 18-20 x 5-6 mm, lineales, apiculados, extendidos, erectos, abrazando a los filamentos en la antesis; filamentos 45-50 mm, insertos sobre el canto del tubo; anteras 18-21 mm, amarillas a color bronce. Cápsulas: ovoides a oblongas, 17-20 x 10-13 mm, redondeadas en la base, apiculadas; semillas 3-5 x 2.5-3.5 mm, hemisféricas a lacrimiformes, ala marginal baja.

A. victoriae-reginae típico es fácilmente identificado por sus hojas sin espinas, pequeñas, verdes, gruesas, rígidas con marcas blancas sobre ambas caras. Es, sin embargo, muy variable; esto y el hecho de que se hayan hecho descripciones basadas en especímenes inmaduros y/o basadas en la morfología de las hojas, sin descripciones de las flores, ha ocasionado que se describan diferentes formas, las cuales son de acuerdo a Gentry (1982) las siguientes:

❖ *Agave victoriae-reginae f. dentata* Breitung

Hojas cortas, amplias, el margen blanco con pequeños dientes.

❖ *Agave victoriae-reginae f. latifolia* Breitung

Hojas cortas, amplias (4-6 cm), ovadas, verde oscuras, con marcas visibles blancas y espinas terminales cortas y negras.

❖ *Agave victoriae-reginae f. longifolia* Breitung

Hojas de 20-30 cm de largo, gruesa, rígida, verde oscuras.

❖ *Agave victoriae-reginae f. longispina* Breitung

Hojas acuminadas con espinas terminales alargadas 2.5-3.5 cm de largo, negras, sinuosas.

❖ *Agave victoriae-reginae f. viridis* Breitung

Hojas linear-alargadas, las marcas blancas pálidas o ausentes.

❖ *Agave victoriae-reginae f. nickelsii*

Se diferencia de la especie típica ya que presenta menos hojas y roseta más abierta.

2.2 Importancia de los estudios de variabilidad

La diversidad biológica o biodiversidad es la variedad y variabilidad de los organismos vivos y los ecosistemas de los que forman parte. Es un concepto que se ha impuesto en el campo de la conservación por su carácter globalizador, dada la necesidad de tratar a la naturaleza como un todo y de mantener la totalidad de sus componentes (Batista y Sosa, 2002).

La principal amenaza a la conservación y mantenimiento de la diversidad biológica o biodiversidad, en cualquiera de sus tres niveles, genes, especies-poblaciones y ecosistemas, se debe a los impactos humanos sobre el ambiente (Sosa, 2003). Por tal motivo la conservación de la diversidad biológica debería ser una prioridad social y política actual.

México ha firmado acuerdos mundiales, como el Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y Desarrollo (Cumbre de la Tierra, de Río de Janeiro) el 5 de junio de 1992 (http://www.conabio.gob.mx/institución/cooperación_internacional/doctos/internacional.html), en los que los compromisos fundamentales son la conservación de la diversidad biológica, el uso sostenible de los componentes de esa diversidad y el reparto justo y equitativo de los beneficios derivados del uso de esa diversidad. Para cumplir con esos compromisos se requieren conocimientos sobre la caracterización genética de las poblaciones naturales, porque de acuerdo a varios autores (Bañares, 1994; Frankel y col., 1995) la población representa la unidad básica de la conservación de una especie y el nivel de organización más adecuado para

implementar un programa de conservación (Barret y Khon, 1991). La población además, es la unidad funcional evolutiva y ecológica que constituye un nexo de unión entre la biodiversidad de especies y la biodiversidad ecológica; es donde se producen los cambios genéticos fundamentales y adaptativos que influyen en la especiación. Las poblaciones naturales y su diversidad constituyen la base de la evolución biológica y dan oportunidad a la especie para desarrollarse bajo diferentes condiciones ambientales (Sosa, 2003; Colby, 1996).

La disminución de la variabilidad genética intra e interpoblacional reduce la eficacia biológica, eso implica la disminución de la capacidad de colonización y persistencia de una población (Barret y Khon, 1991), la reducción de la producción de semillas, de la germinación o sobrevivencia de la progenie (Dudash y Fenster, 2000), la acumulación de mutaciones deletéreas (Lynch y col., 1995), y en general la reducción de la capacidad de respuesta a un cambio evolutivo potencial como consecuencia de cambios ambientales, incrementando las probabilidades de extinción de las poblaciones (Sosa y col., 2002).

La caracterización genética de las poblaciones contribuye a la conservación de los recursos naturales proporcionando herramientas que permiten describir la variabilidad genética inter e intrapoblacional; eso proporciona un marco teórico para entender los cambios evolutivos y la variación en los patrones genéticos de las poblaciones naturales (Sosa y col., 2002). La caracterización genética de poblaciones, al permitir evaluar la variabilidad natural dentro y entre poblaciones, podría permitir además disponer de caracteres moleculares para abordar problemáticas taxonómicas de delimitación de especies.

Para estimar la variabilidad vegetal se requiere contar con herramientas para identificar caracteres o marcadores que permitan discriminar entre diferentes entidades vegetales. En la actualidad existe una amplia gama de marcadores que pueden utilizarse en el estudio de la variabilidad vegetal: los morfológicos, que son los fundamentales y más ampliamente utilizados; los químicos, basados en los perfiles de compuestos del metabolismo secundario (Almaraz-Abarca y col., 2006);

los bioquímicos, que consideran los perfiles de proteínas (Martínez-Palacios y col., 1999); y los moleculares (Sosa y col., 2002; Kentner y col., 2003; Demey y col., 2004).

2.2.1 Estudios de variabilidad en el género *Agave*

Las especies de *Agave* que han sido objeto de estudios de variabilidad son las que presentan mayor importancia económica, como las que sustentan la industria del mezcal y el tequila en México. La variabilidad genética de poblaciones naturales de especies de este género se ha realizado empleando diferentes tipos de marcadores. Poblaciones del estado de Sonora de *Agave angustifolia* fueron estudiadas por Barraza y col. (2006) con marcadores moleculares AFLP y Moreno y col. (2007) estudiaron la variabilidad genética de esa misma especie y de *Agave rodacantha* a través de marcadores citogenéticos. Ambos estudios coinciden en la presencia de altos niveles de variabilidad genética en las dos especies estudiadas.

Agave tequilana es otra especie del género *Agave* que ha sido estudiada con relación a la variabilidad genética de sus plantaciones. Gil-Vega y col. (2001) reportaron, a partir de resultados obtenidos con RAPD, que esta especie presentaba un nivel muy bajo de polimorfismo, y que se trataba de un genotipo muy conservado y sin variación en el tiempo debido a que ha sido reproducido por mecanismos vegetativos. Sin embargo, algunos de esos mismos autores posteriormente reportaron niveles más altos de variabilidad en esa misma especie, utilizando el marcador AFLP (Gil-Vega y col., 2006).

Variabilidad entre plantas madre e hijuelos fue también detectada para *Agave fourcroydes* por Infante y col. (2003) empleando marcadores moleculares ISTR. Variabilidad entre individuos reproducidos de manera asexual fue detectada también en *Agave tequilana* por Torres-Morán y col. (2005), con el mismo tipo de marcadores.

La variabilidad genética de poblaciones naturales de *Agave victoriae-reginae* fue estudiada por Martínez-Palacios y col. (1999) con marcadores bioquímicos. Estos

autores reportaron una alta variabilidad genética y propusieron la posible existencia de diferentes especies o subespecies en esas poblaciones.

2.3 Marcadores moleculares

En la actualidad se cuenta con un gran número de marcadores moleculares que pueden ser empleados en estudios de genética vegetal (Godwin y col., 1997; Ford y col., 1999), y que pueden ser aplicados al mejoramiento de cultivos (Kelly y Miklas, 1998), y a estudios taxonómicos (Bachmann, 1992). Los marcadores moleculares también pueden ser usados en la evaluación de la variación en poblaciones naturales y micropropagadas así como en estudios de la diversidad vegetal; esa información es valiosa para la conservación y el empleo de germoplasmas (Infante y col., 2003). Además, esos marcadores permiten estimar el número de genes y su localización cromosómica (González y col. 2003).

La capacidad para detectar diferencias existentes en diversas secuencias del ADN, con las que se pueden generar perfiles o huellas genéticas únicas para cada organismo; y la propiedad de ser independientes de una serie de factores como el tipo de tejido estudiado, la edad del individuo, su estadio fisiológico, y su lugar de crecimiento, son algunas de las características de los marcadores moleculares que hacen valiosa su aplicación en diferentes áreas científicas (Barraza y col., 2006).

Marcadores como RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNA), RFLPs (Restriction Fragments Length Polimorphism), AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphism), SSRs (Simple Sequence Repeats), ISSRs (Inter-Simple Sequences Repeat Amplification), e ISTRs (Inverse Sequence Tagged Repeats) se encuentran entre los más empleados. La elección del marcador molecular depende de varios aspectos, entre ellos, si existe información previa sobre secuencias específicas del genoma en estudio, el resultado que se pretende obtener, y los costos de aplicación de la técnica. Para casos en donde no se conoce información previa que facilite la elección de un marcador especie-específico como los SSRs, la opción puede recaer en los marcadores que detectan secuencias aleatorias (RAPD, AFLP) o que están

basados en secuencias que se encuentran en todos los organismos, como es el caso de los marcadores basados en secuencias de retrotransposones (Torres, 2009).

2.3.1 Diversidad de marcadores moleculares

De acuerdo a Sosa y col. (2002), los marcadores moleculares pueden ser ilimitados en número. Pueden dividirse en cuatro clases de acuerdo a la técnica con la cual se detectan: los detectados por el empleo de endonucleasas sito-específico e hibridación (RFLPs), los detectados por PCR (RAPDs, ISTR), los detectados por secuenciación (loci específicos), y los híbridos (AFLPs). Por la facilidad de análisis y accesibilidad económica, los detectados por PCR son actualmente los más utilizados en estudios que involucren el análisis de un número grande de muestras, como pueden ser los poblacionales y los taxonómicos.

A continuación se describen, de manera muy breve, algunos de los marcadores más ampliamente usados actualmente.

RFLPs, están basados en la detección de polimorfismo empleando enzimas de restricción, Southern blot e hibridación. Requieren cantidades grandes de ADN para resultados óptimos y requieren un conocimiento previo o información sobre las secuencias de ADN de interés (Gabriel y De Feyter, 1992).

RAPDs, se basan en el estudio de los fragmentos que se amplifican entre dos regiones flanqueadas por oligonucleótidos con secuencias arbitrarias y de pequeño tamaño. Se necesitan pequeñas cantidades de material vegetal y no requiere un conocimiento previo de las secuencias de interés, lo hace los hace adecuados para estudios de especies amenazadas (Sosa, 2003).

AFLPs, se basa en el tratamiento de ADN con enzimas de restricción y la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción generados (Vos y col., 1995). No necesitan de ningún conocimiento previo sobre la secuencia del ADN del organismo. Se han empleado para determinar relaciones evolutivas entre organismos (Aggarwal y col., 1999), selección de individuos con fines de mejoramiento, identificación varietal (Barret y col., 1998), homologías de genomas entre especies

cultivadas (Caicedo y col., 1999), análisis filogenético, diversidad genética (Marsan y col., 1998), y detección de variación somaclonal (Barraza y col., 2006).

ISTR, son marcadores basados en la amplificación selectiva por PCR de ADN genómico que contiene elementos retrotransposables. Requieren del conocimiento previo de la secuencia de ADN de interés. Producen numerosas bandas (Rhode, 1996).

2.4 Marcadores moleculares basados en elementos móviles del genoma

2.4.1 Elementos móviles del genoma

Gran parte de la diversidad genética de los organismos ha sido atribuida a las secuencias de ADN móviles, también conocidas como elementos de transposición (Tam y col., 2007). Estos elementos pueden causar mutaciones que alteran o modifican las funciones de genes (Bennetzen, 2000).

Un elemento genético transponible puede generar cambios evolutivos importantes, ya que puede reorganizar disposiciones cromosómicas y dar nuevas formas de expresión fenotípicas que llevan a nuevas especies (Hernández, 2006).

De acuerdo a Finnegan (1992), los elementos transponibles se dividen en dos clases según su mecanismo de transposición. Los elementos Clase I, retroelementos o retrotransposones, y los elementos Clase II o transposones. En los elementos de clase II el propio ADN es el que se mueve, en los elementos de clase I, el ADN se transcribe a RNA, éste se retrotranscribe y es la copia de ADN la que se integra en la nueva localización. Este último modo de replicación de transposición puede provocar un incremento rápido del número de copias de los elementos en el genoma huésped. Los transposones de ADN se mueven directamente vía un intermediario de ADN, mediante un mecanismo de “corte y pega” de manera que no aumentan significativamente su número de copias en el genoma huésped (Rico, 2005).

2.4.2 Retrotransposones

Los retrotransposones son elementos móviles del genoma que emplean la enzima transcriptasa inversa para llevar a cabo su movilidad dentro del material genético. Esa enzima sintetiza, a partir de un ARN intermediario, un ADN copia (ADNc), que se reinserta en un locus diferente. Ese mecanismo de replicación y su organización en general (Bousios y col., 2007) son muy semejante a los de los retrovirus, con la diferencia de que los retrotransposones no forman partículas infecciosas (Mallik y col., 2000; Teo y col., 2005). Esa semejanza entre retrovirus y este tipo de elementos genéticos transponibles hizo surgir el concepto de retrotransposón (Rennie, 1993).

De acuerdo a su estructura, los retrotransposones pueden ser de repeticiones terminales largas (LTR, Long Terminal Repeats), llamados LINES, y retrotransposones, que pueden ser largos o cortos, sin LTR, llamados SINES. Los LTR son los más abundantes en los genomas vegetales (Pearce y col., 1996). Las regiones LTR limitan una región codificante que contiene los genes que los retroelementos necesitan para su transposición, esto es genes que codifican proteínas estructurales y genes que codifican enzimas funcionales (Havecker y col., 2004).

Se ha determinado que el mecanismo por el cual se mueven los diversos retrotransposones LTR es similar. Primeramente, los retrotransposones transcriben un ARN, este ácido es traducido en el citoplasma para sintetizar las enzimas que llevan a cabo la transcripción inversa y la integración del nuevo ADNc en un lugar diferente del genoma (Havecker y col., 2004).

Los retrotransposones han sido capaces de lograr una alta tasa de colonización y de diversidad en los cromosomas de las angiospermas, y pueden llegar a representar en algunas especies hasta el 80% de su genoma (Feschotte y col., 2002; Kalendar y col., 2004). Eso ha traído como consecuencia que en los genomas de esas plantas este presente un gran número de copias de retroelementos y elevados niveles de polimorfismo (Pearce y col., 2000). Esa abundancia y diversidad da a los retrotransposones un potencial importante como marcadores genéticos para analizar

la diversidad biológica (Flavell y col., 1998). La predominancia y alto potencial de amplificación convierte a los retrotransposones en una importante fuerza de evolución de las especies de plantas (Bennetzen, 2002; Schulman y Kalendar, 2005).

2.4.3 Marcadores ISTR

Los marcadores ISTR son marcadores moleculares que se detectan por PCR. Las ventajas que presentan sobre otros marcadores moleculares empleados en la caracterización genética de plantas son las siguientes: utilizan iniciadores universales, no es necesaria la radioactividad para su visualización, amplifican un gran número de loci (5 a 100), detectan un polimorfismo considerable, son altamente reproducibles, no requieren gran cantidad ni alta calidad de ADN, y se aplican a un amplio espectro de organismos (Lightbourn y Veilleux, 2003). Uno de los primeros trabajos realizados con marcadores ISTR es el reportado por Rhode (1996) en coco. En ese estudio se pone de manifiesto las ventajas de estos marcadores con respecto a otros también de tipo molecular.

Se han encontrado y caracterizado un número elevado de retrotransposones en diversas especies vegetales, que van desde arbóreas (algunas especies de pinos) hasta cultivos básicos (Rocheta y col., 2007). Algunos frutales también han sido caracterizados con ISTR, entre ellos se encuentran el manzano (Tignon y col., 2001), y la pera (Shi y col., 2002).

Los iniciadores o “primers” de los ISTR se basan en las secuencias de los elementos repetidos en las regiones terminales de los retrotransposones de los cuales se generaron. Esas secuencias son una herramienta muy apropiada para el estudio de la biodiversidad genética, la evolución del genoma, mutación de los genes y su expresión. Sin embargo, aún es escasa la información con la que se cuenta con respecto a la secuencia de estos retrotransposones y sus LTRs, lo que en ocasiones dificulta su utilización. Algunos retrotransposones, como los del genoma de manzana, han sido bien caracterizados, encontrándose 31 diferentes genes para transcriptasa inversa (RT) en retrotransposones *Ty1-copia-like*. De esos genes, 19 mostraron extrema heterogeneidad en términos de longitud de los fragmentos,

composición en pares de bases y marco de lectura abierto (Zhao y col., 2007). Esa caracterización puede facilitar la aplicación de esos marcadores a diferentes estudios de ese cultivo.

Debido a que los marcadores ISTR presentan diferentes grados de heterogeneidad en sus secuencias y de polimorfismo debido a su inserción aleatoria, poseen una gran capacidad de detección de variabilidad tanto inter como intra-específica y por lo tanto, pueden detectar diferencias entre individuos y entre poblaciones. Han sido utilizados en la detección de polimorfismo entre variedades de melón para la posterior creación de un mapa de ligamiento, utilizando pruebas de cruzas para comprobar la utilidad de detección de genes de importancia ligados a la posición de estos elementos (Reddy y col., 2004).

Las propiedades de los marcadores basados en secuencias de retrotransposones, o bien en los LTR que los flanquean, pueden ser usadas en combinación con otros marcadores menos específicos para incrementar la precisión de lo que se busca. Tal es el caso de la combinación de enzimas de restricción como *MseI* y los LTRs que flanquean al retrotransposon *vine-1* encontrado en vid. Una de las secuencias que flanquean el *vine-1* fue usada para discriminar fragmentos amplificados por AFLPs de manera que la amplificación selectiva se realizó utilizando un extremo de esa secuencia y como segundo extremo, el reconocido por la enzima *MseI*, empleando el marcador basado en retrotransposones S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) que posteriormente se comparó con los AFLPs. La diversidad y heterocigosidad detectada con S-SAP fue mayor a la de AFLP, por lo que se concluyó que S-SAP fue más efectivo para detectar polimorfismo y definir distancias genéticas entre cultivares de vid y fue ampliamente recomendado para *fingerprinting* (Labra y col., 2004).

2.5 Marcadores químicos

Los marcadores químicos están basados en los perfiles de los compuestos secundarios de las plantas. Éstos representan una gama muy amplia de compuestos que por no habérseles encontrado una participación directa en los procesos

fundamentales de fotosíntesis, respiración, desarrollo, y crecimiento se les llamó metabolitos secundarios (Kutchan, 2001). Aunque en la actualidad su apreciación ha cambiado y se les reconocen participaciones muy diversas en los procesos fisiológicos (Taiz y Zeiger, 2008) y en las relaciones ecológicas de las plantas para asegurar la sobrevivencia como especie (Almaraz y col., 1998; Hadacek, 2002), a esos compuestos se les sigue llamando secundarios.

Los metabolitos secundarios se dividen en tres grupos de acuerdo a sus rutas biosintéticas: derivados terpénicos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos (Taiz y Zeiger, 2008).

Los compuestos fenólicos, fenoles, o polifenoles son un grupo muy diverso y ampliamente distribuido en el reino vegetal, incluye compuestos de tamaño molecular pequeño, como los fenoles simples y benzoquinonas, de 6 átomos de carbono (C_6); de tamaño molecular medio, como los flavonoides ($C_6C_3C_6$); hasta grandes polímeros, como las ligninas y los taninos, de n átomos de carbono [$(C_6-C_3)_n$ y $(C_6-C_3-C_6)_n$, respectivamente] (Harborne, 1989).

2.5.1 Los flavonoides

Dentro de los fenoles, los flavonoides son los que se encuentran más ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal y son los más abundantes, los más diversos (Markham, 1982), y los preferidos para estudios quimiotaxonómicos (Harborne y Turner, 1984; Campos, 1997; Almaraz-Abarca y col., 2006, Almaraz-Abarca y col., 2008).

Los flavonoides tienen una gama muy amplia de funciones dentro de las plantas. Pueden participar en el establecimiento de las relaciones de competencia con otras plantas, actuando como agentes alelopáticos (Nilsen y col., 1999; Ervin y Wetzel, 2000); contra invasiones de hongos, bacterias y virus (Harborne, 1993; Ryals y col., 1994); en el establecimiento de relaciones de mutualismo en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas (Mol y col., 1998; Ramos y col., 1998; Pichersky y Gang, 2000); en funciones defensivas contra el ataque de herbívoros

(Elliger y col., 1980; Williams y Harborne, 1989; Dewick, 1994; Foo y col., 1997); como protección contra la radiación ultravioleta y la desecación (Burger y Edwards, 1996); como reserva de material nitrogenado (Poulton, 1990); así como en la fijación del N₂ atmosférico, a través de la formación de nódulos en la relación simbiótica de las raíces de las leguminosas con bacterias del género *Rhizobium* (Peters y Long, 1988; Bohm, 1994; Stafford, 1997; Novák y col., 2002; Peck y col., 2006).

En función de sus características estructurales los flavonoides se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de flavonoides está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación, acilación, y glicosilación. Los patrones de modificación son regulados por enzimas que catalizan reacciones de modificación de flavonoides individuales exhiben una alta especificidad de sustrato, implicando que esas reacciones proceden en un orden secuencial definido, que se considera específico para cada especie de planta (Heller y Forkmann, 1994). Esta variabilidad, que surge por los patrones de modificación, genera perfiles fenólicos diferentes entre los miembros de una población, y entre especies, lo cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas (Wink y Schimmer, 1999).

Algunas de las características de los perfiles fenólicos, principalmente de flavonoides, por los que son empleados en estudios quimiotaxonómicos, son las siguientes: su amplia distribución en todos los grupos de plantas; su gran variabilidad química; la relativa independencia de su síntesis y almacenamiento, con respecto a los factores ambientales; su relativa facilidad de análisis (Markham, 1982); y su determinación genética, que está dada, en el caso de algunos flavonoides, por un solo gen (Harborne y Turner 1984).

2.6 Antecedentes de estudios quimiotaxonómicos del género *Agave*

Los estudios fitoquímicos con enfoques taxonómicos, basados en perfiles fenólicos, han sido reportados para un número grande de grupos de plantas. Existe un número elevado de reportes que hacen referencia a la importancia de los perfiles fenólicos en estudios de discriminación entre taxa relacionados (Bate-Smith y col., 1975; Del Pero y col., 1997; Almaraz-Abarca y col., 2006); otros más que enfatizan una tendencia especie-específica de los perfiles fenólicos de tejidos reproductivos como el polen (Almaraz-Abarca y col., 2008; Campos, 1997; Almaraz-Abarca y col., 2004) y de tejidos somáticos (Fukai y col., 1996; Grayer y col., 1996). Sin embargo no obstante su importancia económica y ecológica, los esfuerzos enfocados a determinar el valor taxonómico de los perfiles fenólicos en las diversas especies del género *Agave* son muy pocos a pesar de la relevancia taxonómica de éstos; y a pesar de la problemática taxonómica sobre la delimitación de las diferentes especies de éste género.

Los estudios fitoquímicos de las especies de *Agave* han estado principalmente enfocados a la composición de saponinas, metabolitos secundarios de origen terpénico (Morales 1972; Wilkomirski y col., 1975; Blunden y col., 1978; Uniyal y col. 1991). Una de las pocas especies de *Agave* analizadas por su composición fenólica es *Agave americana*. En esa especie se han encontrado en tejidos somáticos flavonoides complejos, como 5,7-dihidroxi-6,5'-dimetoxi-3',4'-metilenedioxiflavanona (Parmar y col., 1992), y canferol-3-glucósido y canferol-3-rutnósido en flores (Subramanian y Nair, 1970). Otro tipo de flavonoides complejos, como los

flavonoides 7-hidroxi-3-(4-meytoxibenzil)-cromano, 7-hidroxi-3-(4-metoxibenzil)-cromano-4-ona, y 5,7-dihidroxi-3-(4-metoxibenzil)-cromano-4-ona, fueron encontrados en *Agave americana* y *Agave barbedensis* por Tinto y col. (2005). Jay (1994) menciona la presencia de glicosilflavonoides en otras especies de agaváceas: dos especies del género *Dasyllirion*, *Nolina recurvata*, y *Yucca aloifolia*. Sin embargo, ninguno de esos estudios se realizó con un enfoque taxonómico.

El único reporte encontrado, durante la búsqueda de información bibliográfica realizada para el presente estudio, fue el de Almaraz-Abarca y col. (2009), que da cuenta sobre la importancia de los perfiles fenólicos foliares y de tejidos reproductivos para detectar variabilidad intra e interespecífica en *Agave durangensis*, *A. shrevei subsp. shrevei*, *A. shrevei subsp. matapensis*, *A. wocomahi*, y *Agave asperrima*.

3. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento específico de los recursos naturales, en relación a sus características distintivas, su distribución geográfica, sus requerimientos ecológicos para el crecimiento y reproducción, y los niveles de variabilidad intra e interpoblacionales, son aspectos fundamentales para el desarrollo de programas de manejo racional y de conservación y/o recuperación (Martínez-Palacios y col., 1999). Los estudios sobre la variabilidad genética de *Agave victoriae-reginae* son escasos, el único encontrado hasta la fecha para la realización de este trabajo es el de Martínez-Palacios y col. (1999), que está basado en el polimorfismo enzimático. Esos autores reportan una alta variabilidad morfológica y bioquímica entre las diferentes poblaciones de esa especie, aunque no incluyeron poblaciones de *A. victoriae-reginae* de Mezquital, Durango. Estas últimas representan el límite suroeste de la distribución geográfica de la especie y presentan algunas características morfológicas, a su vez, también diferentes a las poblaciones del centro y oriente de su distribución. Esas diferencias morfológicas entre poblaciones generan una problemática taxonómica en relación a cuál de las formas corresponde el nombre de la especie.

Agave victoriae-reginae es una especie endémica del Desierto Chihuahuense mexicano (García-Mendoza y Galván, 1995), que está en un estatus de peligro de extinción por el gobierno de México (Martínez-Palacios y col. 1999; NOM-059-Ecol-2001; CITES 1995) debido a la intensa recolección clandestina de sus poblaciones naturales para venderse como planta de ornato. Esto y otros hechos como el cambio del uso del suelo, pueden provocar la reducción del hábitat de esta especie, el fraccionamiento de sus poblaciones, desviaciones en su distribución, y pérdida de la variabilidad genética de sus poblaciones.

La problemática taxonómica que existe alrededor de *Agave victoriae-reginae* y el riesgo en el que se encuentran sus poblaciones naturales justifican el realizar

estudios sobre la variabilidad genética de caracteres químicos y moleculares que contribuyan a esclarecer la problemática taxonómica de esta especie.

4. OBJETIVO

Determinar el valor de los marcadores moleculares ISTR y de los perfiles fenólicos foliares para detectar variabilidad genética intra e interpoblacional en ocho poblaciones naturales de *Agave victoriae-reginae* de los estados de Durango, Coahuila y Nuevo León.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Descripción del área de estudio

Se tomaron muestras de tejido foliar de ocho poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, de los estados de Durango, Coahuila y Nuevo León. Los datos geográficos de los sitios de colecta se muestran en el Cuadro 1 y en la Figura 1.

Cuadro 1. Sitios de colecta de *Agave victoriae-reginae*

Muestra	Localidad	Latitud (N)	Longitud (W)	Altitud (m)	Tipo de vegetación	Fecha de colecta
r1	Lerdo, Durango	25° 16' 99"	103° 45' 99"	1300	Matorral xerófilo	26/04/2009
r2	Lerdo, Durango	25° 16' 99"	103° 45' 99"	1300	Matorral xerófilo	26/04/2009
r3	Bustamante, Nuevo León	26° 34' 0"	100° 39' 0"	600	Matorral xerófilo	03/05/2009
r4	Bustamante, Nuevo León	26° 34' 0"	100° 39' 0"	600	Matorral xerófilo	03/05/2009
r5	Bustamante, Nuevo León	26° 34' 0"	100° 39' 0"	600	Matorral xerófilo	03/05/2009
r6	Santa Catarina, Nuevo León	25° 29' 33"	100° 23' 7"	1443	Matorral xerófilo	05/05/2009
r7	Santa Catarina, Nuevo León	25° 29' 33"	100° 23' 7"	1443	Matorral xerófilo	05/05/2009
r8	Santa Catarina, Nuevo León	25° 29' 33"	100° 23' 7"	1443	Matorral xerófilo	05/05/2009
r9	Santa Catarina, Nuevo León	25° 39' 0"	100° 30' 0"	1443	Matorral xerófilo	07/05/2009
r10	Santa Catarina, Nuevo León	25° 39' 15"	100° 38' 50"	1443	Matorral xerófilo	07/05/2009
r11	Santa Catarina, Nuevo León	25° 39' 15"	100° 38' 50"	1443	Matorral xerófilo	07/05/2009
r12	Santa Catarina, Nuevo León	25° 38' 34"	100° 28' 46"	807	Matorral xerófilo	07/05/2009
r13	Santa Catarina, Nuevo León	25° 38' 34"	100° 28' 46"	807	Matorral xerófilo	07/05/2009
r14	Santa Catarina, Nuevo León	25° 38' 0"	100° 28' 0"	807	Matorral xerófilo	07/05/2009
r15	Ramos Arizpe, Coahuila	25° 30' 38"	100° 54' 4"	1502	Matorral xerófilo	10/05/2009
r16	Ramos Arizpe, Coahuila	25° 30' 38"	100° 54' 4"	1502	Matorral xerófilo	10/05/2009
r17	Ramos Arizpe, Coahuila	25° 30' 38"	100° 54' 4"	1502	Matorral xerófilo	10/05/2009
r18	Ramos Arizpe, Coahuila	25° 31' 0"	100° 53' 28"	1502	Matorral xerófilo	10/05/2009

r19	Ramos Arizpe, Coahuila	25° 31' 0"	100° 53' 28"	1502	Matorral xerófilo	10/05/2009
r20	Ramos Arizpe, Coahuila	25° 31' 0"	100° 53' 28"	1502	Matorral xerófilo	10/05/2009
r21	Arteaga, Coahuila	25° 28' 31"	100° 51' 38"	1688	Matorral xerófilo	09/05/2009
r22	Arteaga, Coahuila	25° 28' 31"	100° 51' 38"	1688	Matorral xerófilo	09/05/2009
r23	Arteaga, Coahuila	25° 28' 31"	100° 51' 38"	1688	Matorral xerófilo	09/05/2009
r24	Arteaga, Coahuila	25° 28' 31"	100° 51' 38"	1688	Matorral xerófilo	09/05/2009
r25	Arteaga, Coahuila	25° 28' 31"	100° 51' 38"	1688	Matorral xerófilo	09/05/2009
r26	Arteaga, Coahuila	25° 28' 31"	100° 51' 38"	1688	Matorral xerófilo	09/05/2009
r27	Mina, Nuevo León	25° 57' 56"	100° 36' 7"	645	Matorral xerófilo	08/05/2009
r28	Mina, Nuevo León	25° 57' 56"	100° 36' 7"	645	Matorral xerófilo	08/05/2009
r29	Mina, Nuevo León	25° 57' 56"	100° 36' 7"	645	Matorral xerófilo	08/05/2009
r30	Lerdo, Durango	25° 19' 33"	103° 44' 7"	1250	Matorral xerófilo	25/05/2009
r31	Lerdo, Durango	25° 19' 33"	103° 44' 7"	1250	Matorral xerófilo	25/05/2009
r32	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/05/2009
r33	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/05/2009
r34	Santa Catarina, Nuevo León	25° 37' 31"	100° 27' 36"	745	Matorral xerófilo	30/05/2009
r35	Santa Catarina, Nuevo León	25° 37' 31"	100° 27' 36"	745	Matorral xerófilo	30/05/2009
r36	Bustamante, Nuevo León	26° 34' 46"	100° 39' 58"	695	Matorral xerófilo	31/05/2009
r37	Bustamante, Nuevo León	26° 34' 46"	100° 39' 58"	695	Matorral xerófilo	31/05/2009
r38	Bustamante, Nuevo León	26° 34' 18"	100° 39' 29"	706	Matorral xerófilo	31/05/2009
r39	Santa Catarina, Nuevo León	25° 33' 43"	100° 24' 17"	873	Matorral xerófilo	30/05/2009
r40	Santa Catarina, Nuevo León	25° 33' 43"	100° 24' 17"	873	Matorral xerófilo	30/05/2009
r41	Santa Catarina, Nuevo León	25° 29' 57"	100° 23' 9"	1432	Matorral xerófilo	30/05/2009
r42	Santa Catarina, Nuevo León	25° 29' 57"	100° 23' 9"	1432	Matorral xerófilo	30/05/2009
r43	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	15/06/2009
r44	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	15/06/2009
r45	El Mezquital, Durango	23° 30' 49"	104° 23' 39"	1444	Matorral subtropical	15/06/2009
r46	Lerdo, Durango	25° 30' 28"	103° 40' 13"	1211	Matorral	13/08/2009

					xerófilo	9
r47	Lerdo, Durango	25° 30' 28"	103° 40' 13"	1211	Matorral xerófilo	13/08/2009
r48	Viesca, Coahuila	25° 11' 24"	102° 38' 59"	1292	Matorral xerófilo	12/08/2009
r49	Viesca, Coahuila	25° 11' 24"	102° 38' 59"	1292	Matorral xerófilo	12/08/2009
r50	Viesca, Coahuila	25° 11' 15"	102° 39' 2"	1262	Matorral xerófilo	12/08/2009
r51	Viesca, Coahuila	25° 11' 15"	102° 39' 2"	1262	Matorral xerófilo	12/08/2009
r52	Lerdo, Durango	25° 14' 23"	103° 44' 22"	1267	Matorral xerófilo	10/08/2009
r53	Lerdo, Durango	25° 14' 23"	103° 44' 22"	1267	Matorral xerófilo	10/08/2009
r54	Lerdo, Durango	25° 14' 23"	103° 44' 22"	1267	Matorral xerófilo	10/08/2009
r55	Lerdo, Durango	25° 14' 23"	103° 44' 22"	1267	Matorral xerófilo	10/08/2009
r56	Lerdo, Durango	25° 14' 23"	103° 44' 22"	1267	Matorral xerófilo	10/08/2009
r57	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r58	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r59	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r60	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r62	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r63	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r64	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r65	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r66	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r67	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r68	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r69	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r70	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r71	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r74	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r75	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r76	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009

r82	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r83	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r84	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r85	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r86	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r87	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009
r88	El Mezquital, Durango	23° 30' 36"	104° 23' 42"	1453	Matorral subtropical	25/10/2009

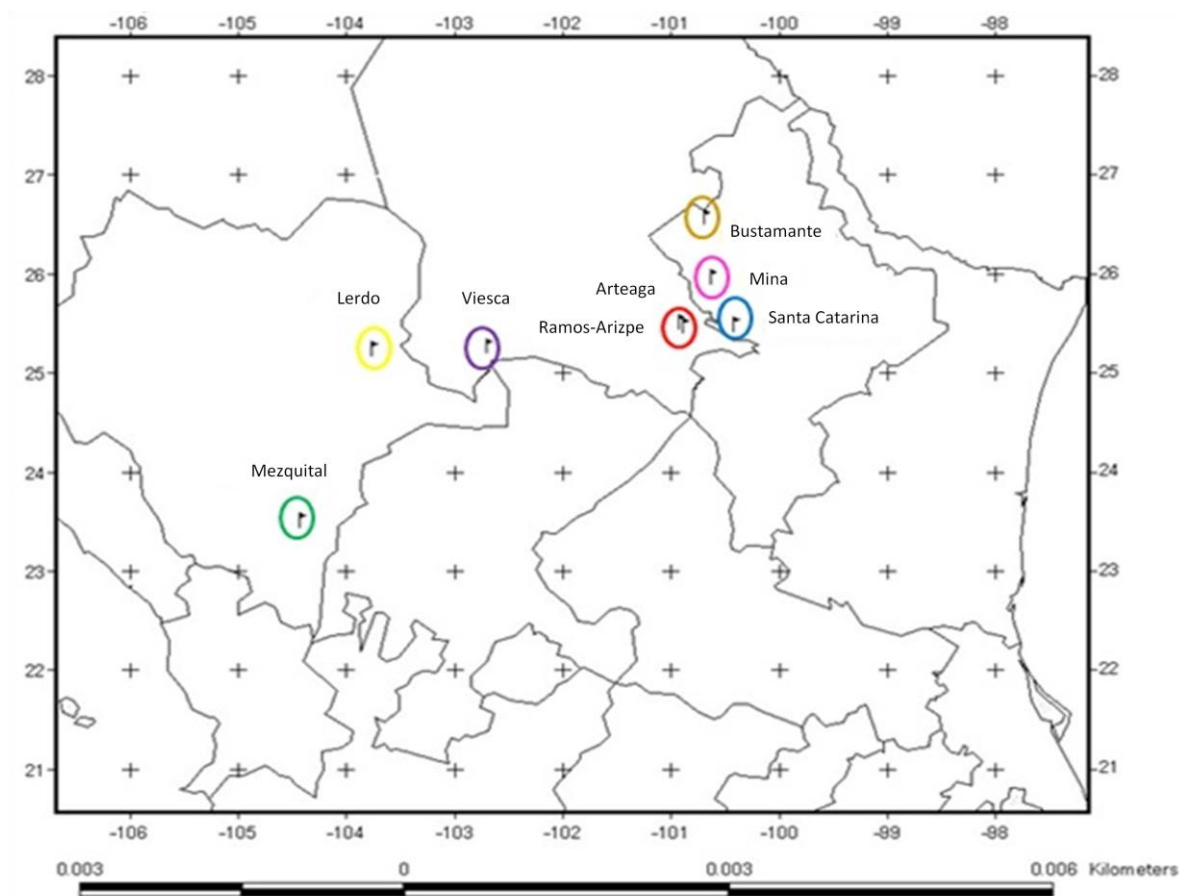


Figura 1. Localización de los sitios de colecta de *Agave victoriae-reginae*

En las Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se muestran las diferentes poblaciones donde se colectó *Agave victoriae-reginae* de los estados de Durango, Coahuila y Nuevo León.



Figura 2. Sitio de muestreo e individuo en Mezquital, Durango de *Agave victoriae-reginae*



Figura 3. Sitio de muestreo e individuo en Lerdo, Durango de *Agave victoriae-reginae*



Figura 4. Sitio de muestreo e individuo en Viesca, Coahuila de *Agave victoriae-reginae*



Figura 5. Sitio de muestreo e individuo en Ramos-Arizpe, Coahuila de *Agave victoriae-reginae*



Figura 6. Sitio de muestreo e individuo en Arteaga, Coahuila de *Agave victoriae-reginae*



Figura 7. Sitio de muestreo e individuo en Bustamante, Nuevo León de *Agave victoriae-reginae*

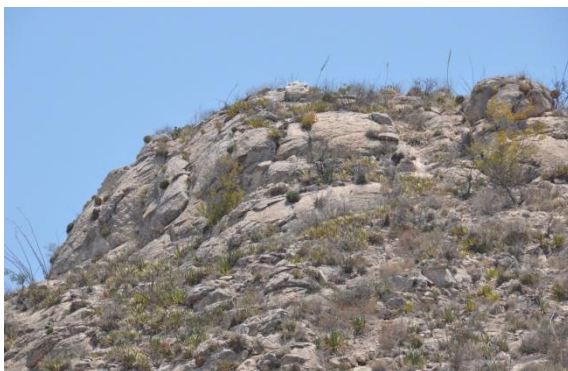


Figura 8. Sitio de muestreo e individuo en Mina, Nuevo León de *Agave victoriae-reginae*



Figura 9. Sitio de muestreo e individuo en Santa Catarina, Nuevo León de *Agave victoriae-reginae*

Muestras de tejido foliar de *Agave striata* y *Agave lechuguilla* fueron colectadas y utilizadas como referencia, las dos especies para los análisis químicos y solo *Agave lechuguilla* para los análisis moleculares. Los datos geográficos de los sitios de colecta de estas dos especies se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Sitios de colecta de *A. striata* y *A. lechuguilla*

Muestra	Localidad	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (m)	Tipo de vegetación	Fecha de colecta
1000-1040	Lerdo, Durango	25° 15' 39"	103° 4' 29"	1311	Matorral xerófilo	26-04-2009
2000-2029	Lerdo, Durango	25° 16' 17"	103° 45' 4"	1303	Matorral xerófilo	3-10-2009

5.2 Muestreo

Se realizaron muestreos sistemáticos de tejido foliar de individuos adultos de *Agave victoriae-reginae*, de *Agave lechuguilla* y de *Agave striata*. Muestras “voucher” de cada individuo colectado se depositaron en el herbario CIIDIR. En el Cuadro 3 se indica el número de individuos muestreados por población.

Cuadro 3. Número de individuos muestreados en cada población estudiada

Especie	Población	# de individuos
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Mezquital, Durango	29
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Lerdo, Durango	11
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Arteaga, Coahuila	6
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Ramos-Arizpe, Coahuila	6
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Viesca, Coahuila	4
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Santa Catarina, Nuevo León	15
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Mina, Nuevo León	3
<i>Agave victoriae-reginae</i>	Bustamante, Nuevo León	6
<i>Agave lechuguilla</i>	Lerdo, Durango	27
<i>Agave striata</i>	Lerdo, Durango	10
Total:		117

5.3 Perfiles ISTR

5.3.1 Extracción del ADN

Cada muestra de tejido fue analizada de manera individual. Se utilizó el método de Keb-Llanes y col. (2002), que se basa en la utilización del detergente CTAB. Se pesaron 200mg de tejido foliar, que se pulverizaron con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado fue homogeneizado en 400 μ L de regulador A (EDTA 50mM, Tris-HCl 100mM, cloruro de sodio 100mM, ácido ascórbico 0.1%, PVP 40 4%, CTAB 2%, β -mercaptoetanol 10mM), 1200 μ L de regulador B (EDTA 50mM, Tris-HCl 100mM, cloruro de sodio 100mM, β -mercaptoetanol 10mM), y 134 μ L de SDS al 20%. La lisis celular se llevó a cabo por incubación a 65°C, durante 40 minutos. Se agregaron 300 μ L de acetato de potasio 5M y se centrifugó a 11000 rpm, a 4°C, durante 17 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se combinó con un volumen igual de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 3500 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se combinó con 0.5 volumen de isopropanol frío. La muestra se incubó durante 20 minutos en congelación. Después de centrifugar a 3500 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla resultante con etanol al 70%. Después de centrifugar, el sobrenadante se decantó, la pastilla se resuspendió en 600 μ L de regulador TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM) y se adicionaron 60 μ L de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y 660 μ L de isopropanol frío. Las muestras se incubaron durante 20 minutos en congelación. El ADN precipitado se recuperó después de centrifugar a 11000 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Las muestras de ADN se permitieron secar a temperatura ambiente. Las muestras de ADN se resuspendieron en 50 μ L de regulador TE.

5.3.2 Cuantificación espectrométrica del ADN

La cuantificación del ADN obtenido de cada muestra de tejido se determinó por un método espectrométrico estándar, de acuerdo a Bankier (1996). Se utilizó un espectrofotómetro marca SPECTRONIC modelo GENESYS 2. De manera individual, se tomaron 4 μ L de cada solución de ADN y se combinaron con 496 μ L de agua tridestilada (dilución 1/125). Se determinaron los valores de absorbancia a 260 nm.

La concentración de ADN en cada muestra se determinó considerando que $1A = 50$ ng/ μ L de ADN (Jofuku y Goldberg, 1988) y tomando en cuenta el factor de dilución.

5.3.3 Determinación de la pureza del ADN

La determinación de la pureza de las muestras de ADN se realizó por un método espectrométrico estándar, de acuerdo a Sambrook y col. (1989). De manera individual, se determinaron los valores de absorbancia a 280 nm, de cada una de las muestras de ADN y se estimaron los valores de la relación A_{260}/A_{280} (considerando las lecturas previas correspondientes de absorbancia a 260 nm). Valores de esas proporciones iguales o mayores a 1.7 indicaron que el ADN se encontraba lo suficientemente puro para su posterior tratamiento con PCR.

5.3.4 Apreciación del tamaño molecular y de la integridad del ADN

La apreciación del tamaño molecular y de la integridad de las muestras de ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa, de acuerdo a Andrews (1991). Se prepararon geles de agarosa al 0.8%, utilizando el regulador TAE (Tris-HCl 0.4M, EDTA 2M, ácido acético glacial). Los geles se tiñeron con SYBR Green.

5.3.5 Detección de marcadores ISTR

La detección de los marcadores ISTR se realizó por amplificación por PCR de acuerdo a lo reportado por Osorio y col. (2006). Para cada muestra individual se preparó una mezcla de reacción (volumen final de 20 μ L) que contenía: Regulador 5X (Greengo Taq.), iniciadores, $MgCl_2$ 25mM, mezcla de nucleótidos trifosfatados, Taq polimerasa, y agua inyectable.

Se utilizó el par de iniciadores F1/B6, diseñados por D. Infante (Fundación Estudios Avanzados IDEA, Caracas, Venezuela), con base en secuencias de retrotransposones. Las secuencias de los iniciadores fueron F1: d5' [GCA CTC CAC CAA GAA TAC C] 3', y B6: d5' [GGT TCC ACT TGG TCC TTA G] 3'. Las muestras fueron amplificadas en un termociclador marca TECHNE modelo GENIUS.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos; seguido de 40 ciclos que comprendieron desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, alineación a 45°C durante 1 minuto, y extensión a 72°C durante 2 minutos. El programa finalizaba con un ciclo de almacenamiento a 4°C, por tiempo indefinido.

5.3.6 Separación y visualización de las secuencias ISTR amplificadas

La separación de las secuencias ISTR amplificadas se prepararon por electroforesis en geles de acrilamida al 6%, de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. (1989), y se visualizaron por tinción con sales de plata, de acuerdo al método descrito por Sanguinetti y col. (1994).

La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 55 V, colocando 20uL de cada muestra de ADN en los pocillos. Se utilizó como marcador de peso molecular BenchTop DNA Markers.

5.3.7 Caracterización de los fragmentos de ISTR por su tamaño molecular

Las estimaciones de los tamaños moleculares de cada secuencia amplificada se realizaron por interpolación de sus movilidades electroforéticas (en mm) en la ecuación lineal resultante de la linealización de la curva hiperbólica que rige el comportamiento de las migraciones electroforéticas de las secuencias del marcador de tamaño molecular con relación a su tamaño (pb).

La Figura 10 muestra el comportamiento de los valores de migración de las bandas del marcador molecular con relación a su tamaño molecular. La linealización de esa curva, obtenida graficando el $\log(\text{tamaño molecular})$ vs. movilidad electroforética se muestra en la Figura 11. Con la ecuación lineal resultante, $Y = -0.0078 X + 2.9628$, $r = 0.9820$, se estimaron los valores del tamaño molecular de las secuencias ISTR amplificadas.

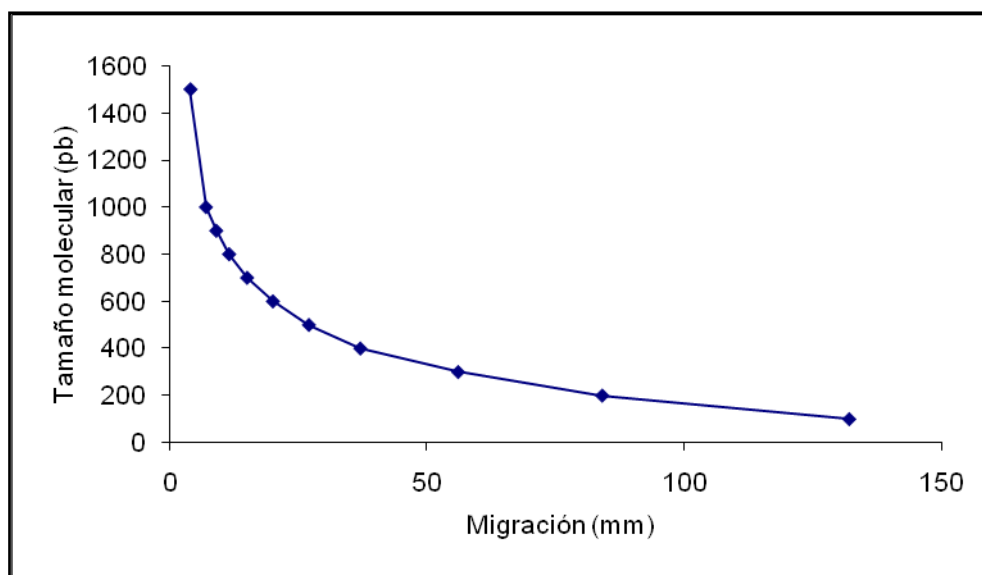


Figura 10. Migración vs. tamaño molecular del marcador molecular

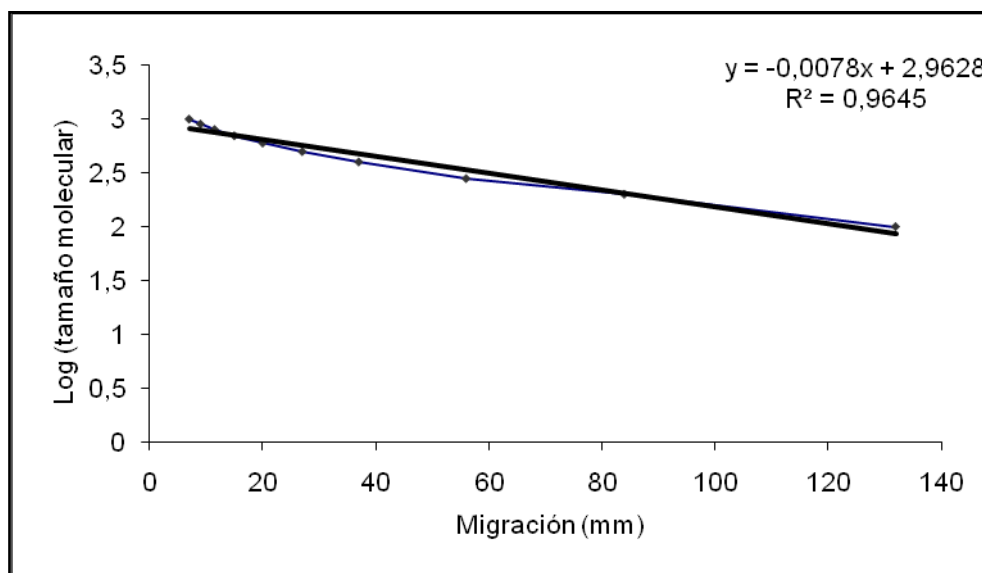


Figura 11. Linealización de los valores de migración vs. tamaño molecular del marcador molecular

5.3.8 Análisis de datos moleculares

Con los electroferogramas, conteniendo todos los fragmentos de amplificación se elaboraron matrices binarias de presencia/ausencia de secuencias ISTR (secuencias o loci) vs. Individuos analizados. Las matrices binarias se sometieron a un análisis de agrupamiento con el 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).

En el Anexo 1 se muestran algunos geles de acrilamida al 6% de muestras de *Agave victoriae-reginae*.

5.4 Perfiles fenólicos foliares

5.4.1 Preparación de los extractos fenólicos

Cada muestra se analizó de manera individual. La preparación de extractos se realizó de acuerdo a Campos (1997). Tres a cinco gramos de tejido foliar seco y molido se maceraron en 15 mL de una solución de metanol al 60%, en obscuridad, a temperatura ambiente, en agitación, durante 24 hrs. Los extractos se centrifugaron a 8500 rpm, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Se separaron los sobrenadantes y las pastillas fueron reextractadas por maceración en las mismas condiciones descritas, durante una hora. Los extractos se centrifugaron en las condiciones previamente descritas. Esos segundos sobrenadantes se combinaron con los correspondientes previamente obtenidos (sobrenadantes de una misma muestra fueron combinados). Cada extracto crudo se concentró a sequedad y se resuspendió en tres a cinco mililitros de metanol. De cada solución se tomaron alícuotas para analizarse por HPLC/DAD.

5.4.2 Análisis de HPLC/DAD

Para determinar los perfiles fenólicos por HPLC/DAD se siguió el método descrito por Campos (1997). Veinte microlitros de cada muestra individual se analizaron en un sistema de HPLC marca Perkin Elmer Series 200, con una columna Perkin Elmer Analytical C18 (4.6x250 mm, 5µm), con un método en gradiente de acetonitrilo-agua acidificada. Los cromatogramas se obtuvieron a 260 nm. Los datos espectrales para

todos los picos (compuestos) se detectaron en un intervalo de 200 a 400 nm, usando un detector de arreglo de diodos (Perkin Elmer Series 200). Las identificaciones estructurales de cada compuesto resuelto en el cromatograma se realizaron comparación directa de sus tiempos de retención (TR) y espectros UV con los correspondientes a estándares y de acuerdo a compilaciones de TR y formas espectrales compiladas por Mabry y col. (1970) y Campos y Markham (2007).

5.4.3 Análisis de datos químicos

El perfil fenólico de cada muestra fue determinado con todos los compuestos resueltos en su respectivo cromatograma HPLC/DAD. Cada compuesto se consideró un carácter químico individual. Se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia, formada por cada uno de los diferentes compuestos resueltos vs. cada uno de los individuos analizados. La matriz fue sometida a un análisis de agrupamiento por medio del programa de cómputo PAST versión 1.86b, con el algoritmo de “paired group” y el coeficiente de similitud de Jaccard.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Perfiles ISTR

6.1.1 Cantidad y calidad del ADN obtenido

Los registros de A_{260} y A_{280} , y las estimaciones de concentración y de pureza (A_{260}/A_{280}) de cada muestra de ADN de *Agave victoriae-reginae* se muestran en el Cuadro 4. Los resultados correspondientes a *Agave lechuguilla* se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 4. Valores de absorbancia a 260 nm, a 280 nm, de la relación de A_{260} y A_{280} , y de la concentración de ADN obtenido para *Agave victoriae-reginae*

Muestra	A_{260}	A_{280}	Concentración (ng/uL)	A_{260}/A_{280}
r1	0.055	0.040	343.75	1.375
r2	0.061	0.038	381.25	1.605
r3	0.037	0.020	231.25	1.850
r4	0.076	0.037	475.00	2.054
r5	0.043	0.023	268.75	1.869
r6	0.056	0.031	350.00	1.806
r7	0.125	0.087	781.25	1.436
r8	0.036	0.021	225.00	1.714
r9	0.049	0.032	306.25	1.531
r10	0.032	0.017	200.00	1.882
r11	0.031	0.018	193.75	1.722
r16	0.085	0.047	531.25	1.808
r17	0.039	0.029	243.75	1.344
r31	0.014	0.010	87.500	1.400
r32	0.014	0.010	87.500	1.400
r33	0.012	0.008	75.000	1.500
r34	0.045	0.034	281.25	1.323
r35	0.124	0.094	775.00	1.319
r37	0.036	0.027	225.00	1.333
r38	0.028	0.020	175.00	1.400
r39	0.036	0.025	225.00	1.440
r40	0.044	0.029	275.00	1.517
r41	0.036	0.028	225.00	1.285
r42	0.040	0.032	250.00	1.250
r43	0.076	0.043	475.00	1.767

r44	0.100	0.054	625.00	1.851
r45	0.055	0.032	343.75	1.718
r46	0.038	0.029	237.50	1.310
r47	0.031	0.023	193.75	1.348
r48	0.102	0.063	637.50	1.619
r49	0.042	0.027	262.50	1.556
r50	0.051	0.032	318.75	1.594
r51	0.055	0.031	343.75	1.774
r52	0.022	0.010	137.50	2.200
r53	0.075	0.043	468.75	1.744
r54	0.091	0.045	568.75	2.022
r55	0.075	0.042	468.75	1.786
r56	0.095	0.049	593.75	1.939
r57	0.051	0.024	318.75	2.125
r58	0.053	0.026	331.25	2.038
r59	0.070	0.044	437.50	1.591
r60	0.095	0.051	593.75	1.863
r62	0.110	0.059	687.50	1.864
r63	0.138	0.069	862.50	2.000
r64	0.146	0.086	912.50	1.698
r65	0.128	0.067	800.00	1.910
r66	0.129	0.063	806.25	2.048
r67	0.133	0.071	831.25	1.873
r68	0.040	0.024	250.00	1.667
r69	0.069	0.032	431.25	2.156

Cuadro 5. Valores de absorbancia a 260 nm, a 280 nm, de la relación de A_{260} y A_{280} , y de la concentración de ADN obtenido para *Agave lechuguilla*

Muestra	A_{260}	A_{280}	Concentración (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}
2000	0.069	0.039	431.25	1.769
2001	0.099	0.071	618.75	1.394
2002	0.051	0.029	318.75	1.759
2005	0.023	0.016	143.75	1.438
2007	0.038	0.019	237.50	2.000
2009	0.065	0.034	406.25	1.912
2010	0.036	0.021	225.00	1.714
2011	0.056	0.034	350.00	1.647
2013	0.043	0.034	268.75	1.265
2014	0.044	0.030	275.00	1.467
2015	0.063	0.049	393.75	1.286
2016	0.041	0.025	256.25	1.640
2017	0.058	0.033	362.50	1.758
2018	0.075	0.046	468.75	1.630
2019	0.088	0.043	550.00	2.047
2021	0.037	0.021	231.25	1.762
2022	0.044	0.029	275.00	1.517
2023	0.087	0.051	543.75	1.706
2024	0.028	0.018	175.00	1.556
2025	0.068	0.047	425.00	1.447
2026	0.040	0.023	250.00	1.739
2028	0.041	0.027	256.25	1.519
2029	0.049	0.029	306.25	1.690

Las concentraciones de ADN obtenidas por el método de extracción de Keb-Llanes y col. (2002), usado en este estudio, variaron entre 75 y 912 ng/ μ L (Cuadros 4 y 5). Esos valores de concentración son similares a los obtenidos por Torres-Morán (2008) para *Agave durangensis*, con el mismo método de extracción.

Los valores de los cociente A_{260}/A_{280} para las diferentes poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, que indican la proporción que existe de ADN con respecto a proteínas que se coextractan en el proceso de obtención del primero, se sitúan en el intervalo de 1.250 y 2.200. El 48% de los valores se ubicaron dentro de lo que indica la bibliografía, ≥ 1.7 , para muestras de ADN con una contaminación de proteínas lo

suficientemente bajo para no interferir con las técnicas moleculares de análisis de ADN (Sambrook y col., 1989). Para la población de *Agave lechuguilla*, el 44% de las muestras de ADN tuvieron valores indicativos de pureza que coincidieron con lo indicado por la bibliografía, y las muestras se ubicaron entre los valores de 1.265 y 2.047. Sin embargo, aunque un 48% de las muestras de ADN de todos los individuos analizados tuvieron valores del cociente A_{260}/A_{280} inferiores a lo reportado para soluciones de ADN con grado de contaminación aceptable de proteínas, la amplificación de los fragmentos ISTR, pudo lograrse y visualizarse en geles de acrilamida. Esto apoya lo reportado por Lightbourn y Veilleux (2003) acerca de que los marcadores ISTR no requieren ADN de pureza alta.

La apreciación del tamaño molecular y la integridad de cada muestra individual de ADN se realizaron por electroforesis en geles de agarosa (Figuras 12 y 13). La visualización de los geles mostró bandas de ADN con migración electroforética baja (bandas cercanas a los pocillos de depósito de las muestras), y barrido ("background") tenue. Esas condiciones sugieren que las muestras de ADN eran de alto peso molecular, ya que en electroforesis los fragmentos de bajo peso molecular presentan migraciones electroforéticas mayores a los fragmentos de alto peso molecular, y un bajo nivel de degradación, ya que se observó poca intensidad de bandas de diversos tamaños moleculares, apreciadas en barridos tenues (Towner, 2007).

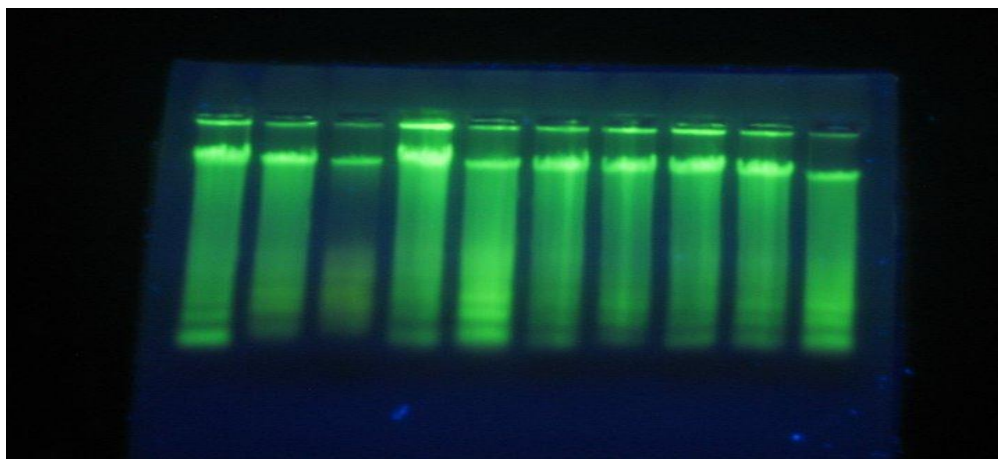


Figura 12. Gel de agarosa de muestras de ADN de *Agave victoriae-reginae*

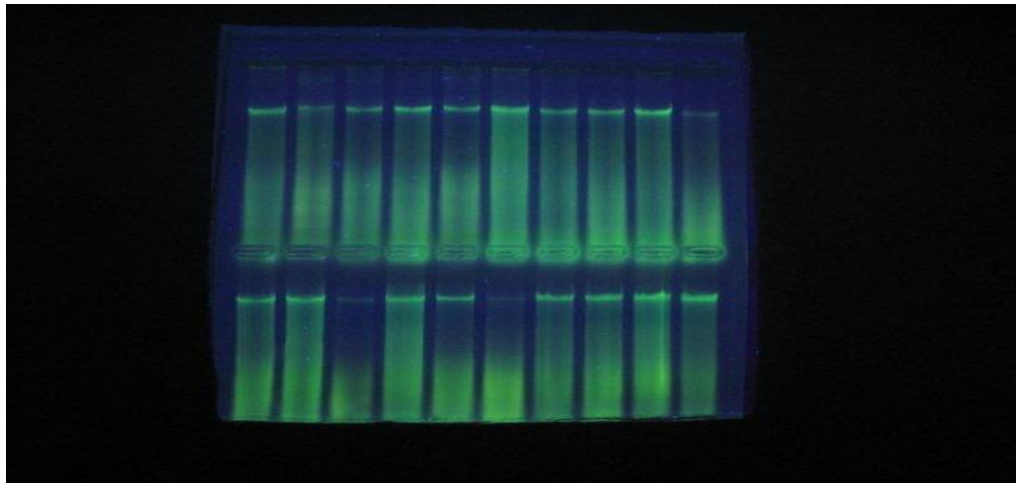


Figura 13. Gel de agarosa de muestras de ADN de *Agave lechuguilla*

6.1.2 Análisis de la variabilidad genética intra e interpoblacional de *Agave victoriae-reginae*

La combinación de iniciadores usada en este trabajo produjo un total de 23 secuencias ISTR amplificadas, de entre 804 y 153 pares de bases. Todas fueron polimórficas al 5%, es decir, que estuvo ausente en más del 5% de los individuos analizados (Cuadro 6).

[illegible]

Con base en la matriz binaria construida (Cuadro 6) y el dendrograma correspondiente obtenido de un análisis de cluster se calcularon los valores de polimorfismo para cada población y se determinó el número de perfiles diferentes ISTR por población. Esos valores dan una estimación de la variabilidad genética que puede estar presente en una población (Sosa, 2003; Hussain y col., 2008). Los valores se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Total de bandas polimórficas y no polimórficas de *A. victoriae-reginae* y *A. lechuguilla*

/Población	Total de Bandas	Bandas Polimórficas	Bandas no Polimórficas	Polimorfismo (%)	GI
Lerdo	14	12	2	85.71	0.8750
Bustamante	10	7	3	70.00	0.6667
Santa Catarina	10	10	0	100.0	0.8000
Ramos-Arizpe	5	0	5	0.000	0.0000
Mezquital	6	4	2	66.67	0.2000
Viesca	8	2	6	25.00	0.6667
Lerdo (<i>Agave lechuguilla</i>)	5	4	1	80.00	0.1429

GI: índice genotípico (número de perfiles únicos/total de perfiles)

Del Cuadro 7 se observa que los perfiles ISTR más complejos, dentro de las diferentes poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, fueron los correspondientes a la población de Lerdo, Durango, con un total de 14 secuencias diferentes, y los más sencillos fueron los de la población de Ramos-Arizpe, Coahuila, con 5. Los perfiles de la población de *Agave lechuguilla* tuvieron una complejidad igual a la de Ramos-Arizpe, con cinco secuencias ISTR. Estos resultados contrastan fuertemente con lo reportado por Demey y col. (2004), quienes detectaron de 94 a 111 secuencias ISTR para *Agave fourcroydes* y se acercan más a lo reportado por Torres y col. (2007) para *Agave tequilana* Weber var. azul, para quien esos autores mencionan 35 loci ISTR; a lo reportado por Alonso y col. (2008) para Coco (*Cocus nucifera*), 20 a 30 loci; y lo presentado por Vargas (2009) para *Agave durangensis* y *Agave asperrima*, especies para las que ese autor menciona 20 a 30 y 18 loci, respectivamente.

Variabilidad fue detectada en los perfiles individuales de todas las poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, excepto en la de Ramos-Arizpe, aunque se tendría que resaltar que únicamente dos individuos fueron analizados. Los perfiles por población mostraron valores variables de polimorfismo, desde 25% para la población de Viesca, Coahuila, la menos variable; hasta 100% para la población de Santa Catarina, Nuevo León, altamente variable. La población de *Agave lechuguilla* presentaron un polimorfismo genético, relativo a secuencias ISTR, de 80%.

Los niveles de variabilidad genética de las poblaciones pueden estar determinados por la capacidad de dispersión o migración de sus individuos, los mecanismos de reproducción y cruzamiento de la especie, la deriva génica, la selección natural (Francisco-Ortega y col., 1996; Silvertown y Charlesworth, 2001). Algunos autores consideran que los mecanismos de reproducción y cruzamiento son los más importantes para determinar la variabilidad genética de las poblaciones vegetales, presentando las de fecundación cruzada mayores niveles de variabilidad (Sosa, 2003; Silvertown y Charlesworth, 2001). Este factor podría explicar los niveles de polimorfismo genético encontrados para las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* analizadas, ya que es un grupo de polinización cruzada, y su dispersión de semillas se lleva a cabo por el viento (Eguiarte y col. 2006). El mismo factor podría explicar también el alto polimorfismo encontrado para la población de *Agave lechuguilla*, especie que presenta polinización cruzada (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003), como *Agave victoriae-reginae*.

La amplitud de la distribución geográfica de una especie es otro factor que determina el grado de variabilidad de sus poblaciones, mientras más grande la distribución mayor la variabilidad (Gitzendanner y Soltis, 2000, Sosa, 2003). Sin embargo, a pesar de la cercanía relativa entre las poblaciones de Santa Catarina, Bustamante, y Ramos-Arizpe, éstas presentan perfiles variables y grados altos de polimorfismo, y la población de Santa Catarina, incluso tiene un valor de polimorfismo mayor (100%) al estimado para *Agave lechuguilla* (80%), cuya distribución geográfica es mucho más amplia (desde el Valle de México hasta el sur de Texas y Nuevo Mexico, en Estados Unidos (Gentry, 1982) que la de *Agave victoriae-reginae*, por lo que los valores altos

de polimorfismo en las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* podrían deberse principalmente a un flujo génico entre los individuos de una población y de poblaciones diferentes. En otras especies de fecundación cruzada se ha demostrado que ese carácter influye en la determinación de niveles altos de variabilidad (Francisco-Ortega y col, 1996).

El alto polimorfismo genético relativo a secuencias ISTR estimado para la población de *Agave lechuguilla* analizada en este estudio concuerdan con la alta variabilidad genética reportada por Silva-Montellano y Eguiarte (2003) para esta especie, con marcadores bioquímicos (alozimas).

Los altos valores de polimorfismo en loci ISTR, que sugieren una alta variabilidad genética de las poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, encontrados en este estudio están de acuerdo con la alta variación genética reportada por Martínez-Palacios y col. (1999) con alocimas para 10 poblaciones de esa especie.

6.1.3 Capacidad discriminativa de los marcadores ISTR a nivel interpoblacional e interespecífico

Para evaluar la capacidad de los marcadores ISTR para discriminar entre poblaciones de *Agave victoriae-reginae* y entre esta especie y *Agave lechuguilla* (especie del mismo subgénero *Littaea*), la matriz binaria resultante se sometió a un análisis de agrupamiento (Figura 14).

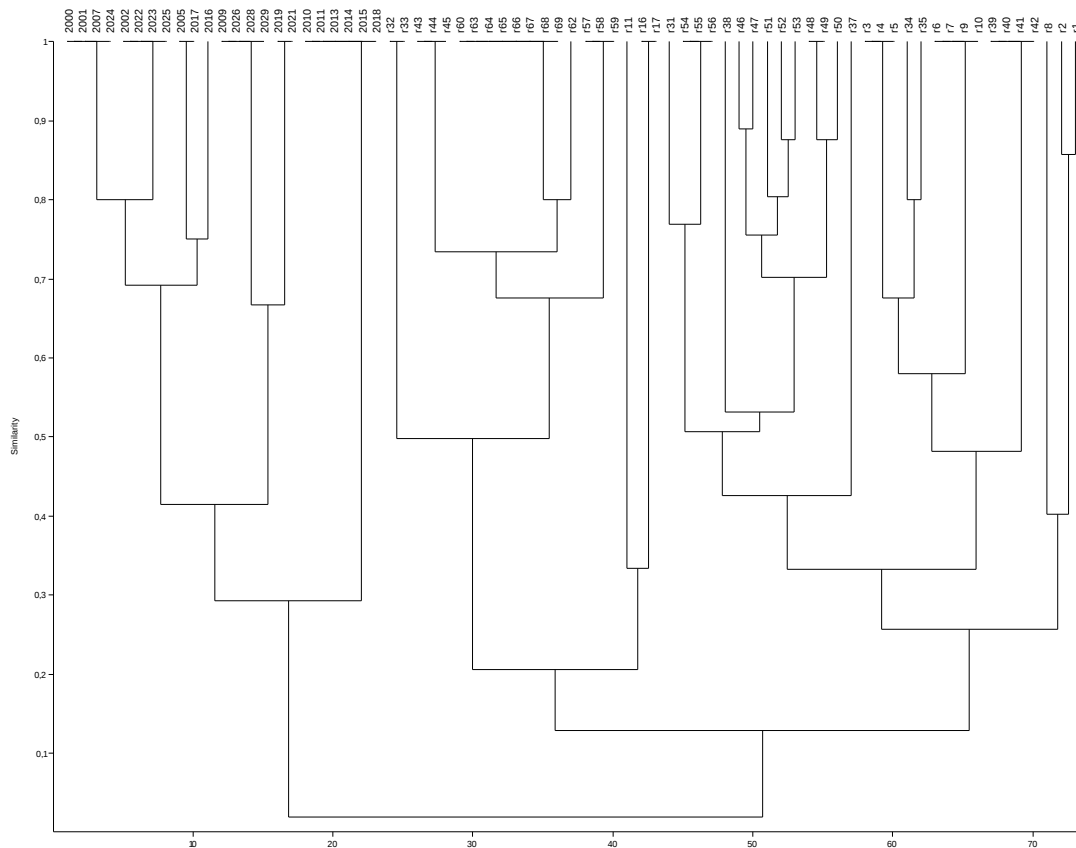


Figura 14. Dendrograma, basado en los perfiles ISTR, de *Agave victoriae-reginae* y *Agave lechuguilla*

El dendrograma obtenido separa, a un nivel aproximado de similitud de Jaccard de 0.025 (un valor de 1 indica igualdad), dos grupos, uno formado por todos los individuos de *Agave lechuguilla* y otro por los individuos de todas las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* (Figura 14). Una separación clara entre estas dos especies también fue encontrada por Silva-Montellano y Eguiarte (2003) con alozimas. Esta clara separación sugiere que los marcadores ISTR pueden ser una herramienta valiosa para discriminar y caracterizar especies de *Agave*, como ha sido sugerido Torres y col (2006), Infante y col. (2003) y Osorio y col. (2006). Dentro del segundo grupo, a un nivel de similitud de Jaccard de alrededor de 0.15, se distinguen dos subgrupos, el IIA, formado por todos los individuos de la población de Mezquital,

Durango, el individuo r11 de la población de Santa Catarina, Nuevo León, y los individuos r16 y r17 de la población de Ramos- Arizpe, Coahuila. El subgrupo IIB albergó a los individuos del resto de las poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. En este último subgrupo no se distingue una clara separación entre poblaciones. Los individuos r1 y r2 de la población de Lerdo, Durango se segregan, a un nivel aproximado de similitud de 0.35, en un sub-subgrupo individual, separado de los individuos r31, r54, r55 y r56, también de Lerdo; mientras que los individuos r46, r47, r52, y r53, también de Lerdo, forman, a un nivel aproximado de similitud mayor a 0.1, un sub-subgrupo con el individuo r51 de Viesca, Coahuila (Figura 14).

Las velocidades de variación de diferentes marcadores moleculares varían entre poblaciones debido a la acción diferencial de eventos de recombinación, de mutación y de presión selectiva (Sunnucks, 2000). Estos eventos podrían explicar la separación de la población de Mezquital, la cual además es la más alejada geográficamente, del resto de las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* analizadas. Diferencias poblacionales en la distribución de marcadores ISTR han sido encontradas también entre poblaciones de café (*Coffea arabica* L.) por Essayas (2005).

La presencia de individuos de una población y otra, de los elementos del subgrupo IIB sugiere la existencia de flujo génico entre esas poblaciones, o que no ha transcurrido tiempo suficiente para que diferentes loci ISTR se acumulen y fijen en los genomas de las diversas poblaciones de *Agave victoriae-reginae* para causar un grado tal de diversificación genómica que permita la discriminación entre ellas, como ha sido propuesto por algunos autores, que ocurre (Teo y col., 2005).

La no discriminación clara entre las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* estudiadas, exceptuando la de Mezquital, la cual forma un grupo claramente diferente del resto, observada en el dendrograma de la Figura 6, no concuerda con los resultados de Martínez-Palacios y col. (1999), basados en estimaciones de diferenciación entre poblaciones considerando perfiles de alozimas, donde se separan tres grupos de poblaciones (centro, este y oeste) con un nivel de

diferenciación similar al que se encuentra entre especies o subespecies en otros grupos. De acuerdo a los resultados del análisis molecular de este trabajo, únicamente la población de Mezquital representaría una entidad taxonómica diferente.

Los resultados de este trabajo están de acuerdo con lo establecido recientemente, con base en caracteres morfológicos, por González-Elizondo y col. (en rev.) acerca de considerar a la población de *Agave victoriae-reginae* de Mezquital como una especie diferente, a la que esos mismos autores llaman *Agave pintilla*. González-Elizondo y col. (2010) consideran además a *Agave victoriae-reginae* como un complejo que incluye tres especies y dos subespecies, sin embargo, con base en los perfiles ISTR obtenidos en este estudio, no existe, con excepción de la población de Mezquital, una correlación clara entre los grupos que se forman en el dendrograma de la Figura 14 y los taxa propuestos por esos autores.

6.2 Perfiles fenólicos

Un total de 100 compuestos fueron detectados para todas las muestras de tejido foliar de *Agave victoriae-reginae* (50), *Agave lechuguilla* (32), y *Agave striata* (25) por medio del análisis de HPLC/DAD. Los compuestos fenólicos resueltos en los cromatogramas, identificados por su TR (Cuadro 8) y espectro UV (Anexo 2) fueron 38 flavonoides y 52 ácidos fenólicos. 36 compuestos no pudieron ser identificados. Dentro de los flavonoides, 17 fueron flavonoles, y 21 fueron flavonas.

Cuadro 8. Relación de todos los compuestos fenólicos resueltos, sus tiempos de retención, e identificación química.

Compuesto	Nombre	TR (min) X±DE
1	Derivado de ácido benzoico	19.006±0.258
2	Derivado de ácido fenólico	23.104±0.118
3	No identificado	23.027±0.110
4	Derivado de ácido cinámico	25.010±0.000
5	No identificado	27.313±0.186
6	No identificado	27.181±0.103
7	Derivado glucósido de quercetina	27.024±0.495
8	No identificado	25.181±0.106
9	No identificado	26.305±0.104
10	Derivado glucósido de quercetina	28.045±0.320
11	Flavonol	28.868±0.132
12	No identificado	29.642±0.044
13	Derivado de ácido benzoico	29.513±0.044
14	No identificado	30.012±0.000
15	No identificado	31.478±0.000
16	Derivado de ácido benzoico	30.290±0.000
17	Derivado glicósido de quercetina	30.660±0.195
18	No identificado	30.794±0.313
19	No identificado	30.646±0.088
20	Derivado de ácido fenólico	31.229±0.000
21	Derivado de luteolina	31.637±0.105
22	No identificado	31.356±0.054
23	Flavonol	31.322±0.196
24	Flavonol glicósido	31.479±0.162
25	Derivado de ácido benzoico	31.655±0.015
26	Derivado de luteolina	32.278±0.052
27	No identificado	32.410±0.037
28	Derivado de ácido fenólico	32.123±0.101
29	No identificado	32.388±0.000
30	Dihidroflavonoide	33.781±0.000
31	Flavona glicósido	33.928±0.000
32	Flavonol	34.035±0.070
33	Flavona	34.001±0.000
34	Flavona	34.297±0.371
35	Derivado glucósido de miricetina	34.771±0.081
36	Derivado glicósido de quercetina	34.822±0.000
37	No identificado	34.666±0.270
38	Derivado glicósido de canferol	35.467±0.278

39	Flavona	35.189±0.000
40	Flavona	35.774±0.000
41	No identificado	35.901±0.256
42	No identificado	36.174±0.046
43	Derivado glicósido de luteolina	36.238±0.066
44	No identificado	36.500±0.000
45	Derivado glicósido de canferol	36.670±0.000
46	Derivado glicósido de quercetina	37.206±0.140
47	No identificado	37.398±0.078
48	Derivado de ácido benzoico	37.565±0.000
49	No identificado	37.829±0.000
50	Ácido hidroxibenzoico	38.269±0.000
51	Dihidroflavonoide	38.172±0.396
52	No identificado	39.340±0.000
53	No identificado	38.907±0.257
54	Derivado glicósido de quercetina	39.164±0.000
55	No identificado	39.700±0.000
56	Derivado glicósido de quercetina	39.180±0.320
57	Flavona	40.264±0.074
58	Ácido fenólico	40.875±0.132
59	Derivado glucósido de quercetina	40.772±0.475
60	No identificado	41.085±0.000
61	Ácido fenólico	42.566±0.000
62	Ácido fenólico	42.530±0.037
63	Flavanona	42.618±0.052
64	No identificado	42.936±0.045
65	Miricetina-3-O-galactósido	42.923±0.005
66	Isoramnetina-3-O-[ramno(1-6)glucósido]	42.641±0.282
67	No identificado	43.271±0.191
68	Derivado de ácido cinámico	43.455±0.238
69	Ácido fenólico	44.811±0.059
70	No identificado	44.784±0.113
71	Derivado de ácido benzoico	45.076±0.156
72	Derivado glicósido de canferol	45.368±0.000
73	Ácido fenólico	45.764±0.000
74	Derivado glicósido de quercetina	46.036±0.000
75	No identificado	46.350±0.000
76	Dihidroflavonoide	47.758±0.000
77	Dihidroflavonoide	48.491±0.206
78	Derivado de ácido cinámico	47.298±0.000
79	Eriodictiol	49.158±0.485
80	Derivado de ácido cinámico	49.738±0.000

81	Flavanona	49.269±0.235
82	No identificado	50.325±0.000
83	Ácido fenólico	50.903±0.146
84	Derivado glicósido de canferol	51.440±0.000
85	Flavonol glicósido	52.173±0.059
86	No identificado	52.892±0.000
87	No identificado	54.124±0.000
88	Dihidroflavonoide	52.794±0.100
89	Dihidroflavonoide	53.009±0.000
90	Flavonol glicósido	52.444±0.370
91	Ácido fenólico	53.977±0.000
92	Dihidroflavonoide	54.160±0.000
93	Dihidroflavonoide	53.974±0.465
94	Dihidroflavonoide	54.916±0.220
95	Dihidroflavonoide	56.338±0.000
96	Derivado de ácido fenólico	56.118±0.000
97	Dihidroflavonoide	58.069±0.208
98	No identificado	58.870±0.128
99	Dihidroflavonoide	60.602±0.111
100	Dihidroflavonoide	62.499±0.046

TR: tiempo de retención (los valores representan la media y la desviación estándar del número de veces que cada compuesto fue detectado)

Los compuestos encontrados para cada muestra conformaron el perfil individual. En el Cuadro 9 se presenta la matriz binaria (presencia/ausencia) de los compuestos fenólicos de cada uno de los individuos de las tres especies de *Agave* analizadas en este estudio.

En los cromatogramas de los tejidos foliares de las poblaciones asumidas con base morfológica como *Agave victoriae-reginae* hubo una dominancia de los ácidos fenólicos sobre los flavonoides. Los perfiles de los individuos de la población de *Agave victoriae-reginae* de Lerdo, Durango, revelaron la presencia de siete derivados de ácidos fenólicos, siete flavonoides, particularmente flavonas, y cinco compuestos que no fueron identificados. Los individuos de la población de Mezquital, presentaron ocho derivados de ácidos fenólicos, tres flavonas, cuatro derivados glicósidos de quercetina, dos derivados de miricetina y diez compuestos no identificados.

Los individuos de la población de Viesca, Coahuila, presentaron tres ácidos fenólicos, un derivado de miricetina, cuatro dihidroflavonoide, dos flavanonas y un compuesto no identificado. En la población de Ramos-Arizpe, Coahuila los compuestos derivados de ácido benzóico (dos) y ácido cinámico (dos) estuvieron presentes en todos los individuos; seis ácidos fenólicos también fueron encontrados, siete flavonoides y dos compuesto no identificado. En la población de Arteaga, Coahuila, se presentaron cuatro flavonas, siete flavonoides, ocho ácidos fenólicos, dos derivados glicósidos de canferol, dos derivados glicósidos de quercetina, un derivado glicósido de luteolina, un derivado glicósido de canferol y tres compuestos no identificados.

Todos los individuos de *Agave victoriae-reginae* de Mina, Nuevo León presentaron dos derivados glicósidos de quercetina, cuatro flavonoides, tres derivados de ácido cinámico, cuatro ácidos fenólicos, dos derivados glicósidos de luteolina, dos derivados glicósidos de canferol y dos compuestos no identificados. En la población de Santa Catarina, Nuevo León, un derivado de ácido benzóico estuvo presente en todos los individuos; nueve ácidos fenólicos, dos derivados glicósidos de canferol, dos derivados glicósidos de quercetina, nueve flavonoides, dos derivados glicósidos de luteolina, dos derivados de ácido cinámico, dos derivados glicósidos de miricetina y ocho compuestos no identificados; mientras que en la población de Bustamante, Nuevo León, se detectaron tres derivados glicósidos de canferol, dos derivados glicósidos de quercetina, 18 flavonoides, siete ácidos fenólicos, dos derivados glicósidos de luteolina, dos derivados glicósidos de miricetina, cinco compuestos no identificados.

Perfiles fenólicos foliares muy diferentes fueron encontrados para *Agave lechuguilla* y *Agave striata*, en los que una codominancia de ácidos fenólicos y flavonoides pudo ser detectada (Cuadro 9). 11 flavonoles y siete ácidos fenólicos estuvieron presentes en *Agave lechuguilla*, y siete flavonoles y cuatro ácidos fenólicos en *Agave striata*.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que existe una riqueza importante de compuestos fenólicos en los tejidos foliares de las especies de *Agave*

analizadas y contrastan con algunos de los pocos reportes previos sobre la presencia de esos compuestos en otras especies de *Agave*, como el de Parmar y col. (1992), quienes reportaron la composición fenólica de tejidos somáticos de *Agave americana*, haciendo referencia a una flavanona, de estructura química muy compleja; y el de Tinto y col. (2005), quienes reportaron, para esa misma especie, tres flavonoides, igualmente de estructura química compleja. La información proporcionada por Chen y col. (2009) hace referencia también a un número relativamente pequeño, de 10, tres flavonas y siete isoflavonas, para *Agave sisalana*. La riqueza de compuestos fenólicos foliares de *Agave asperrima* fue reportada también como baja, con tres derivados glicósidos de canferol (Almaraz-Abarca y col., 2009).

La riqueza de compuestos fenólicos foliares encontrada en este trabajo para las tres especies de *Agave* estudiadas, concuerda con la riqueza reportada para *Agave durangensis*, de 23, por Almaraz-Abarca y col. (2009), de los cuales 20 fueron derivados glicósidos de canferol. Sin embargo, en términos cualitativos, la composición de esa especie y la de cada una de las tres especies analizadas en el presente estudio son diferentes, lo que sugiere que los perfiles fenólicos foliares de las especies de *Agave* pueden tener valor taxonómico como marcadores específicos, como ha sido sugerido para otros grupos de plantas (Van Heerden y col., 2003; Almaraz-Abarca y col., 2006).

La matriz binaria formada por los 100 compuestos fenólicos resueltos y cada uno de los individuos analizados (Cuadro 9) se sometió a un análisis de cluster. El dendrograma resultante se presenta en la Figura 15.

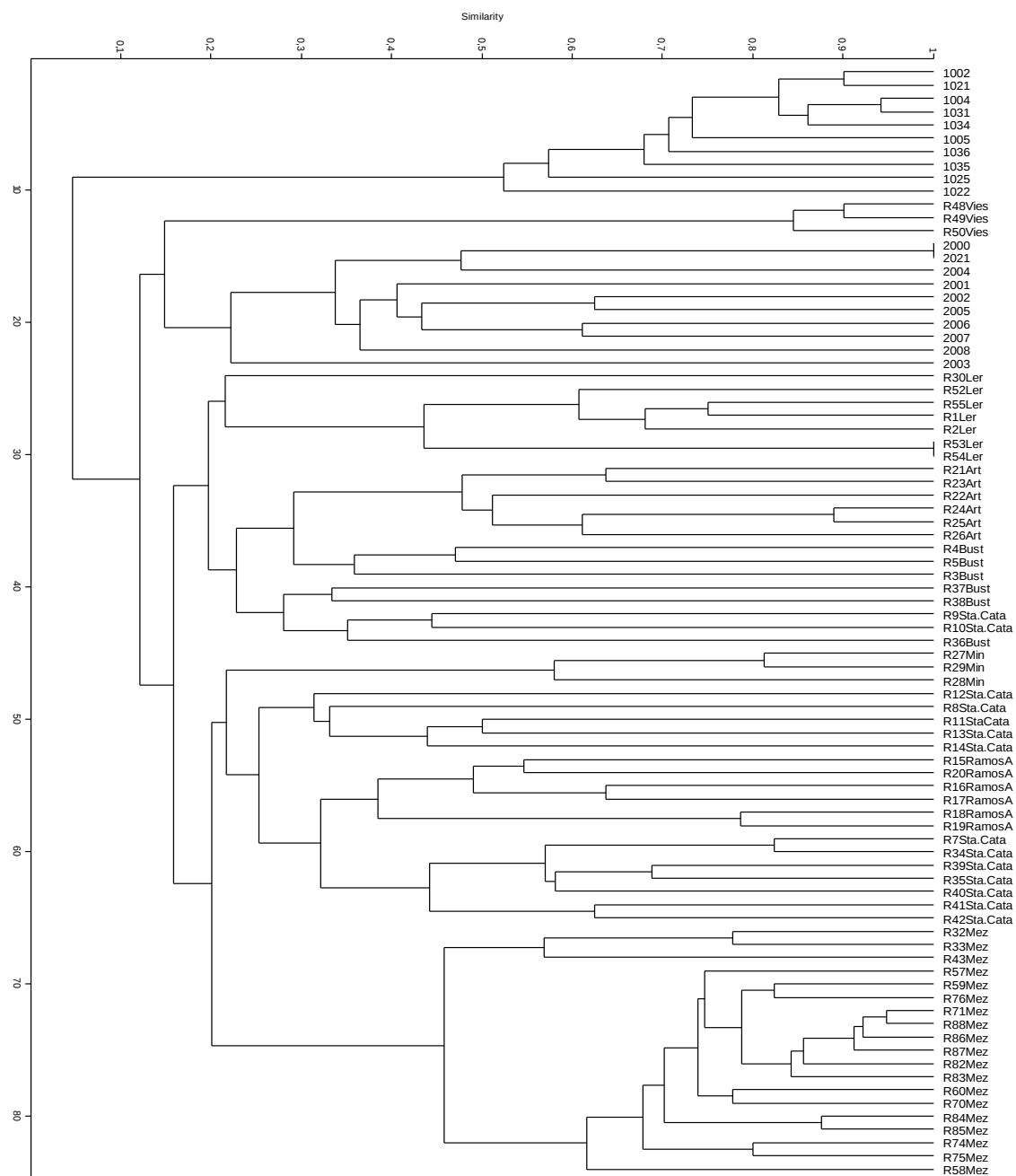


Figura 15. Dendrograma, basado en los perfiles fenológicos, de *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla* y *Agave striata*

El dendrograma obtenido separa de manera evidente, a un nivel aproximado de similitud de Jaccard de 0.03, un grupo formado por todos los individuos de *Agave striata* (serie 1000) y otro por los individuos de todas las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* (serie R) y *Agave lechuguilla* (serie 2000) (Figura 15). En otro nivel con similitud, alrededor de 0.13, se encuentran divididas estas dos últimas especies. Esta clara separación sugiere que los perfiles fenólicos pueden ser una herramienta valiosa para discriminar y caracterizar especies de *Agave*. Dentro del segundo grupo, se distinguen dos subgrupos, el IIA, formado por todos los individuos de *Agave lechuguilla* y tres individuos de la población de Viesca, Coahuila. El subgrupo IIB albergó a los individuos del resto de las poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. En este último subgrupo, la población de Mezquital, Durango se separa de las otras siete poblaciones de esa especie.

En la misma Figura 15 se puede apreciar que solo dos individuos de *Agave lechuguilla* (2000 y 2021) y dos individuos de *Agave victoriae-reginae* pertenecientes a Lerdo, Durango (R53 y R54) tuvieron perfiles correspondientes iguales, presentando un índice de Jaccard de 1.

En los trabajos de Chávez-Ávila (1996) y Martínez-Palacios y col. (1999), se menciona que *Agave victoriae-reginae* presenta un alto nivel de diferenciación entre las poblaciones, donde cada población parece representar una unidad evolutiva independiente. Los resultados obtenidos de los perfiles fenólicos foliares permiten distinguir como grupos individuales a las poblaciones Lerdo, Arteaga, y Ramos Arizpe. Algunos individuos de la población de Bustamante se agrupan con individuos de las poblaciones de Arteaga y Santa Catarina. Con individuos de esta última, se agrupan también algunos de la población de Mina. Los resultados de la composición fenólica foliar de las diferentes poblaciones de *Agave victoriae-reginae* encontrados en el presente estudio están de acuerdo con la posición de González-Elizondo y col. (2010) de considerar a la población de Mezquital, Durango como una especie diferente.

7. CONCLUSIONES

- Los perfiles de amplificación ISTR pueden considerarse como marcadores moleculares para la caracterización específica del género *Agave*.
- Los marcadores ISTR fueron polimórficos dentro de cada población de *Agave victoriae-reginae* y en la de *Agave lechuguilla*.
- El polimorfismo de las ocho poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, basado en marcadores ISTR, fue variable y sin aparente relación geográfica.
- Los perfiles ISTR apoyan la propuesta de considerar a la población de *Agave victoriae-reginae* de Mezquital como una especie independiente.
- El tejido foliar de las especies y poblaciones de *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla* y *Agave striata* son ricos en compuestos fenólicos, predominando los ácidos fenólicos en *Agave victoriae-reginae*, y codominando los flavonoles y los ácidos fenólicos en *Agave lechuguilla* y *Agave striata*.
- Los derivados glicósidos de quercetina y de canferol son los flavonoles principales encontrados en los tejidos foliares de *Agave lechuguilla* y *Agave striata*.
- A pesar de la variabilidad existente entre los perfiles fenólicos foliares individuales, estos permiten discriminar entre las tres especies de *Agave* analizadas.
- Los perfiles fenólicos foliares apoyan la propuesta de considerar a *Agave victoriae-reginae* de la población de Mezquital, como una especie independiente.
- Ha existido un intercambio o flujo génico entre las poblaciones analizadas de *Agave victoriae-reginae* localizadas dentro del Desierto Chihuahuense, que ha permitido que individuos de cada una de ellas expresen perfiles fenólicos tales que el análisis de cluster no discrimina claramente entre ellas.

- Los perfiles fenólicos foliares pueden ser una herramienta importante para la caracterización a nivel específico dentro del género *Agave*.

8. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

Este trabajo generó información sobre la distribución de marcadores moleculares y químicos de *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla* y *Agave striata* que pueden servir de base para estudios poblacionales de esas especies, necesarios para establecer medidas para su conservación.

Los resultados obtenidos de este estudio sugieren que los marcadores moleculares utilizados son una herramienta que permite discriminar entre las especies de *Agave* analizadas. Sería de interés utilizarlos en otras especies del mismo género para evaluar su importancia como marcadores específicos. Así mismo, la evaluación de otros marcadores moleculares, como RAPDs y microsatélites podrían emplearse para corroborar los resultados del presente estudio

La riqueza de compuestos fenólicos encontrada en los tejidos foliares de *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla* y *Agave striata* podría fundamentar el realizar estudios fitoquímicos más complejos para determinar las estructuras específicas y posibles actividades biológicas de esos metabolitos secundarios.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aggarwal, R.K., S.D. Brar, S. Nandi, N. Huang, S.G. Khush. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics* 98: 1320-1328.

Almaraz-Abarca, N., J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez, L.S. González-Valdéz, R. González-Laredo. 1998. The feeding deterrent effect of a flavonol and a flavanone on the mexican vean beetle (*Epilachnia varivestis mulsant*). *Ubamari. Revista Hispanoamericana de Ciencia y Tecnología* 44: 33-42.

Almaraz-Abarca, N., M.G. Campos, J.A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, L.S. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29: 574-578.

Almaraz-Abarca, N., M.S. González-Elizondo, J.A. Tena-Flores, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, N. Naranjo-Jiménez. 2006. Foliar flavonoids distinguish *Pinus leiophylla* and *Pinus chihuahuana* (*Coniferales*: Pinaceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington* 119: 426-436.

Almaraz-Abarca, N., M.G. Campos, E.A. Delgado-Alvarado, J.A. Ávila-Reyes, J. Herrera-Corral, L.S. González-Valdez, N. Naranjo-Jiménez, C. Frigerio, A.F. Tomatas, A.J. Almeida, A. Vieira, J.N. Uribe-Soto. 2008. Pollen flavonoid/phenolic acid composition of four species of Cactaceae and its taxonomic significance. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 534-543.

Almaraz-Abarca, N., E.A. Delgado-Alvarado, V. Hernández-Vargas, M. Ortega-Chávez, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, J.A. Ávila-Reyes, R. Muñiz-Martínez. 2009. Profiling of Phenolic compounds of somatic and reproductive tissue of *Agave durangensis* Gentry (Agavaceae). *American Journal of Applied Sciences* 6: 1076-1085.

Alonso, M., J. Cueto, Y. Santos, R. Llauger, M. Rodriguez, R. Wolfgang. 2008. Estimación de la variabilidad genética entre ecotipos de cocoteros presentes en Cuba por ISTR. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10: 6-13.

Andrews, A. 1991. Electrophoresis of nucleic acids. En: *Essential Molecular Biology. A Practical Approach*. (Ed. Brown, T. A.). IRL Press. Oxford, pp: 89-126.

Bachmann, K. 1992. Nuclear DNA markers in Angiosperm taxonomy. *Acta Botánica Neerlandica* 41: 369-384.

Bankier, A.T. 1996. Electrophoresis of sequence reaction samples. En: *Methods in Molecular Biology* (Ed. Harwood, A. J.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp: 393-402.

Bañares, A. 1994. Recuperación de la flora amenazada de los parques nacionales canarios. Metodología para su planificación y ejecución. *Ecología* 8: 227-244.

Barraza, M.A, T.F.L. Sánchez, M. Robert, M. Esqueda, A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Fitotecnia Mexicana* 29: 1-8.

Barret, S.C.H., J. Khon. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. En: *Genetic and Conservation of Rare Plants* (Eds. Falk, D. A., K. E. Holsinger). Oxford University Press, pp: 3-30.

Barrett, B.A., K.K. Kidwell, P.N. Fox. 1998. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Science* 38: 1271-1278.

Bate-Smith, E.C. 1975. Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry* 14: 1107-1113.

Batista, H.F., P.A Sosa. 2002. Allozyme diversity in natural populations of *Viola palmensis* Webb and Berth: (Violaceae) from La Palma (Canary Islands): Implications for conservations genetics. *Annals of Botany* 90: 725-733.

Bennetzen, J.L. 2000. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 251-269.

Bennetzen, J.L. 2002. Opening the door to comparative plant biology. *Science* 296: 60-63.

Blunden, D.J., Y. Yi, K. Jewers. 1978. Steroidals sapogenins from leaves of Agavaceae species. *Phytochemistry* 17: 1923-1925.

Bogler D.J., B.B. Simpson. 1995. A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Systematic Botany* 20: 191-205.

Bohm, B.A. 1994. The minor flavonoids. En: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* (Ed. Harborne, J.B.). Chapman and Hall, London, pp: 387-440.

Bousios, A., I. Saldana-Oyarzabal, A.G. Valenzuela-Zapata, C. Wood, S.R. Pearce. 2007. Isolation and characterization of Ty1-*copia* retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science* 172: 291-298.

Burger, J., G.E. Edward. 1996. Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf coleus varieties. *Plant and Cell Physiology* 37: 395-399.

Caicedo, A.L., E. Gaitan, M.C. Duque, O.T. Chica, D.G. Debouck, J. Tohme. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39: 1497-1507.

Campos, M.G. 1997. Caracterização do pólen apícola pelo seu perfil em compostos fenólicos e pesquisa de algumas actividades biológicas. Dissertação de candidatura ao grado de Doutor. Universidade de Coimbra. Portugal.

Campos, M.G., K.R. Markham. 2007. Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: Flavones, Flavonols and Phenolic acids. Coimbra University Press. Portugal.

Chávez-Ávila, V.M. 1996. Evaluación genética y demográfica de *agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto B147.

Cházaro, B.M.J., P.O.M. Valencia, R.M.P. Hernández. 2007. Agaves silvestres usados en la elaboración de bebidas alcohólicas. En: *Agaves del Occidente de México* (Eds. Vázquez-García, J.A., Y.L. Vargas-Rodríguez, S.M. Saldívar). Universidad de Guadalajara, Consejo Regulador del Tequila, CIATEJ, LSU, CONAFOR, México, pp: 123-126.

Chen, P. Y., Y.C. Kuo, C.H. Chen, Y.H. Kuo, C.K. Lee. 2009. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* perrine ex engelm. *Molecules* 14: 1789-1795.

Colby, C. 1996. Introduction to evolutionary biology. Version 2. Online: <http://www.talkorigins.org/faqs/faq-intro-to-biology.html>. (Consultada: 31/03/2010).

Dahlgren, R.M., H.T. Clifford, P.F. Yeo. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin, pp: 520.

Del Pero, M.M.A., J.P. Pelotto, N. Basualdo. 1997. Distribution of flavonoid aglycones in *Ilex* species (Aquifoliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 619-622.

Demey, J., E. Gámez, S. Molina, D. Infante. 2004. Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology* 22: 29-35.

Dewick, P.M. 1994. Isoflavonoids. En: *The Flavonoids: Advances in Research since 1986* (Ed. Harborne, J.B.). Chapman and Hall, London, pp: 117-238.

Dudash, M.R., C.B. Fenster. 2000. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. En: Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations (Eds. Young, E. G., G. M. Clarke). Cambridge University Press, pp: 35-54.

Eguiarte, L.E., M.R. Duvall, G.H. Learn, M.T. Clegg. 1994. The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the Monocotyledons: An analysis base on the *rbcL* gene sequence. Boletín de la Sociedad Botánica de México 54: 35-56.

Eguiarte, L.E., X. Aguirre, M. Rocha, C. Torres, A. Silva, A. Valera. 2003. Diversidad genética de dos especies mezcaleras. Proyecto CONABIO VO38. Informe final.

Eguiarte, L.E., A.G. González, E. Sheinvar. 2006. Genética de poblaciones en viveros de *A. cupreata* e impactos de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie. Informe final. Proyecto CONABIO CS016, pp: 1-24.

Eguiarte, L.E., V. Souza. 2007. Historia natural del *agave* y sus parientes: evolución y ecología. En: En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros *agaves* (Eds. Colunga-García, M.P., A. Larque, L.E. Eguiarte, D. Zizumbo-Villarreal) CICY, CONACYT, CONABIO, SEMANART, INE. Merida, Yucatán, pp: 3-21.

Elliger, C.A., B.G. Chan, A.C. Waiss, R.E. Lundin, W.F. Haddon. 1980. CGlycosylflavones from *Zea mays* that inhibit insect development. Phytochemistry 19: 293-297.

Ervin, G.N., R.G. Wetzel. 2002. Effects of sodium hypochlorite sterilization and dry cold storage on germination of *Juncus effuses* L. Wetlands 22: 191-195.

Feschotte, C., N. Jiang, S.R. Wessler. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Genetics 3: 329-341.

Finnegan, D.J. 1992. Transposable elements. *Current Opinion in Genetics and Development* 2: 861-867.

Flavell, A.J., M.R. Knox, S.R. Pearce, T.H.N. Ellis. 1998. Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *The Plant Journal* 16: 643-650.

Foo, L.Y., Y. Lu, W.C. McNabb, G. Waghom, M.J. Ulyatt. 1997. Proanthocyanidins from *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry* 45: 1689-1696.

Ford, R., E.C.K. Pang, P.W.J. Taylor. 1999. Genetics of resistance to *Ascochyta blight* (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 93-98.

Francisco-Ortega, J., D. Crawford, A. Santos-Guerra, J. Carvalho. 1996. Isozyme differentiation in the endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in the Macaronesian Islands. *Plant Systematics and Evolution* 2002: 137-152.

Frankel, O.H., A.H.D. Brown, J.J. Burdon. 1995. *The Conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press. United Kingdom.

Fukai, T., B.S. Cai, T. Horikoshi, T. Nomura. 1996. Isoprenylated flavonoids from underground parts of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry* 43: 1119-1124.

Gabriel, D.W., R. De Feyter. 1992. RFLP analyses and gene tagging for bacterial identification and taxonomy. En: *Molecular Plant Pathology. A Practical Approach* (Eds. Gurr, S.J., M.J. McPherson, D.J. Bowles). IRL Press. Oxford, pp: 51-66.

García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México. En: *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques* (Eds. Linares, E., P. Dávila, F. Chiang, R. Bye, T. Elias). UNAM, México, pp: 51-75.

García-Mendoza, A., V.R. Galván. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24.

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

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

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

Gitzendanner, M.A., P.S. Soltis. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.

González-Elizondo, M., R. Galván-Villanueva, I.L. López-Enriquez, L. Reséndiz-Rojas, M.S. González-Elizondo. 2009. Agaves-magueyes, lechuguillas y noas- del Estado de Durango y sus alrededores. IPN, CONABIO, COCYTED. México.

González-Elizondo, M.S., M. González-Elizondo, I.L. López-Enriquez, L. Reséndiz-Rojas, J.A. Tena-Flores. 2010 (En revisión). Evaluación del estado de conservación del maguey noa (*Agave victoriae-reginae*, Agavaceae) para su revisión en el apéndice II de la CITES. Informe Técnico Final. Proyecto HS001.

González, G., S. Alemán, D. Infante. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science* 165: 595-601.

Good-Avila, V.S., V. Souza, S.B. Gaut, E.L. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 103: 9124-9129.

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

Granados-Sánchez, D. 1999. Los agaves de México. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Grayer, R.J., G.C. Kite, F.J. Goldstone, S.E. Bryan, A. Paton, E. Putievsky. 1996. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweetbasil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 43: 1033-1039.

Hadacek, F. 2002. Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Science* 21: 273-322.

Harborne, W., L. Tuner. 1984. *Plant chemosystematics*. Academic Press. London.

Harborne, J.B. 1989. General procedures and measurement of total phenolics. En: *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics* (Eds. Dey, P. M.; J. B. Harborne). Academic Press, London, pp: 1-28.

Harborne, J.B. 1993. *Introduction to ecological biochemistry*, Academic Press, London.

Havecker, E.R., X. Gao, D.F. Voytas. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology* 5: 225.2-2.225.6.

Heller, W., G. Forkmann. 1994. Biosynthesis of flavonoids. En: *The Flavonoids. Advances in Research since 1986* (Ed. Harborne, J.B.). Chapman & Hall, London, pp: 499-536.

Hernández, A.E. 2006. Elementos genéticos móviles implicados en la evolución del cromosoma “y” con base en estudios moleculares de insectos (*Drosophila*) y de primates. *Salud Uninorte* 22: 154-167.

Hussain, Z., R.K. Tyagi, R. Sharma, A. Agrawal. 2008. Genetic diversity in *in vitro*-conserved germplasm of *Curcuma* L. as revealed by RAPD markers. *Biologia Plantarum* 52: 627-633.

Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverría, M. Keb-Llanes. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164: 223-230.

Jay, M. 1994. C-Glycosylfavonoids. En: The Flavonoids. Advances in Research since 1986 (Ed. Harborne, J.B.). Chapman & Hall, London, pp: 57-93.

Jofuku, K., R. Goldberg. 1988. Analysis of plant gene structure. En: Plant Molecular Biology. A Practical Approach (Ed. Show, C. H.). IRL Press. Oxford, pp: 37-66.

Kalendar, R., C.M. Vicent, O. Peleg, K. Ananthawat-Jonsson, A. Bolshoy, A.H. Schulman. 2004. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but non autonomous retroelements of barley and related genomes. Genetics 166: 1437-1450.

Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero, D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. Plant Molecular Biology Reporter 20: 299a-299e.

Kelly, J.D., P.N. Miklas. 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. Molecular Breeding 4: 1-11.

Kentner, E., L. Michael, A. Wessler, S. Wessler. 2003. Characterization of High-Copy-Number retrotransposons from the large genomes of the Louisiana iris species and their use as molecular markers. Genetics 164: 685-697.

Kutchan, T.M. 2001. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. Plant Physiology 125: 58-60.

Labra, M., S. Imazio, F. Grassi, M. Rossoni, F. Sala. 2004. Vine-1 retrotransposon-based-sequence-specific amplified polymorphism for *Vitis vinífera* L. phenotyping. Plant Breeding 123: 180-185.

Lightbourn, G., R. Veilleux. 2003. Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. Acta Horticulturae 619: 235-242.

Lynch, M., J. Conery, R. Bürger. 1995. Mutation accumulation and extinction of small populations. American Naturalist 146: 489-518.

Mabry, T.J., K.R. Markham, M.B. Thomas. 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York.

Mallik, H.S., S. Henikoff, T.H. Elickbush. 2000. Poised for contagion: evolutionary origins of the infectious abilities of invertebrate retroviruses. *Genome Research* 10: 1307-1318.

Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, pp: 1-113.

Marsan, P.A., P. Castiglioni, F. Fusari, M. Kuiper, M. Motto. 1998. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 219-227.

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

McAllister, B.F., B. Charlesworth. 1999. Reduced sequence variability on the Neo-Y chromosome of *Drosophila americana americana*. *Genetics* 153: 222-233.

Mol, J., E. Grotewold, R. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Science* 3: 212-217.

Morales, M.A. 1972 Steroidal sapogenins from *Agave cocui*. *Phytochemistry* 1: 1191-1192.

Moreno, S.S.F., M. Esqueda, J. Martínez, G. Palomino. 2007. Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Fitotecnia Mexicana* 30: 13-23.

Nielsen, E.T., O.K. Walker, S.W. Miller, T.T.L. Semones, B.D. Clinton. 1999. Inhibition of seedling survival under *Rhododendron maximum* (Ericaceae): could allelopathy be a cause. *American Journal of Botany* 86: 1597-1605.

Novák, K., P.V. Chovanec, M. Skrdleta, M. Kropáčová, L. Lisá, M. Némecová. 2002. Effect of exogenous flavonoids on nodulation of pea (*Pisum sativum* L.). Journal of Experimental Botany 53: 1735-1745.

Osorio, Z.M.A., D. Infante, S. Molina. 2006. Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease. Boletín Nakari 17: 1-7.

Palomino, R.P.O.M. 1995. Flavonoides del género *Sideritis* (Lamiaceae) por HPLC. Tesis doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.

Parmar, V.S., H.N. Jha, A.K. Gupta, A.K. Prasad. 1992. Agamone, a flavanone from *Agave americana*. Phytochemistry 31: 2567-2568.

Pearce, S.R., G. Harrison, D. Li, J.S. Heslop-Harrison, A. Kumar, A.J. Flavell. 1996. The *Ty1-copia* group retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localization. Molecular and General Genetics 250: 305-315.

Pearce, S.R., M. Knox, T.H.N. Ellis, A.J. Flavell, A. Kumar. 2000. Pea *Ty1-copia* group retrotransposons: transpositional activity and use as molecular markers to study genetic diversity in *Pisum*. Molecular and General Genetic 263: 898-907.

Peck, M.C., R.F. Fisher, S.R. Long. 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium melilot*. Journal of Bacteriology 188: 5417-5427.

Peters, N.K., S.R. Long. 1988. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meli/oti* nodulation genes. Plant Physiology 88: 396-400.

Pichersky, E., D. Gang. 2000. Genetics and biochemistry of specialized metabolites in plants: an evolutionary perspective. Trends in Plant Science 5: 439-445.

Poulton, J. 1990. Cyanogenesis in plants. *Plant Physiology* 94: 401-405.

Ramos, V.A., R.D. Dallmeyer, G. Vujovich. 1998. Time constraints on the Early Palaeozoic docking of the Precordillera, central Argentina. En: *The Proto-Andean Margin of Gondwana* (Eds. Pankhurst, R.J., C.W. Rapela). Geological Society. Special Publication, London 142: 143-158.

Reddy, U.K., S. Saha, P. Nimmakayala, R. Katam, A. Levi. 2004. Identification of polymorphisms using RNASEH-LTR regions of the *ty1*-copia retrotransposons in watermelon accessions. *Plant and Animal Genome XII Conference Proceeding* pp: 329.

Rennie, J. 1993. Los nuevos giros del ADN. *Investigación y Ciencia* 200: 68-75.

Rhode, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetics and Breeding* 50: 249-261.

Rico, C.L. 2005. Nuevos retrotransposones de naranjo. Desarrollo de marcadores basados en retrotransposones para la evaluación de la biodiversidad de los críticos. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. España.

Riviere, C., V.N.T. Hong, L. Pieters, B. Dejaegher, Y.V. Heyden, M.C. Van, J. Quetin-Leclercq. 2009. Polyphenols isolated from antiradical extracts of *Mallotus metcalfianus*. *Phytochemistry* 70: 86-94.

Rocha, M., A. Valera, L.E. Eguiarte. 2005. Reproductive Ecology of five sympatric *Agave littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *American Journal of Botany* 92: 1330-1341.

Rocha, M., S.V. Good-Ávila, F. Molina-Freaner, H.T. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B.S. Gaut, V. Souza, L.E. Eguiarte. 2006. Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 327–342.

Rocheta, M., J. Cordeiro, M. Oliveira, C. Miguel. 2007. ppRT-1: the first complete *gypsy-like* retrotransposon isolated in *Pinus pinaster*. *Planta* 225: 551-562.

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 of Genetics and Breeding* 89: 312-326.

Ryals, J., S. Uknes, E. Ward. 1994. Systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 104: 1109-1112.

Saldívar, S.M., Y.L. Vargas-Rodríguez. 2007. Usos de *agaves* en el México prehispánico. En: *Agaves del Occidente de México* (Eds. Vázquez-García, J.A., Y.L. Vargas-Rodríguez, S.M. Saldívar). Universidad de Guadalajara, Consejo Regulador del Tequila, CIATEJ, LSU, CONAFOR. México, pp: 112-118.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Sanguinetti, C., E. Díaz, A. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques* 17: 914-921.

Schulman, A.H., R. Kalendar. 2005. A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 598-605.

SEMARNAT 2002. Norma Ecológica Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. TOMO DLXXXII (4), 06/03/2002.

Shi, Y.Z., T. Yamamoto, T. Hayashi. 2002. The japanese pear genome program III. Copia-Like retrotransposon in pear. *Acta Horticulturae ISHS* 587: 247-252.

Silva-Montellano, A., L.E. Eguiarte. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert II.

Genetic variation, differentiation, and in breeding estimates. *American Journal of Botany* 90: 700-706.

Silvertown, J.W., D. Charlesworth. 2001. *Introduction to plant population biology*. Blackwell. Oxford.

Sosa, P.A., F.J. Batista, M.A. González-Pérez, N. Bouza. 2002. La Conservación Genética de las Especies Vegetales Amenazadas. Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación. En: *Biología de la Conservación de Especies Amenazadas* (Ed. Bañares, A.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente, España, pp: 2-27.

Sosa, P.A. 2003. Conservación genética de endemismos vegetales amenazados de las Islas Canarias. Proyecto de Investigación. Inédito. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Stafford, H. 1997. Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legumes roots. *The Botanical Review* 63: 27-39.

Subramanian, S.S., A.G.R. Nair. 1970. A note on the colour change of the flowers of *Hibiscus mutabilis*. *Current Science* 39: 323–324.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.

Taiz, L., E. Zeiger. 2008. *Plant Physiology*. Sinauer Associates. Massachusetts.

Tam, S.M., M. Causse, C. Garchery, H. Burck, C. Mhiri, M.A. Grandbastien. 2007. The distribution of *copia-lyke* retrotransposons and the evolutionary history of tomato and related wild species. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1056-1072.

Teo, C., S. Tan, C. Ho, Q. Zaman, Y. Othman, J. Heslop-Harrison. 2005. Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in orphan crop banana. *Journal of Plant Biology* 48: 96-105.

Tignon, M., B. Watillon, R. Kettmann. 2001. Identification of *copia-like* retrotransposable element by apple. *Acta Horticulturae ISHS* 546: 515-520.

Tinto, W.F., J.L. Simmons-Boyce, S. McLean, W.F. Reynolds. 2005. Constituents of *Agave americana* and *Agave barbadensis*. *Fitoterapia* 76: 594-597.

Torres-Morán, M.I., D. Infante, J.J. Sánchez-González, M.M. Morales-Rivera, A. Santerre. 2005. Diversidad genética en *Agave tequilana* Weber var. Azul proveniente de micropropagación. *Boletín Nakari* 14: edición digital.

Torres-Moran, M., N. Almaraz-Abarca, A. Velazco-Ramírez, V. Hernández-Vargas, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León, C. Oliver-Salvador. 2008. Taxonomic significance of ISTR to discriminate species in Agavaceae. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3: 661-665.

Torres, M., M. Morales-Rivera, L. de la Cruz-Larios, A. Villalobos-Arámbula. 2006. Identification of polymorphisms among offshoots and micropropagated plants of *Agave tequilana* and *Agave cocui* using ISTRs. *Scientia-CUCBA* 8: 203-206.

Torres, M., M. Morales, R. Nuño, F. Santacruz, A. Rodríguez. 2007. Variability in *Agave tequilana* Wever var azul detected in micropropagation at a molecular level. *Boletín Nakari* 18: 3-5.

Towner, P. 2007. Purification of DNA. In: *Essential Molecular Biology. A Practical Approach* (Ed. Brown, T. A.). IRL Press. Oxford, pp: 47-68.

Uniyal, G.C., P.K. Agrawal, R.S. Thakur, O.P. Sati. 1990. Steroidal glycosides from *Agave cantala*. *Phytochemistry* 29: 937-940.

Van Heerden, F.R., B.E. van Wyk, A.M. Viljoen, P.A. Steenkamp. 2003. Phenolic variation in wild populations of *Aspalathus linearis* (rooibos tea). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 885-895.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

Wilkomirski, B., V.A. Bobeiko, P.K. Kintya. 1975. New steroidal saponins of *Agave americana*. *Phytochemistry* 14: 2657-2659.

Williams, C.A., J.B. Harborne. 1989. Bioflavonoids. En: *Methods in Plant Biochemistry* (Ed. Harborne, J.). Academic Press, London, pp: 357-387.

Wink, M., O. Schimmer. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: *Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology* (Ed. Wink, M.). Sheffield Academic Press. England, pp: 17-134.

Zhao, G., Z. Zhang, H. Sun, H. Li, H. Dai. 2007. Isolation of *Ty1-copia-like* retrotransposons sequence from the apple genome by chromosome walking based on modified SiteFinding-Polymerase chain reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39: 675-683.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco la paciencia y ayuda brindada por la Doctora Norma Almaraz Abarca, ya que parte del trabajo se lo debo a ella, al igual que a la academia de Biotecnología.

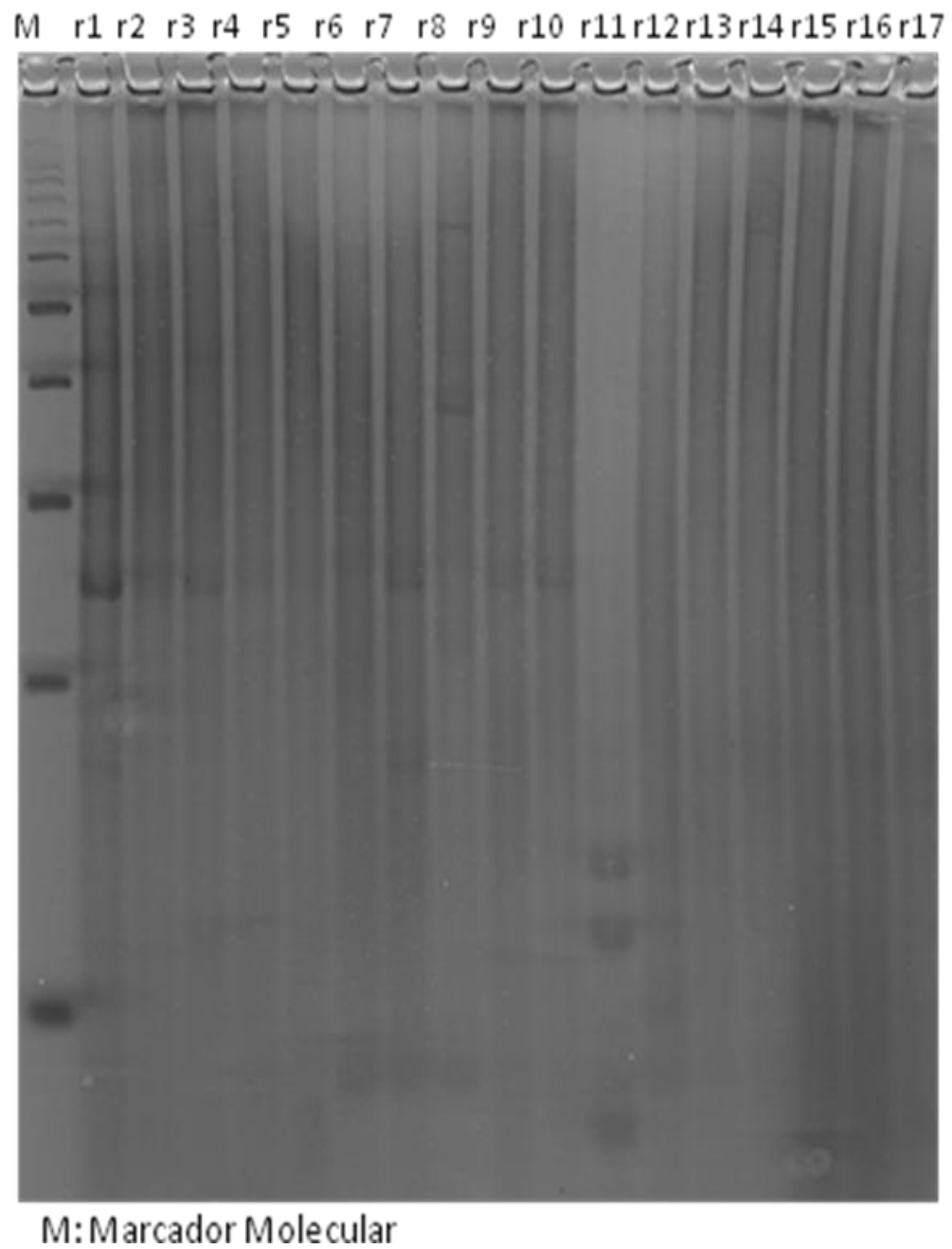
El apoyo incondicional de mi familia y amigos que siempre estuvieron dándome ánimos para concluir este proyecto.

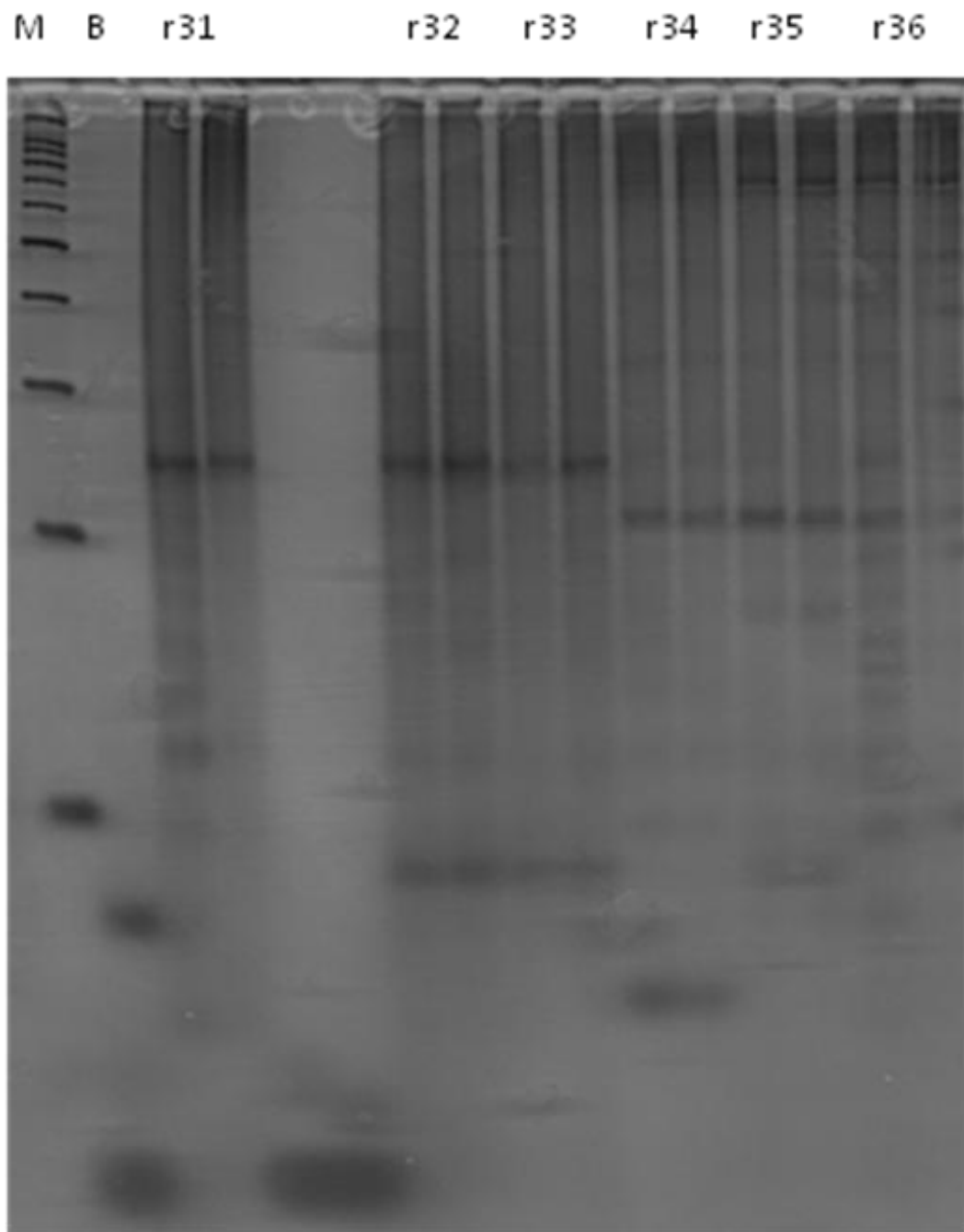
Agradezco el haber ingresado al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, unidad Durango, del Instituto Politécnico Nacional por darme la oportunidad de crecer tanto personal como profesionalmente y poder conocer a personas valiosas.

Sin olvidar a todas aquellas personas de las cuales estuve rodeada y que de una u otra forma participaron en mi formación, pudiéndome llevar como recuerdo que solamente con trabajo podré alcanzar mis objetivos.

ANEXOS

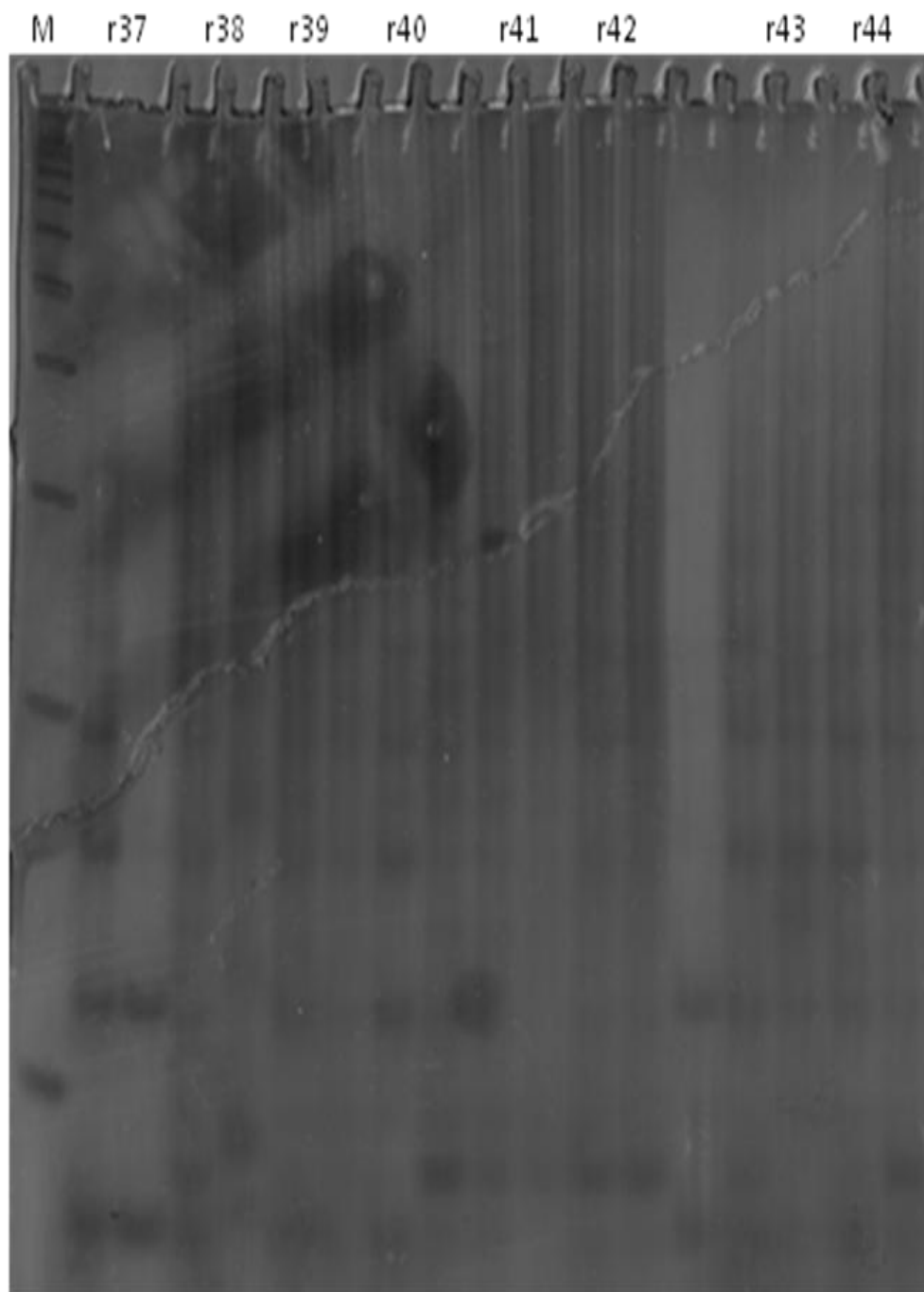
Anexo 1. Geles de Acrilamida al 6% de muestras de *Agave victoriae-reginae*



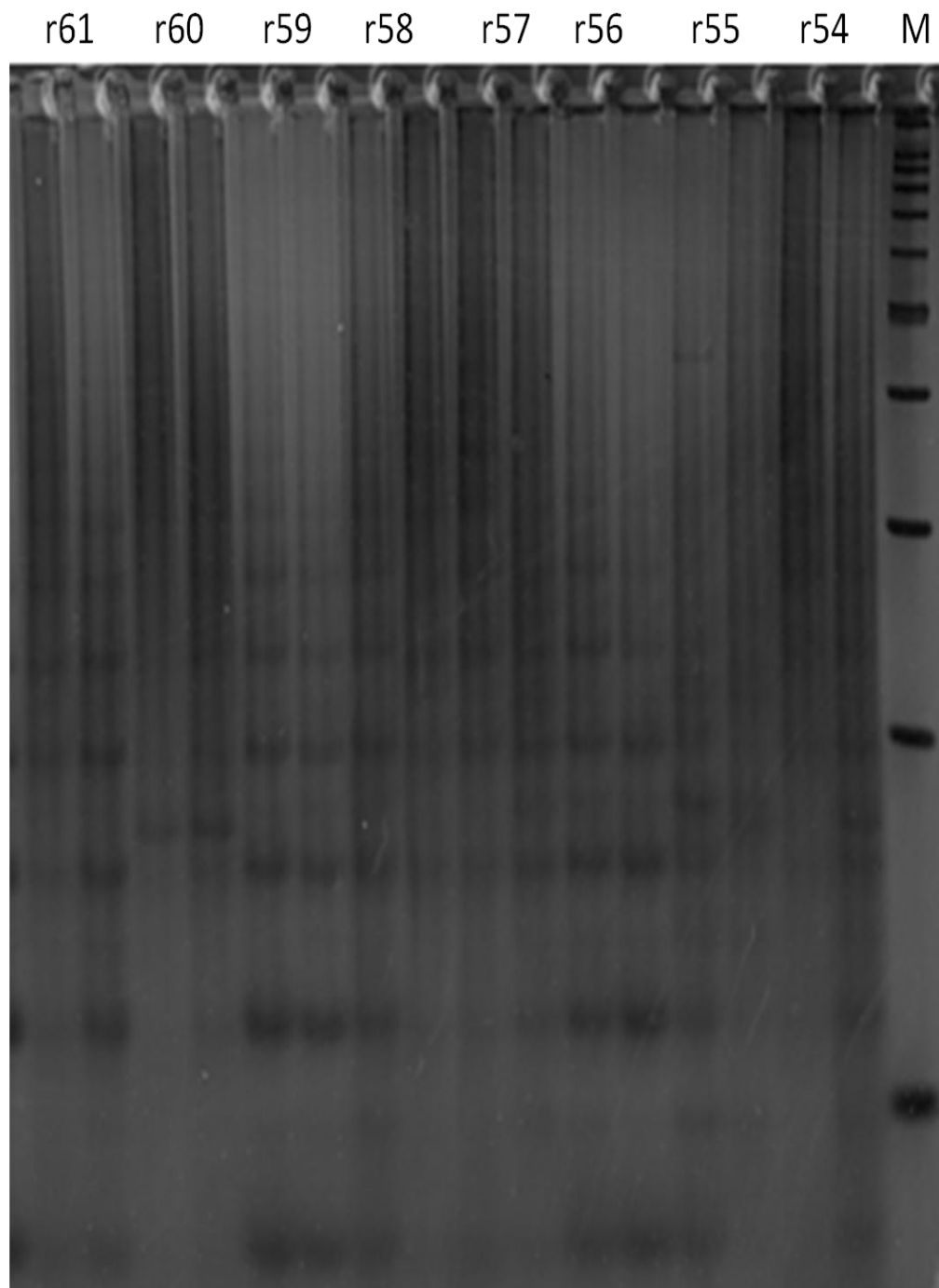


M: Marcador Molecular

B: Blanco

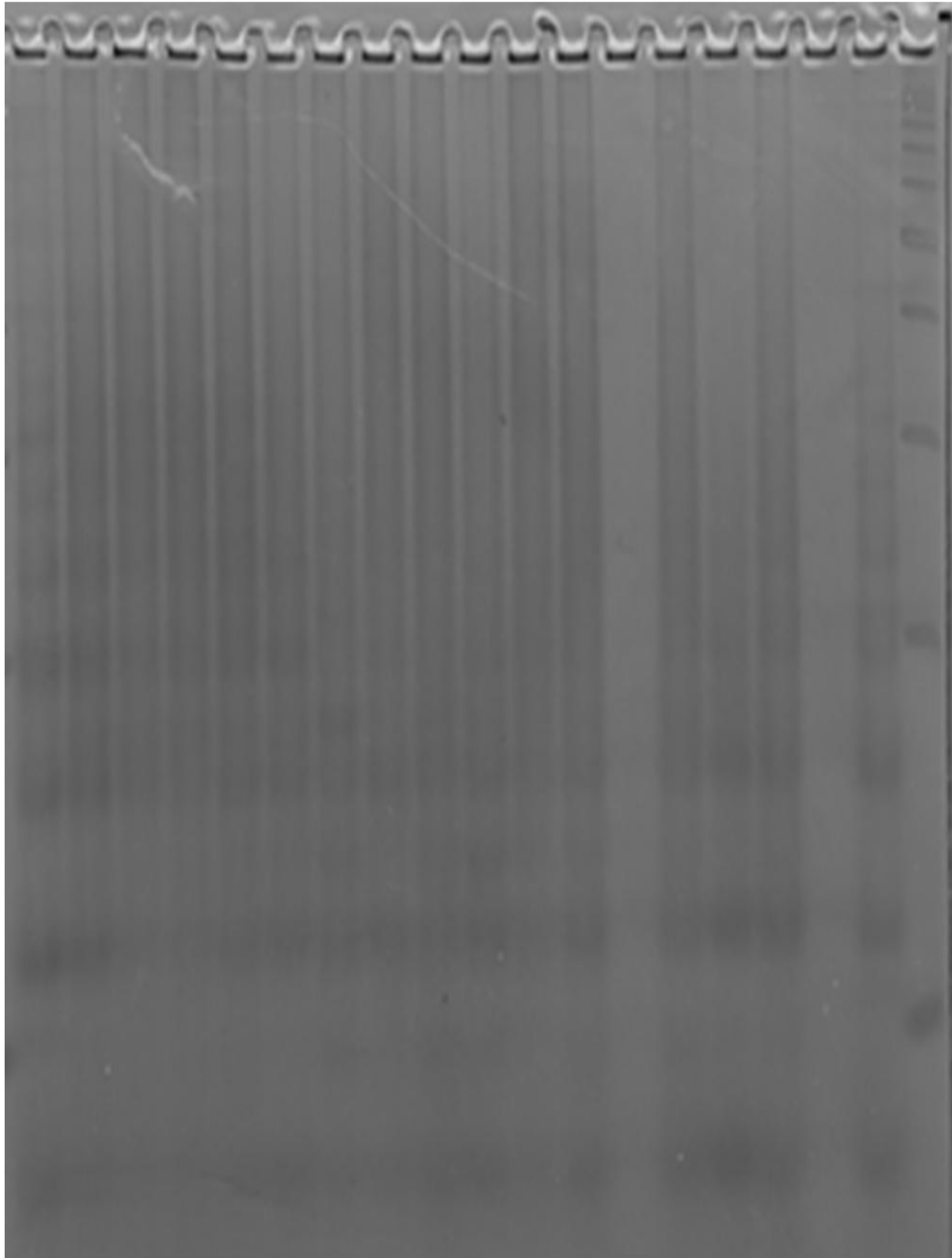


M: Marcador Molecular

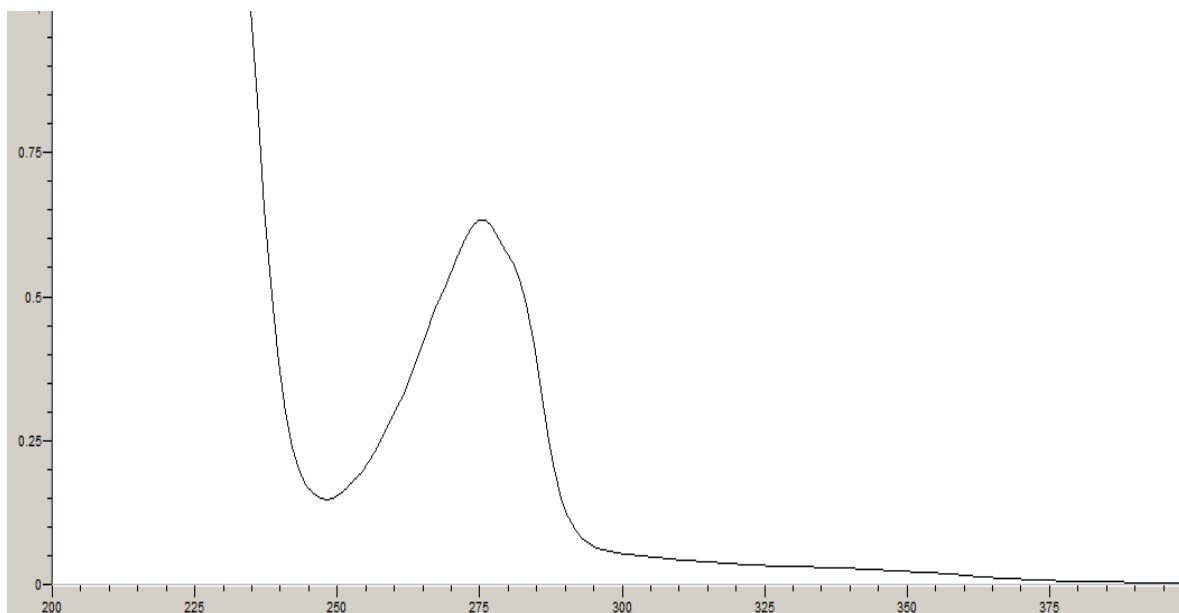


M: Marcador Molecular

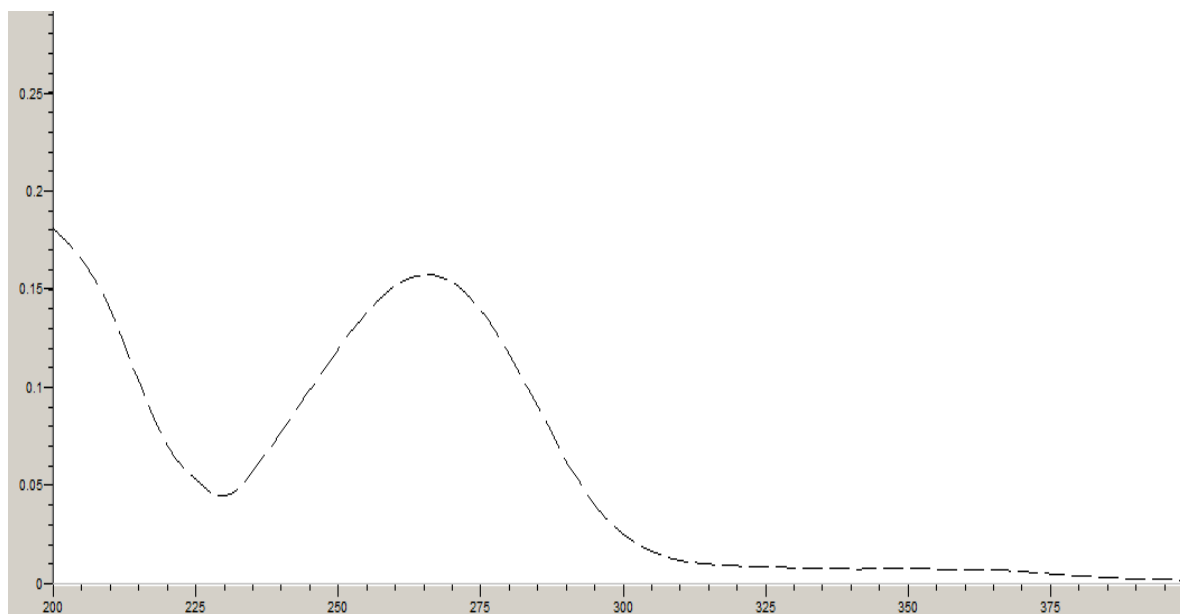
r69 r68 r67 r66 r65 r64 r63 r62 r62 M



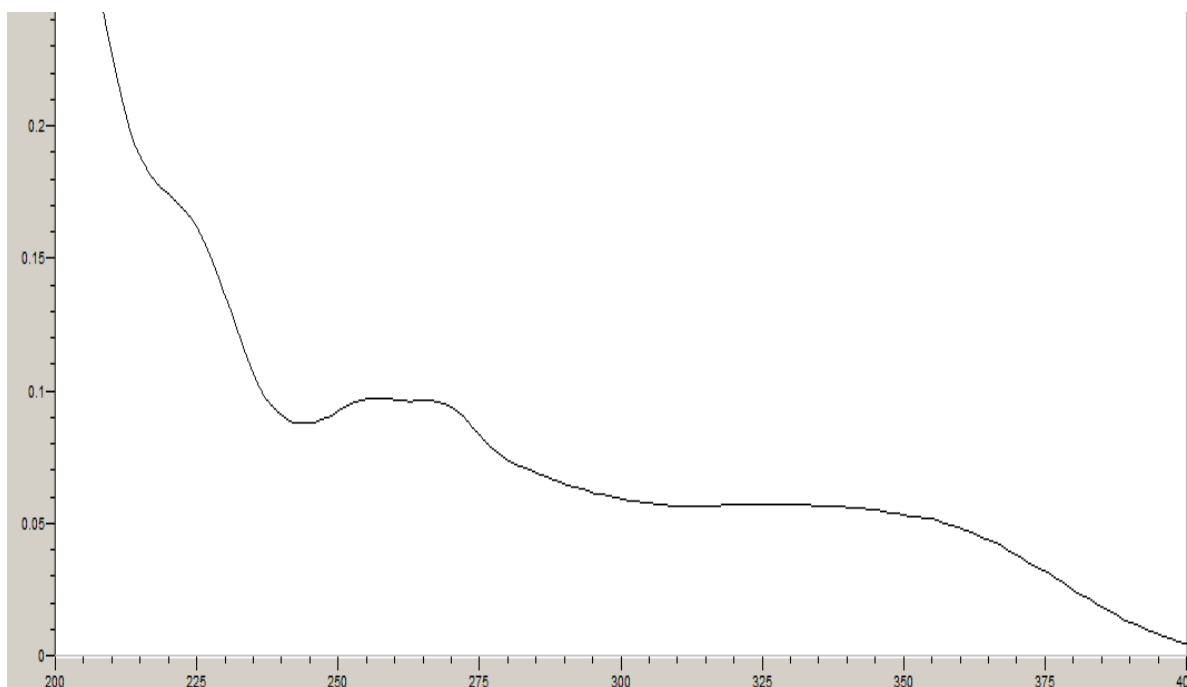
M: Marcador Molecular

Anexo 2. Espectros UV de los compuestos fenólicos detectados en los tejidos foliares de *Agave victoriae-reginae*, *Agave lechuguilla*, y *Agave striata*

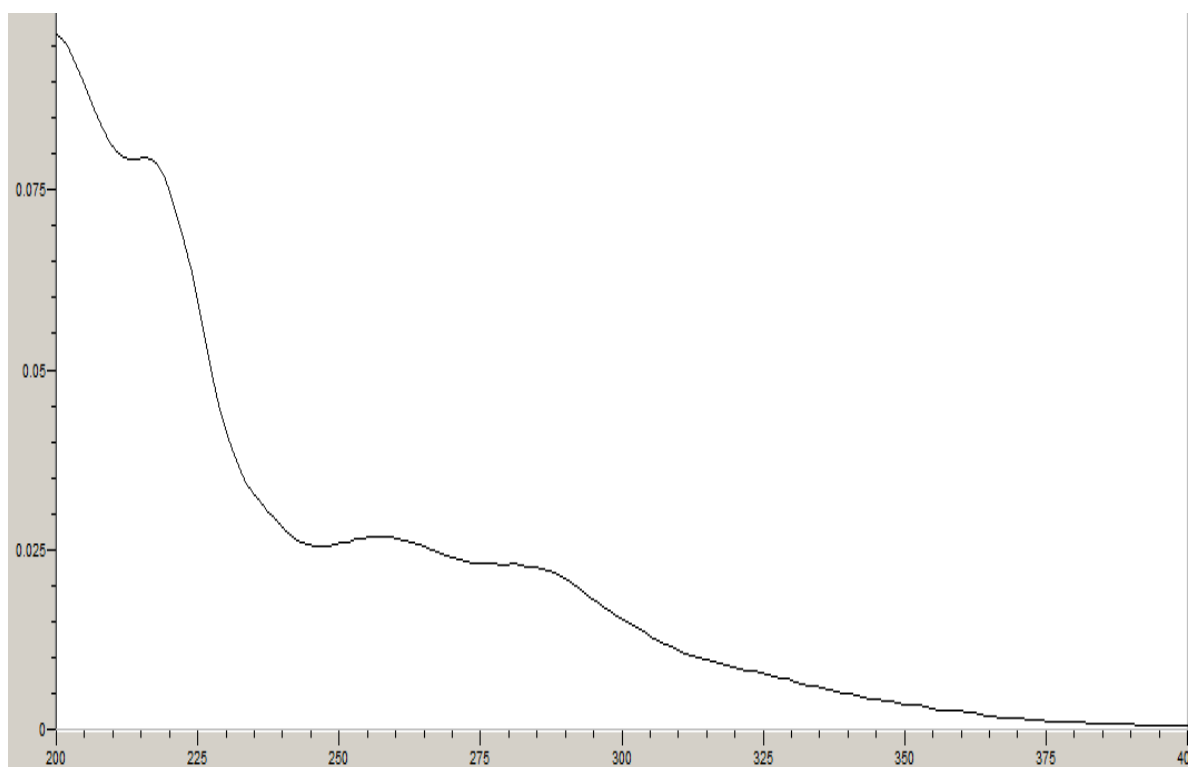
Compuesto 1: derivado de ácido benzoico, TR: 19.006



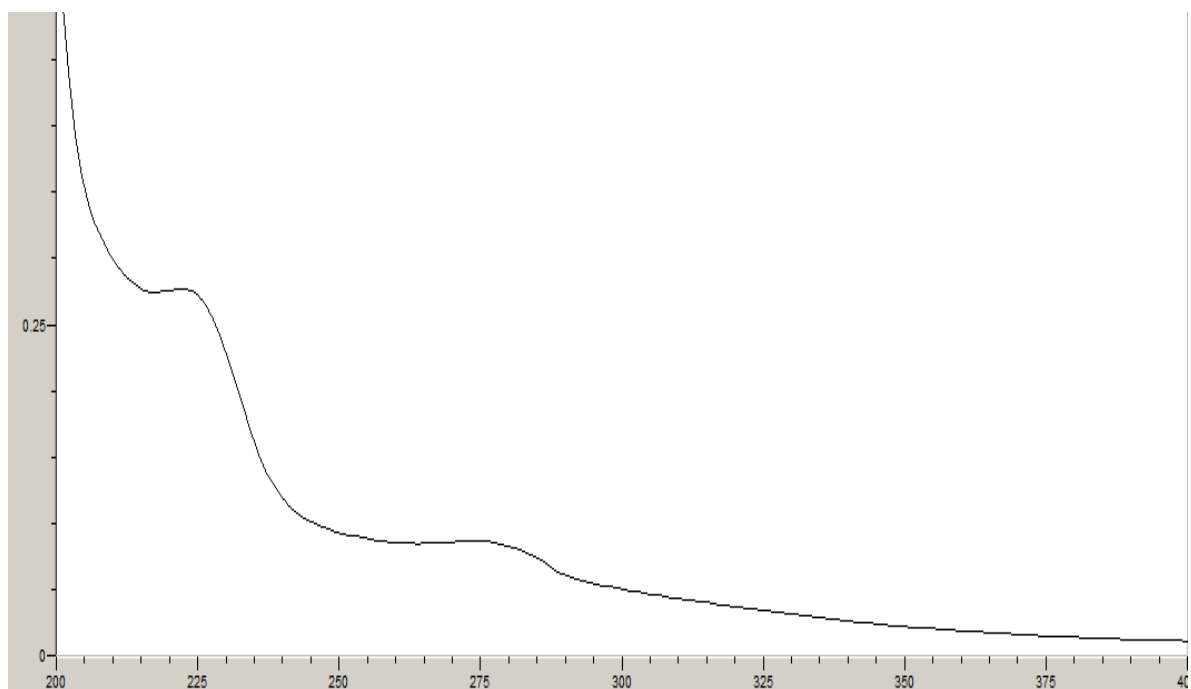
Compuesto 2: derivado de ácido fenólico, TR: 23.104



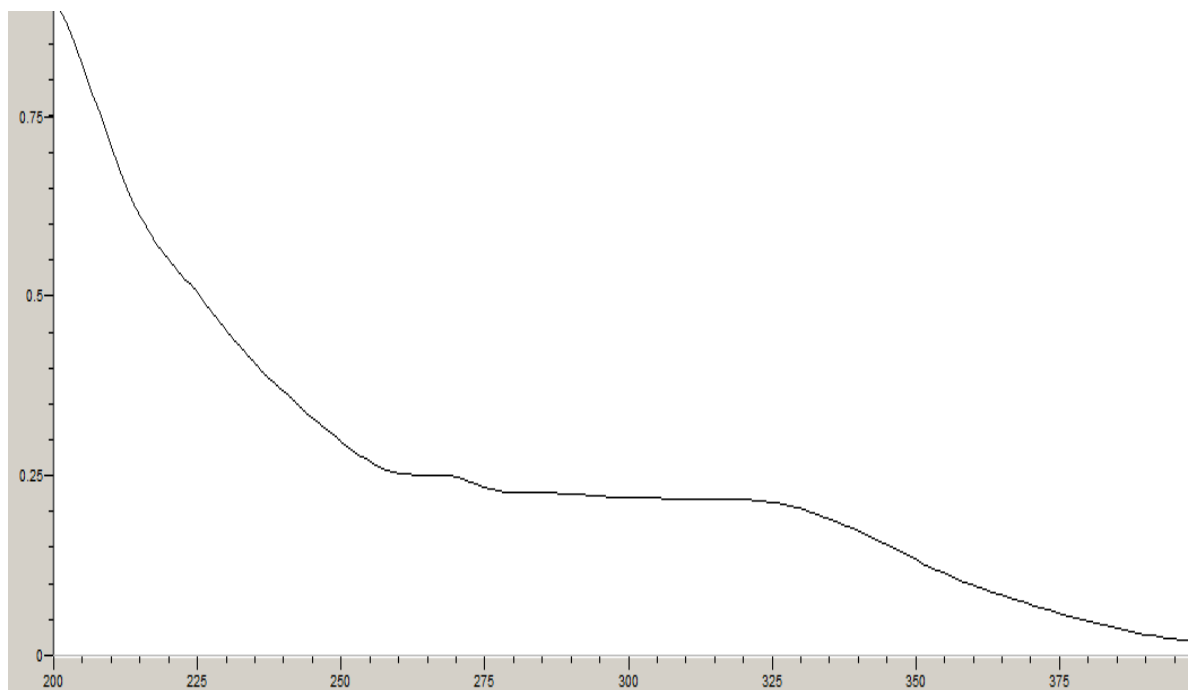
Compuesto 3: no identificado, TR: 22.722



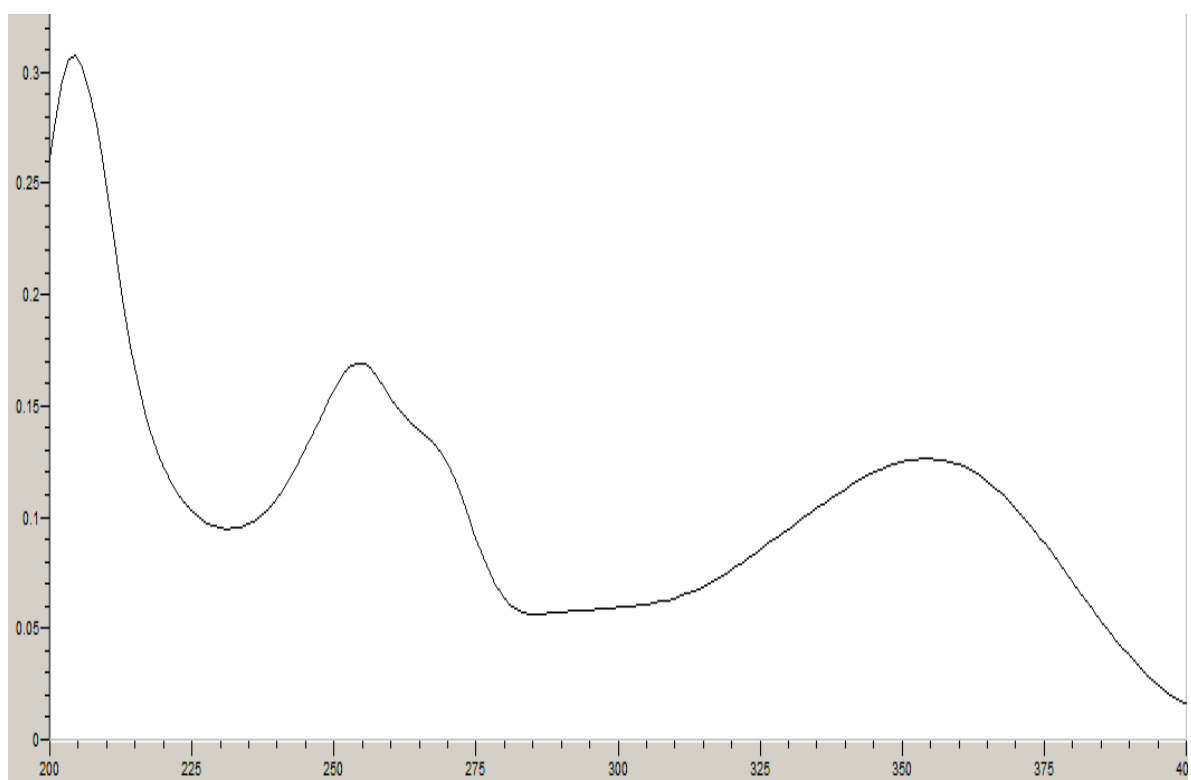
Compuesto 4: derivado de ácido cinámico, TR: 25.010



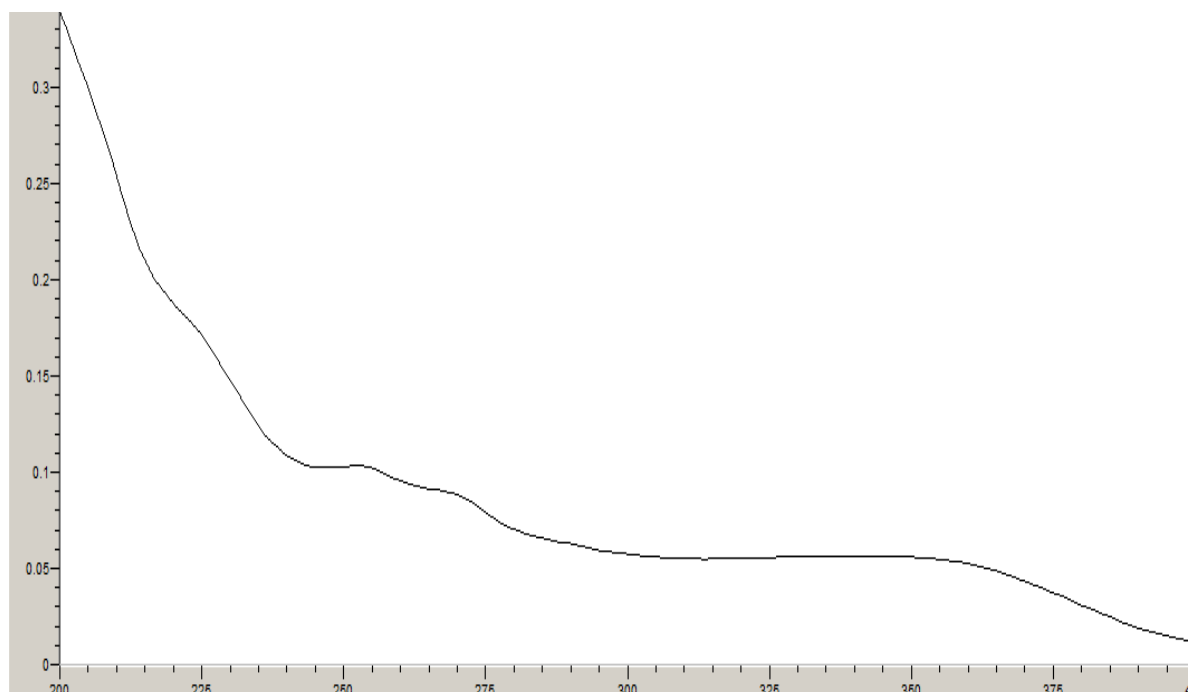
Compuesto 5: no identificado, TR: 27.313



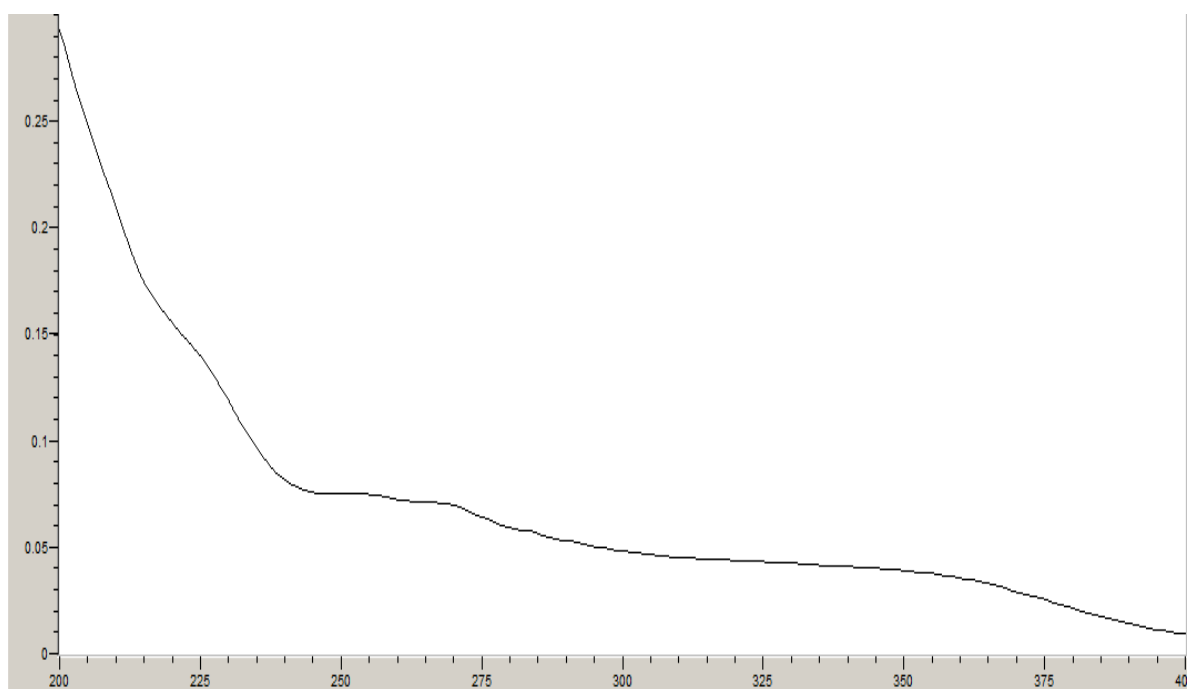
Compuesto 6: no identificado, TR: 27.181



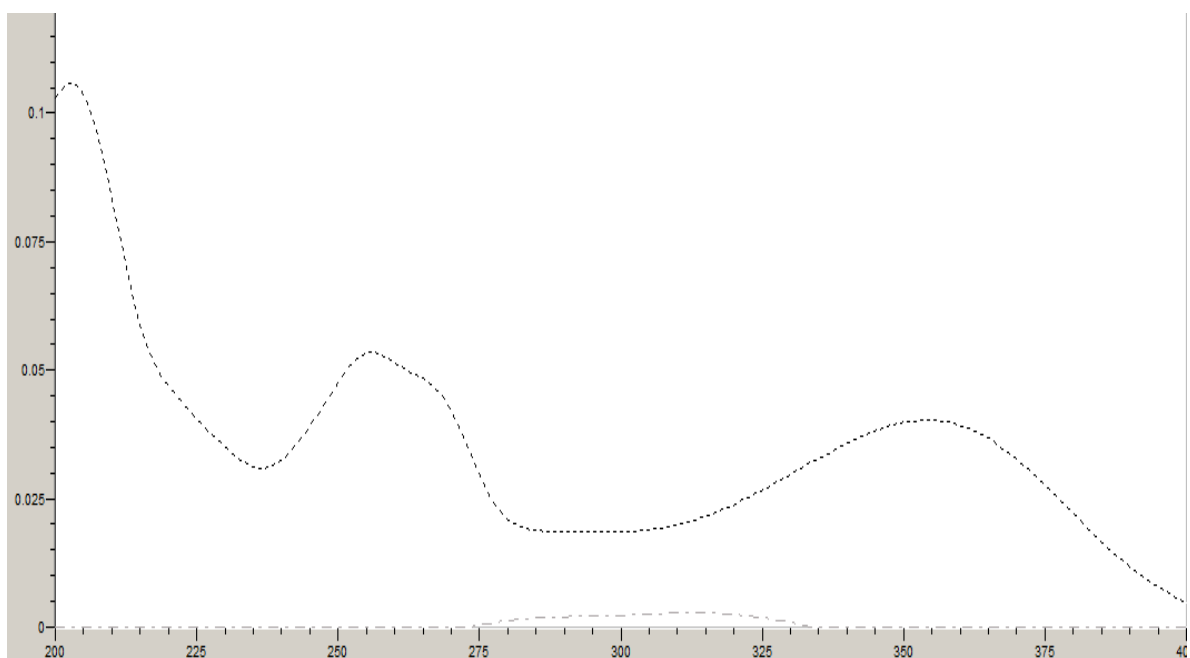
Compuesto 7: derivado glicósido de quercetina, TR: 27.024



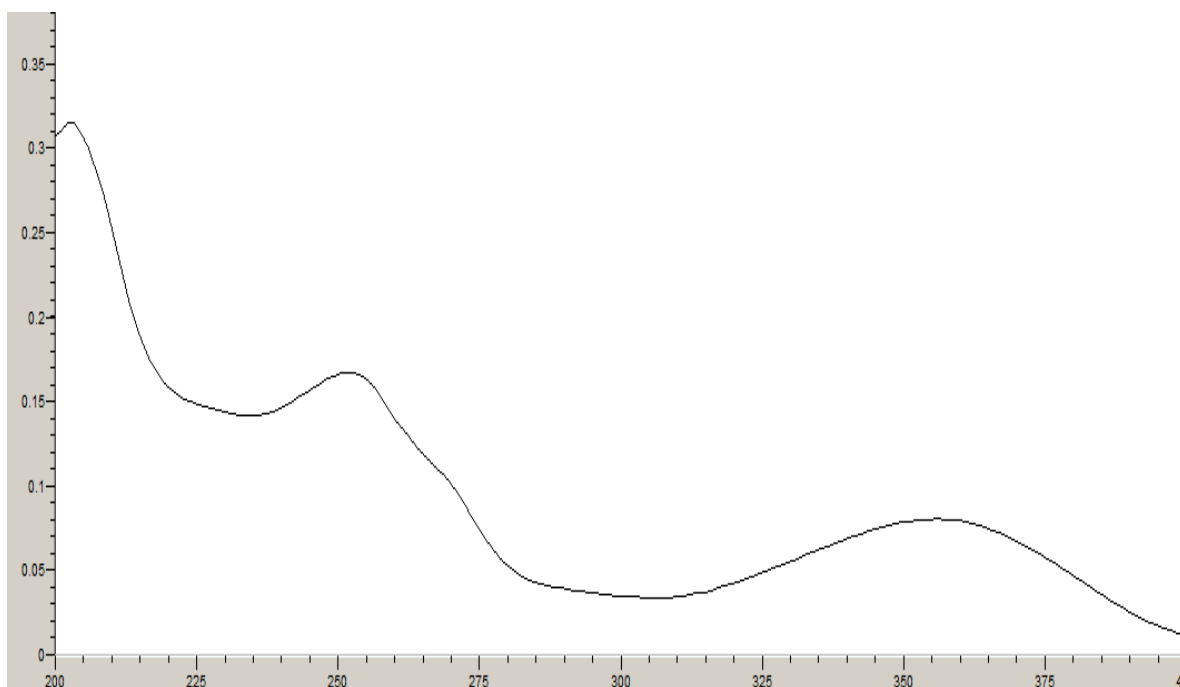
Compuesto 8: no identificado, TR:



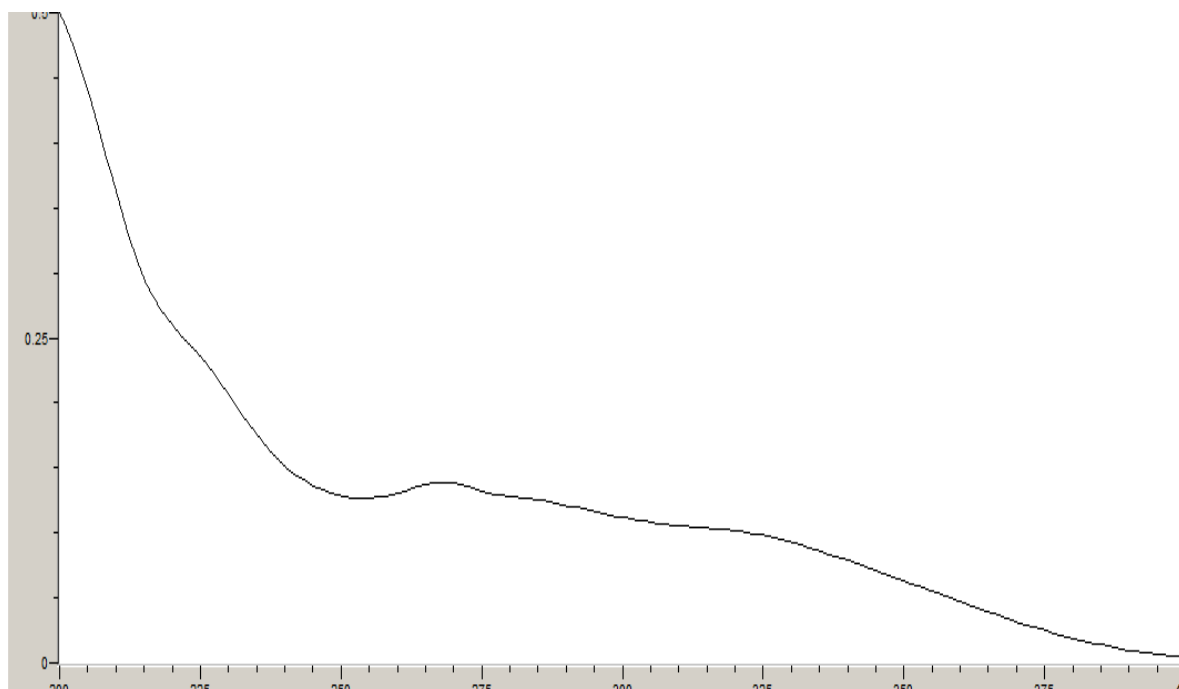
Compuesto 9: no identificado, TR: 25.181



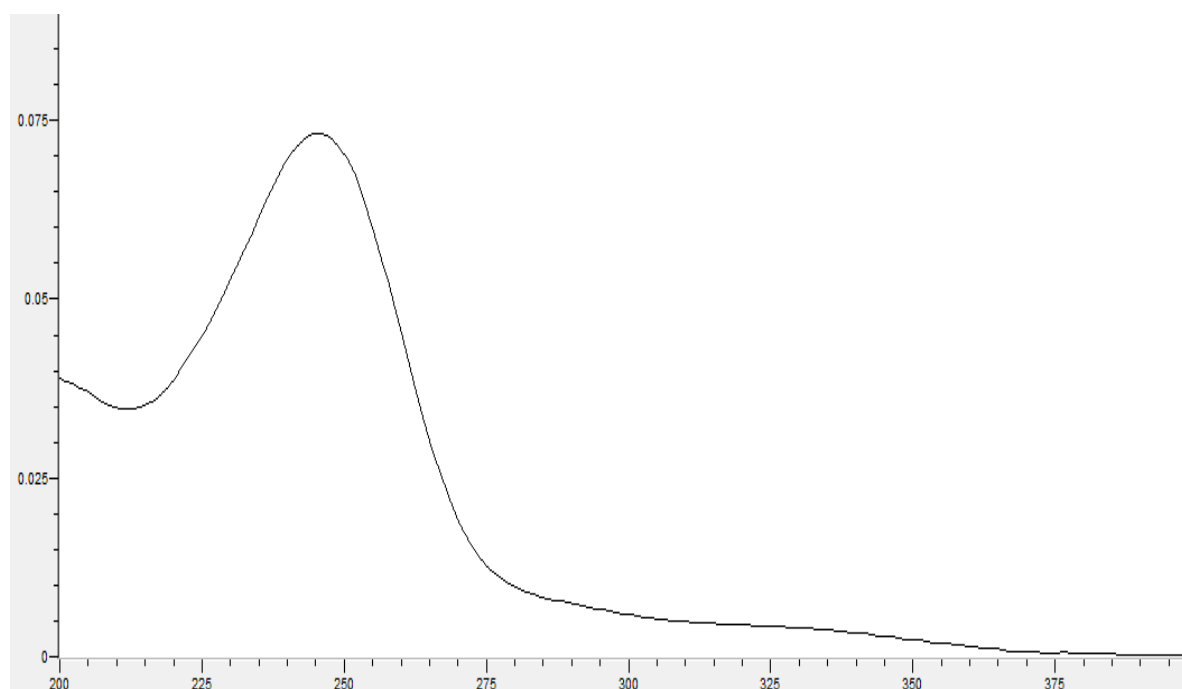
Compuesto 10: derivado glicosido de quercetina, TR: 28.045



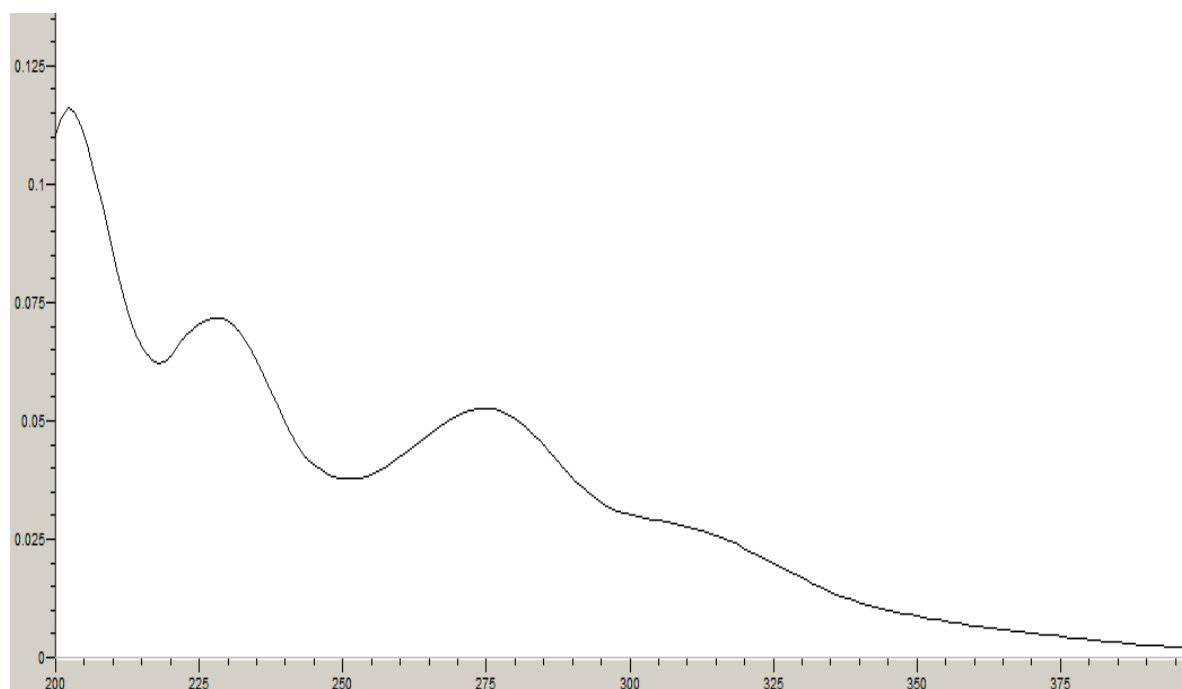
Compuesto 11: flavonol, TR: 28.868



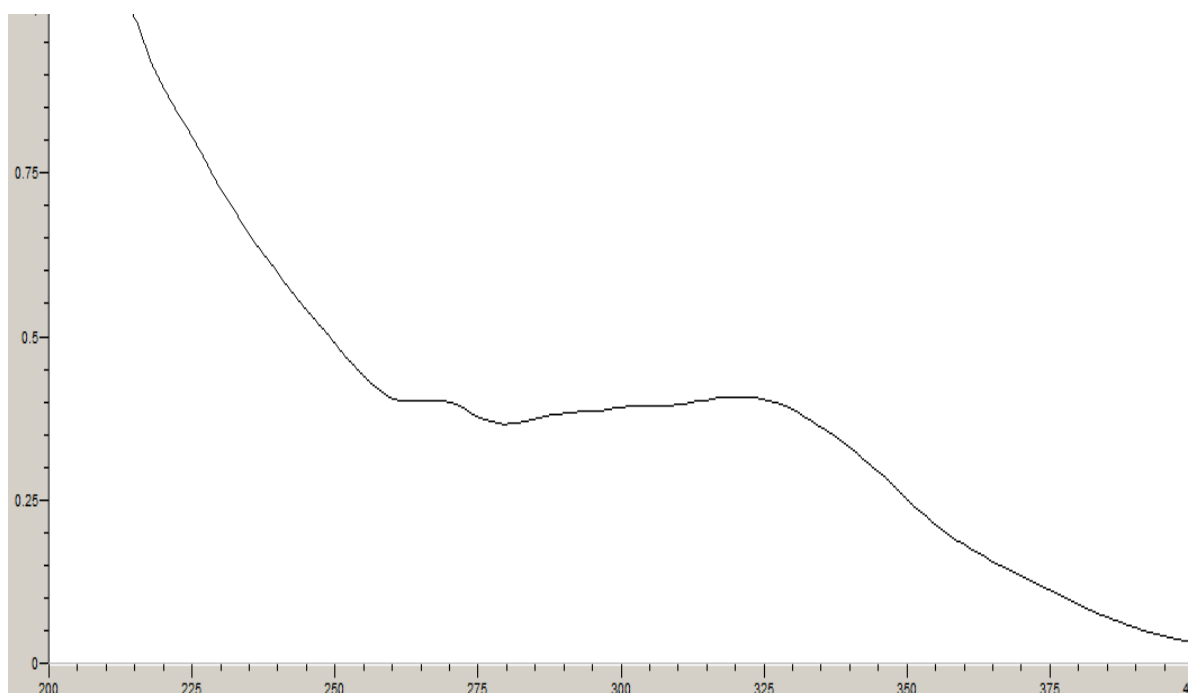
Compuesto 12: no identificado, TR: 29.642



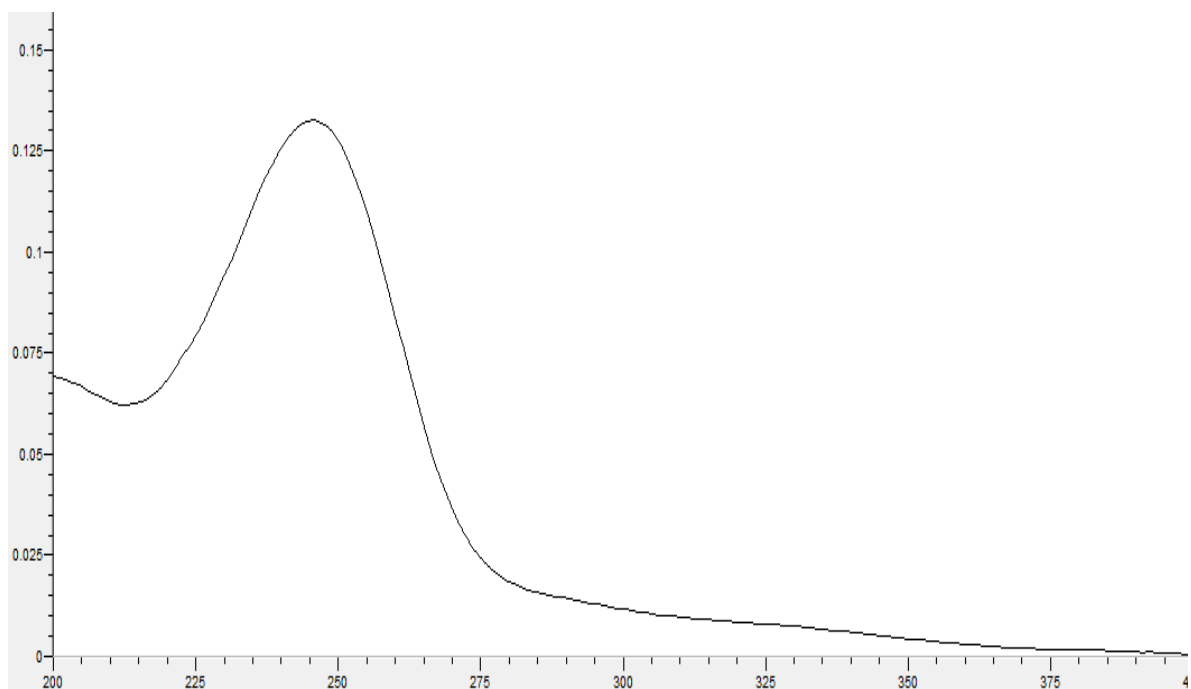
Compuesto 13: derivado de ácido benzoico, TR: 29.513



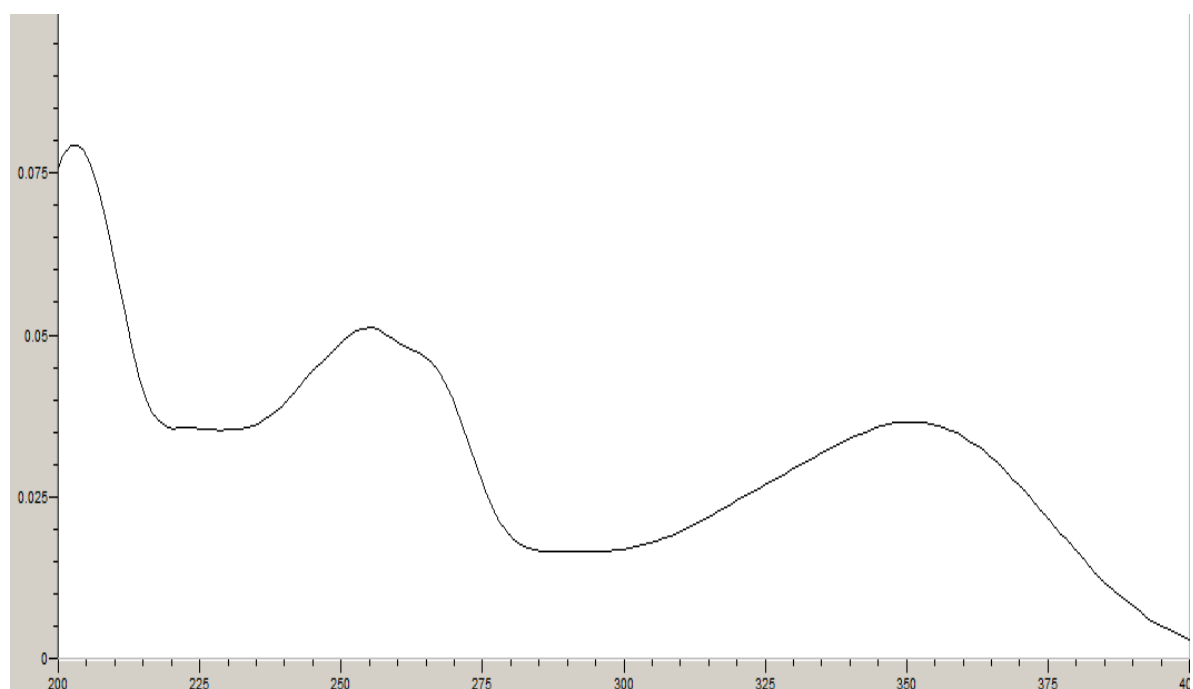
Compuesto 14: no identificado, TR: 30.012



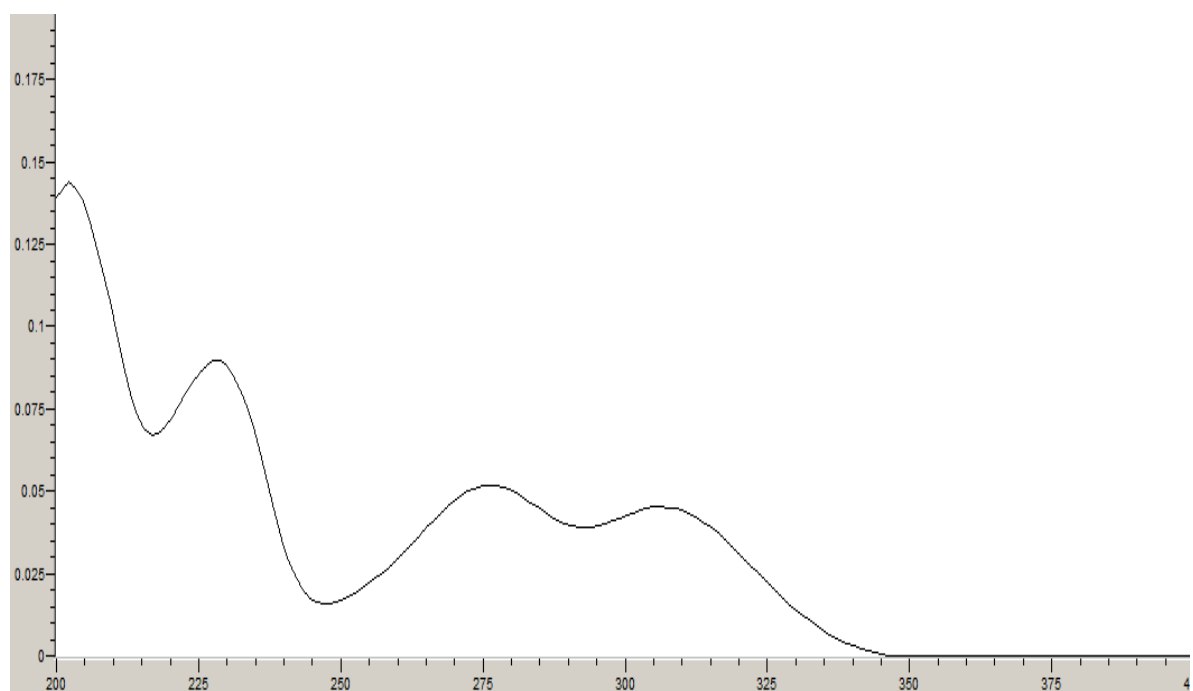
Compuesto 15: no identificado, TR: 31.478



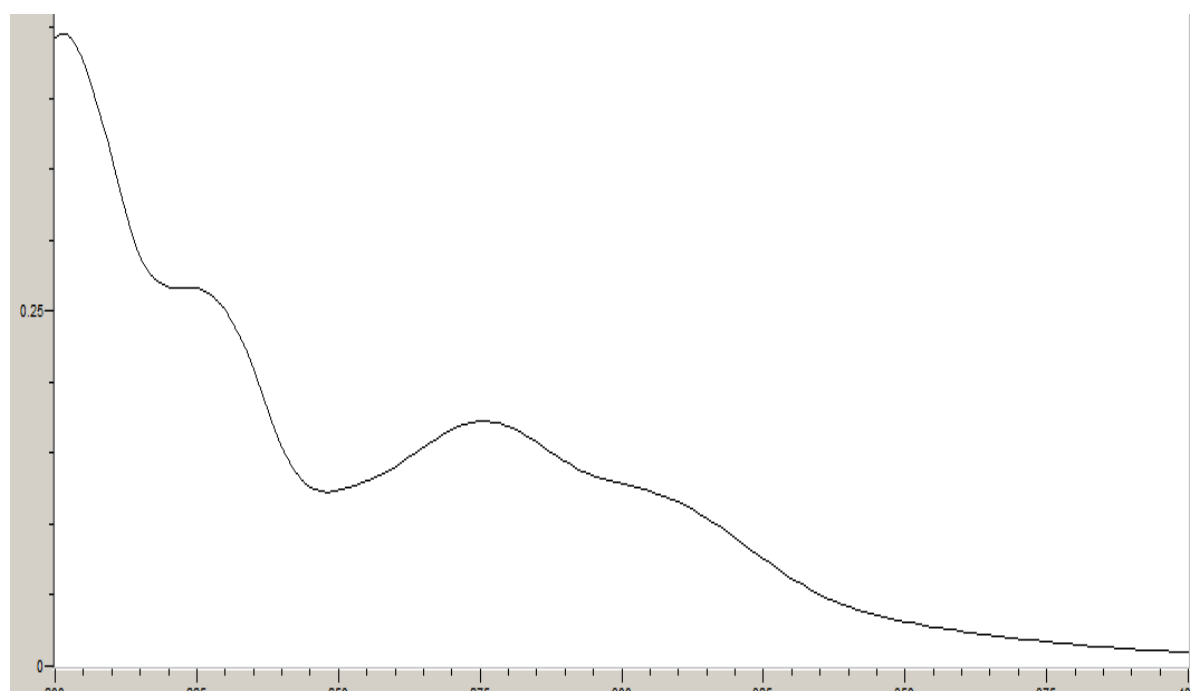
Compuesto 16: derivado de ácido benzoico, TR: 30.290



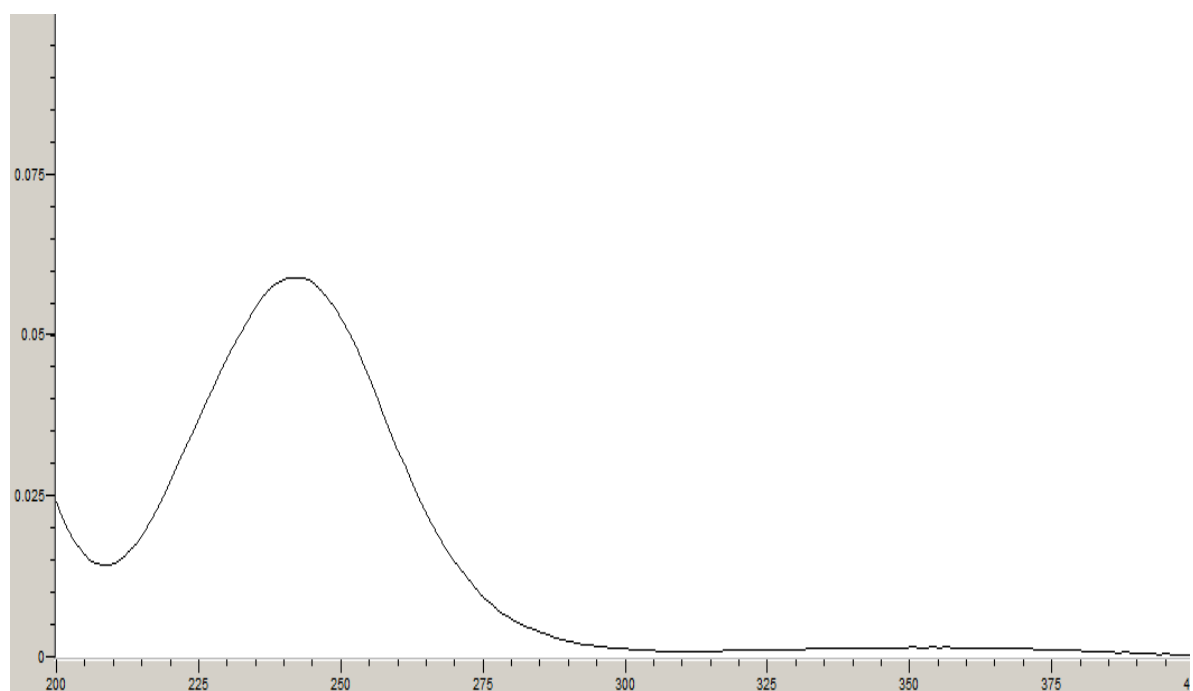
Compuesto 17: derivado glicosido de quercetina, TR: 30.660



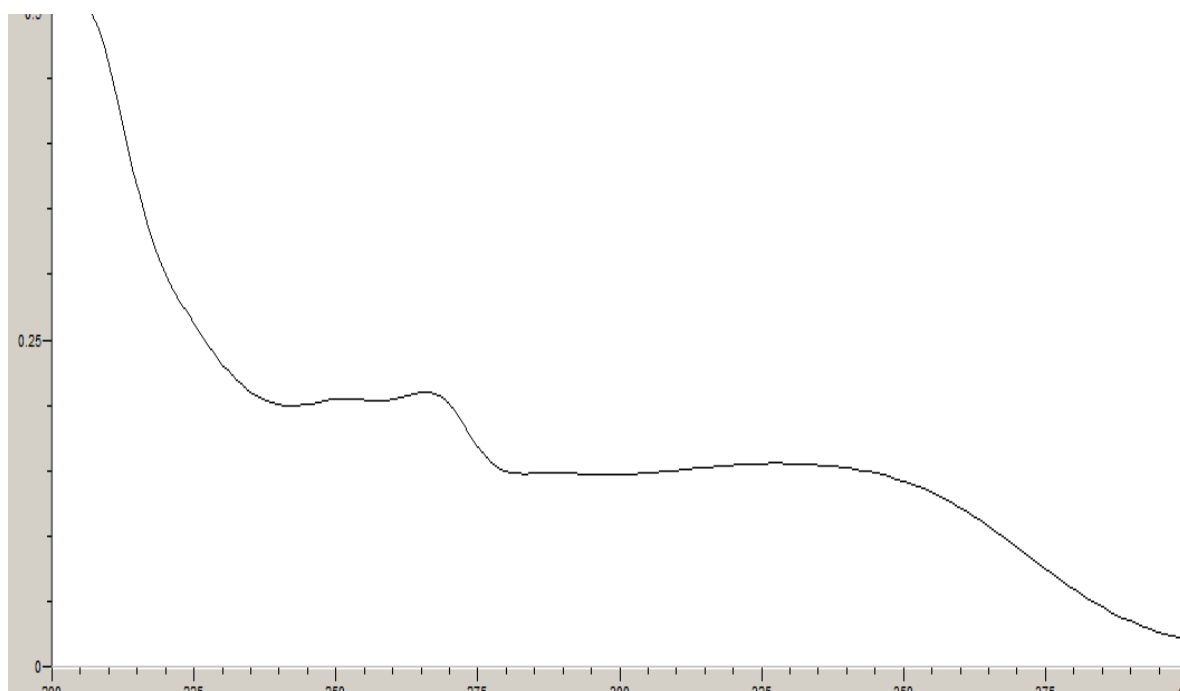
Compuesto 18: no identificado, TR: 30.794



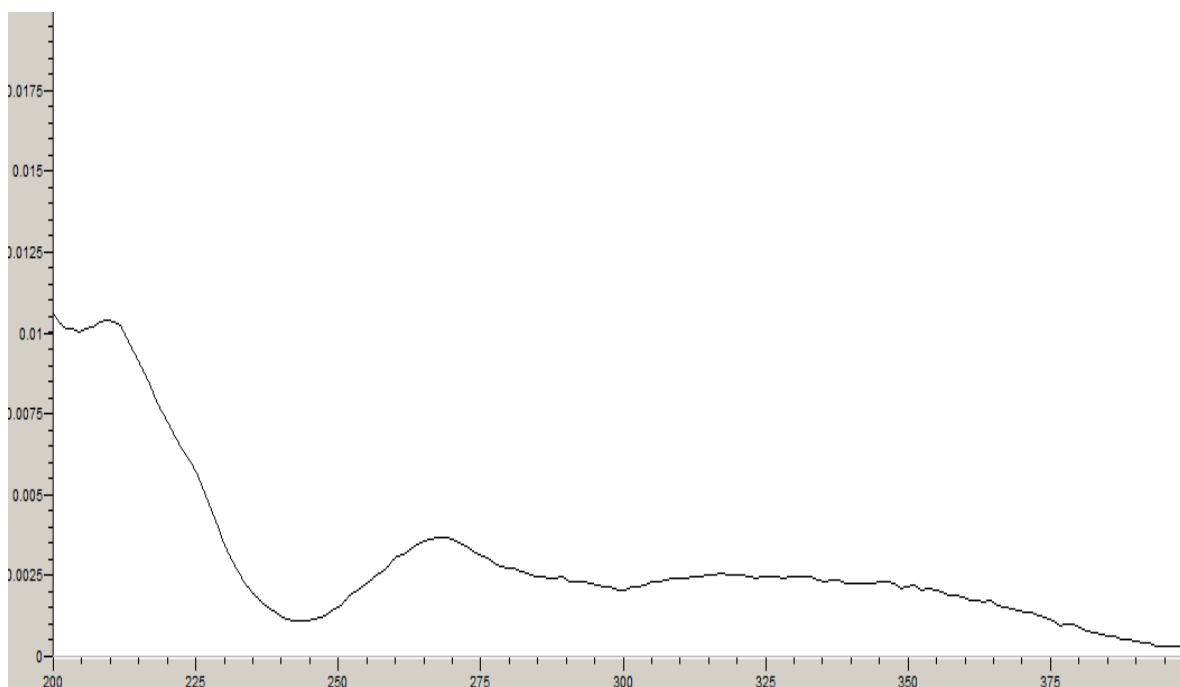
Compuesto 19: no identificado, TR: 30.646



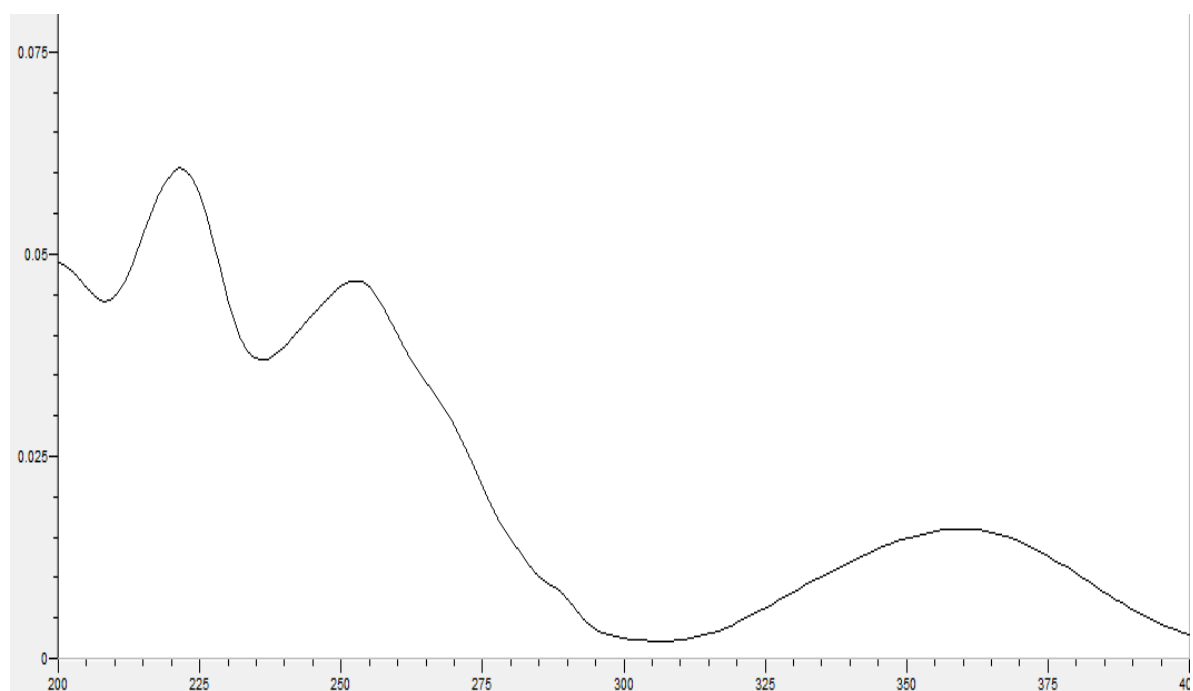
Compuesto 20: derivado de ácido fenólico, TR: 31.229



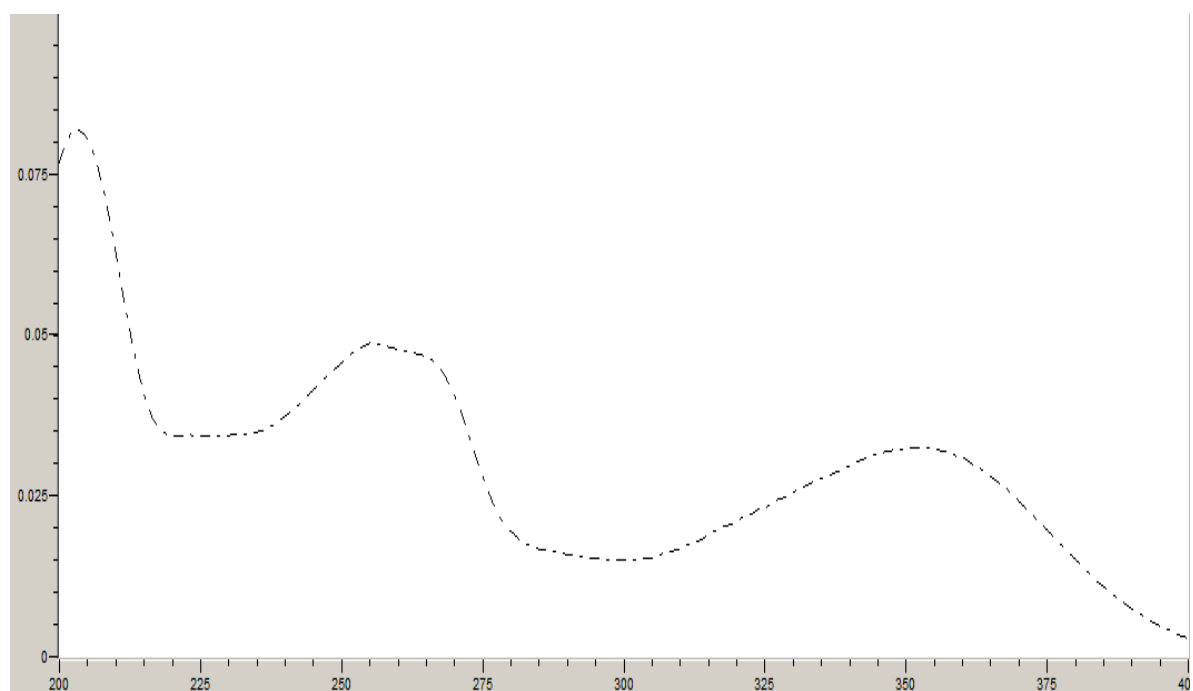
Compuesto 21: derivado de luteolina, TR: 31.637



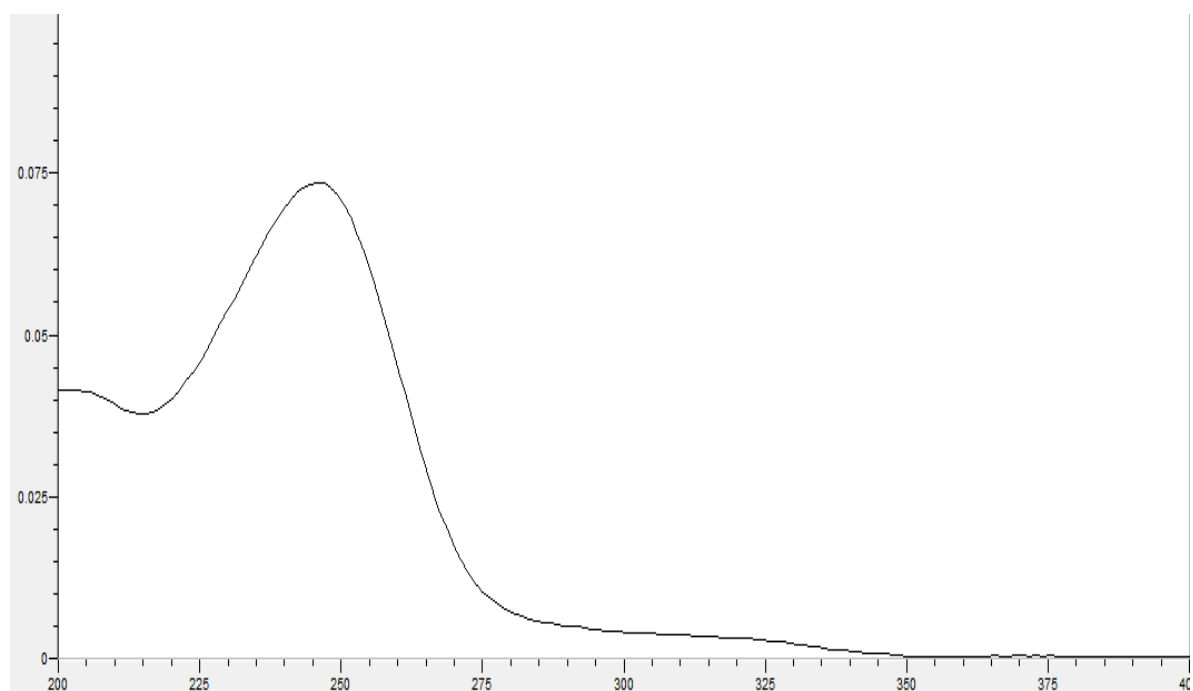
Compuesto 22: no identificado, TR: 31.356



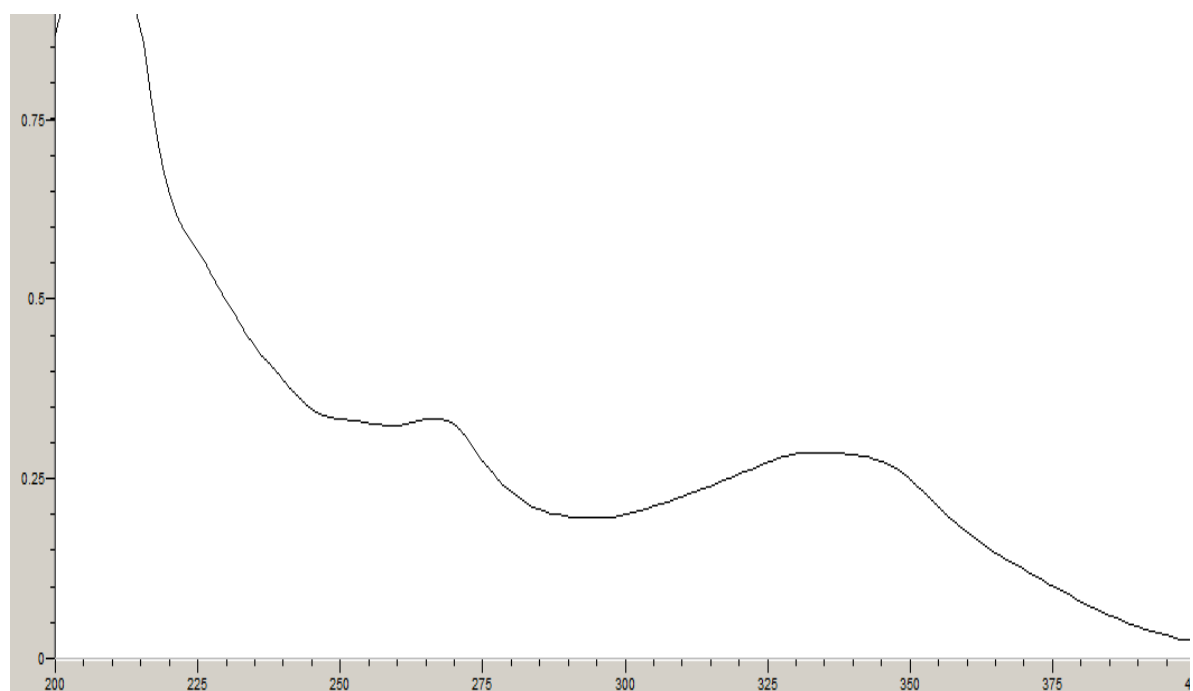
Compuesto 23: flavonol, TR: 31.322



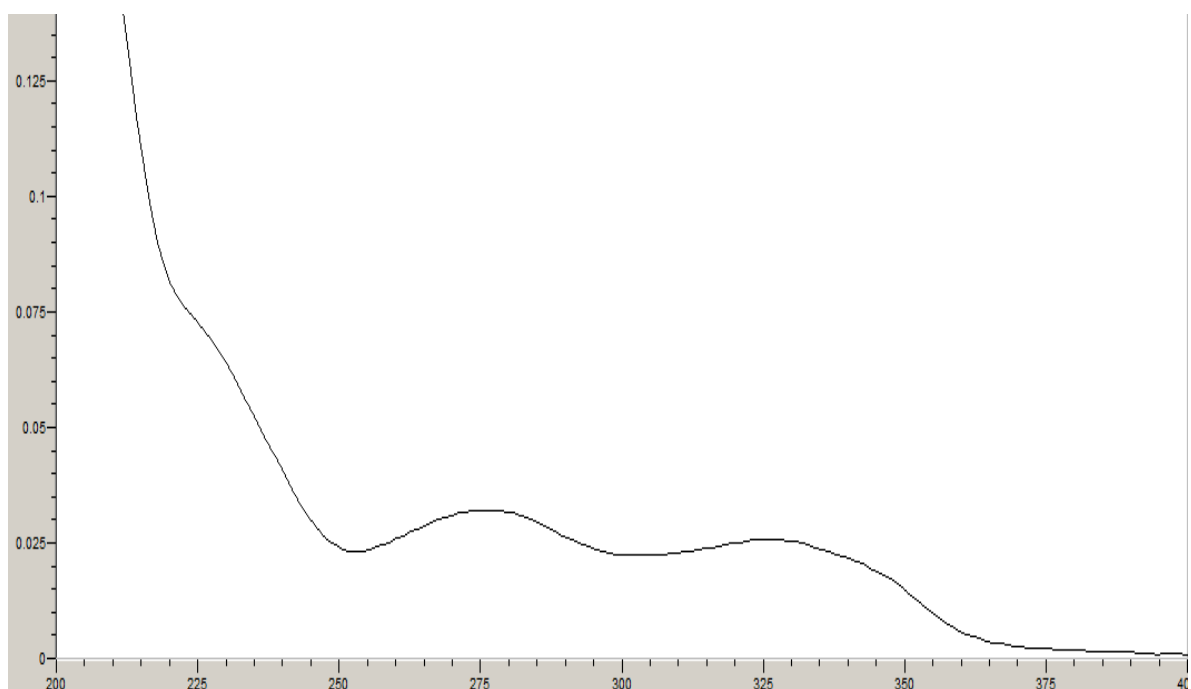
Compuesto 24: flavonol glicosido, TR: 31.479



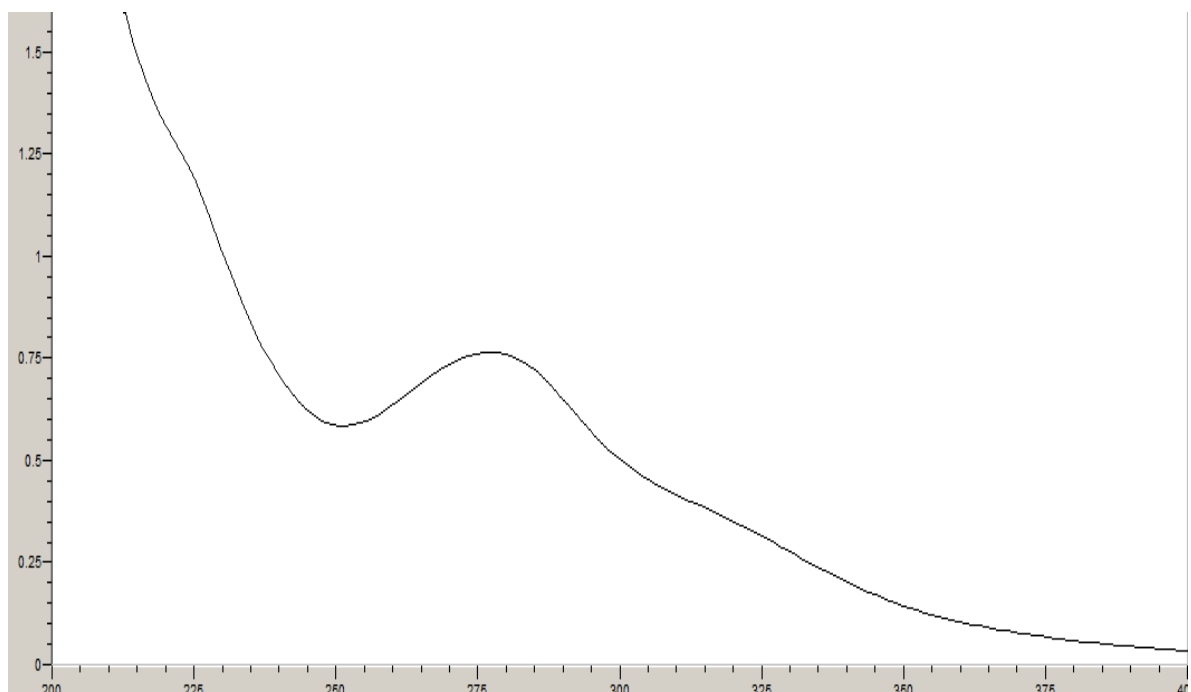
Compuesto 25: derivado de ácido benzoico, TR: 31.655



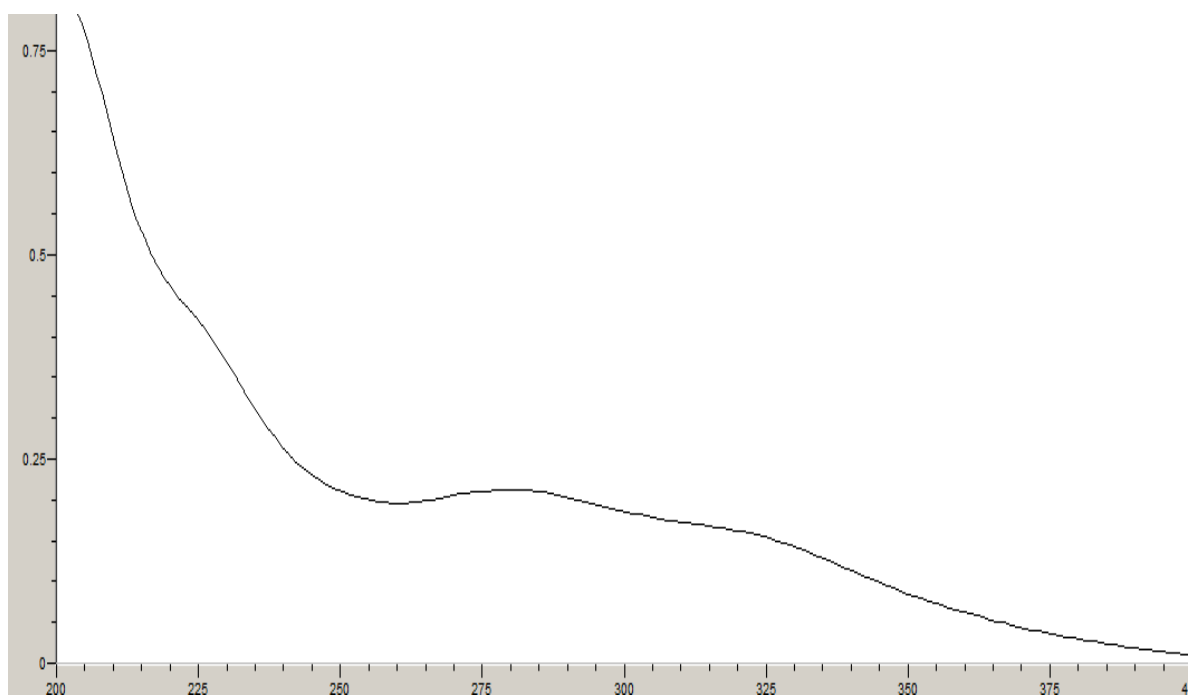
Compuesto 26: derivado de luteolina, TR: 32.278



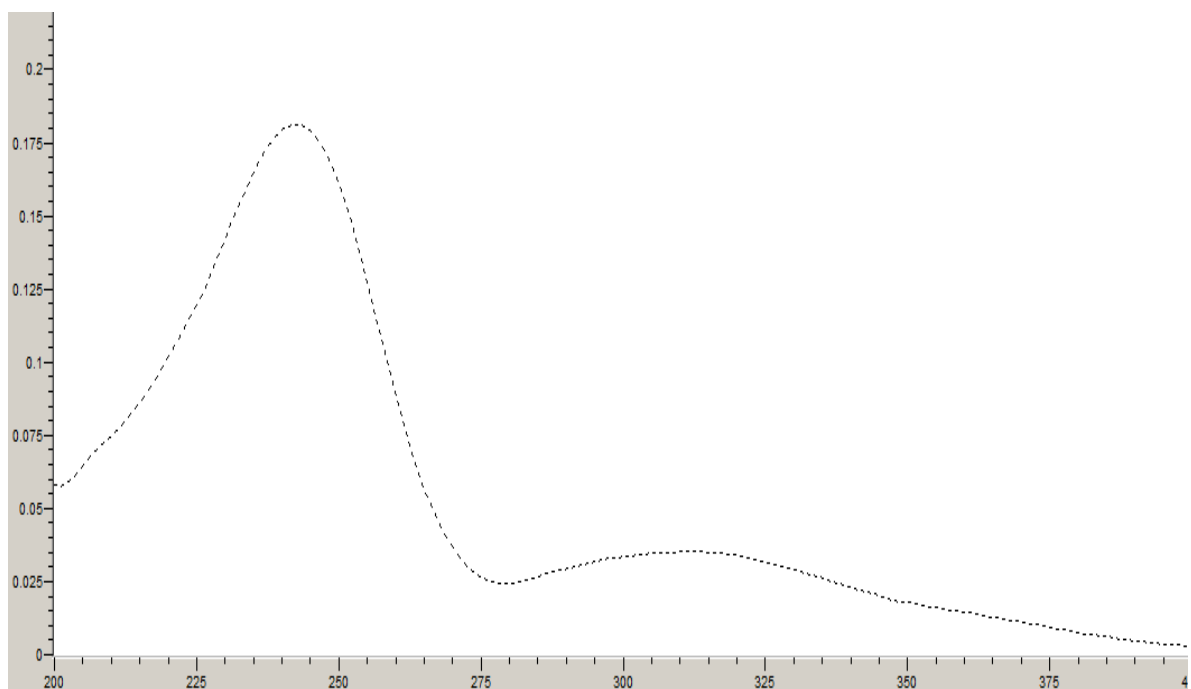
Compuesto 27: no identificado, TR: 32.410



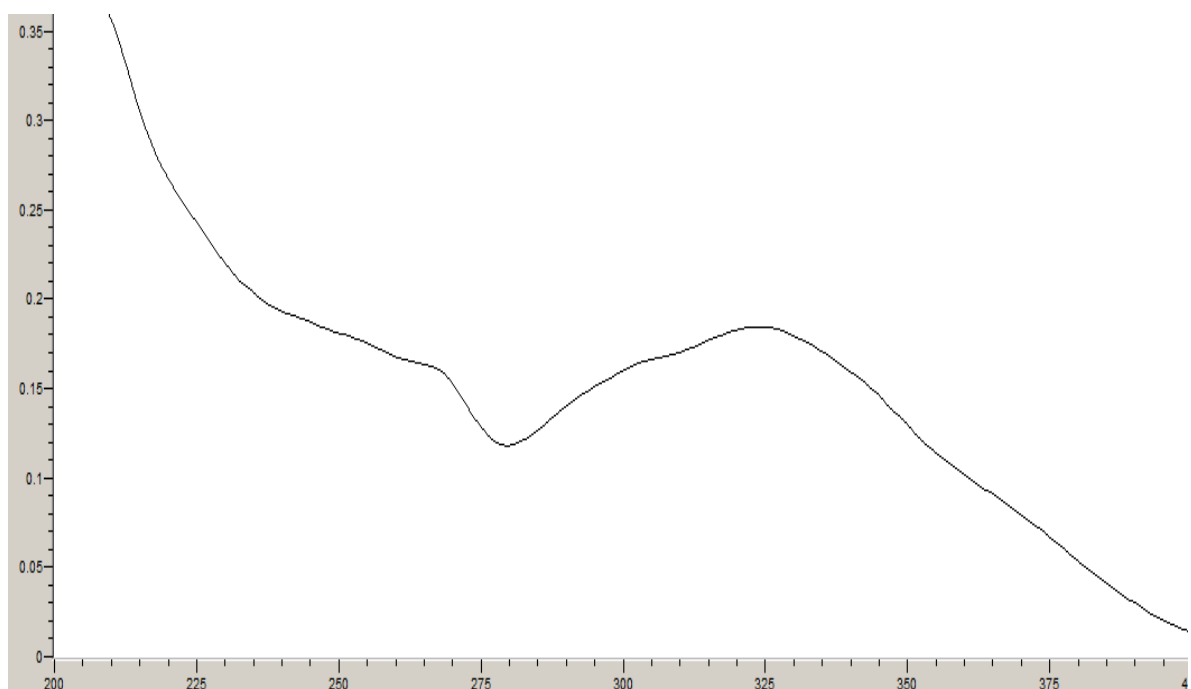
Compuesto 28: derivado de ácido fenólico, TR: 32.123



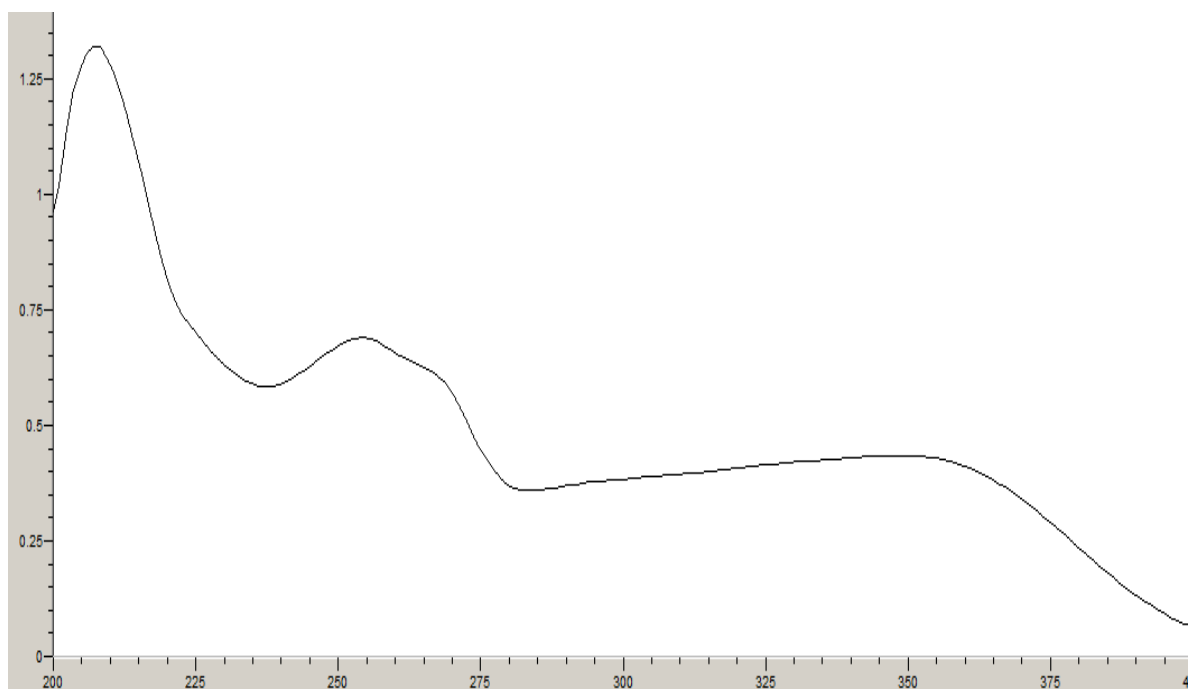
Compuesto 29: no identificado, TR: 32.388



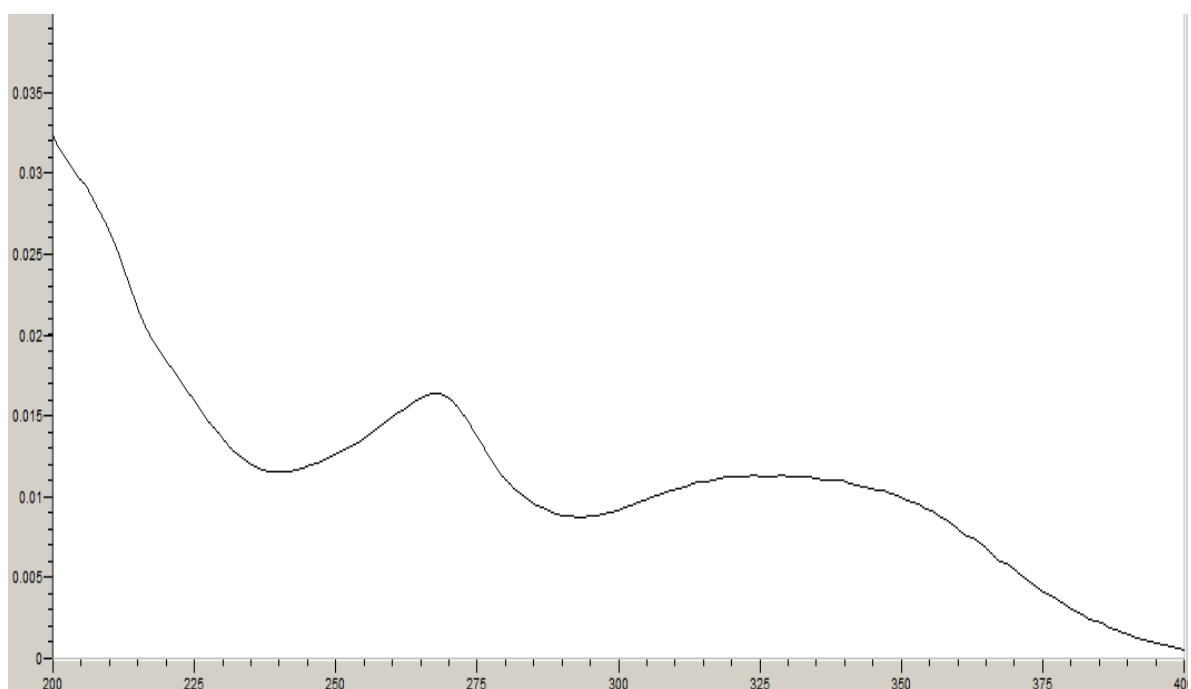
Compuesto 30: dihidroflavonoide, TR: 33.781



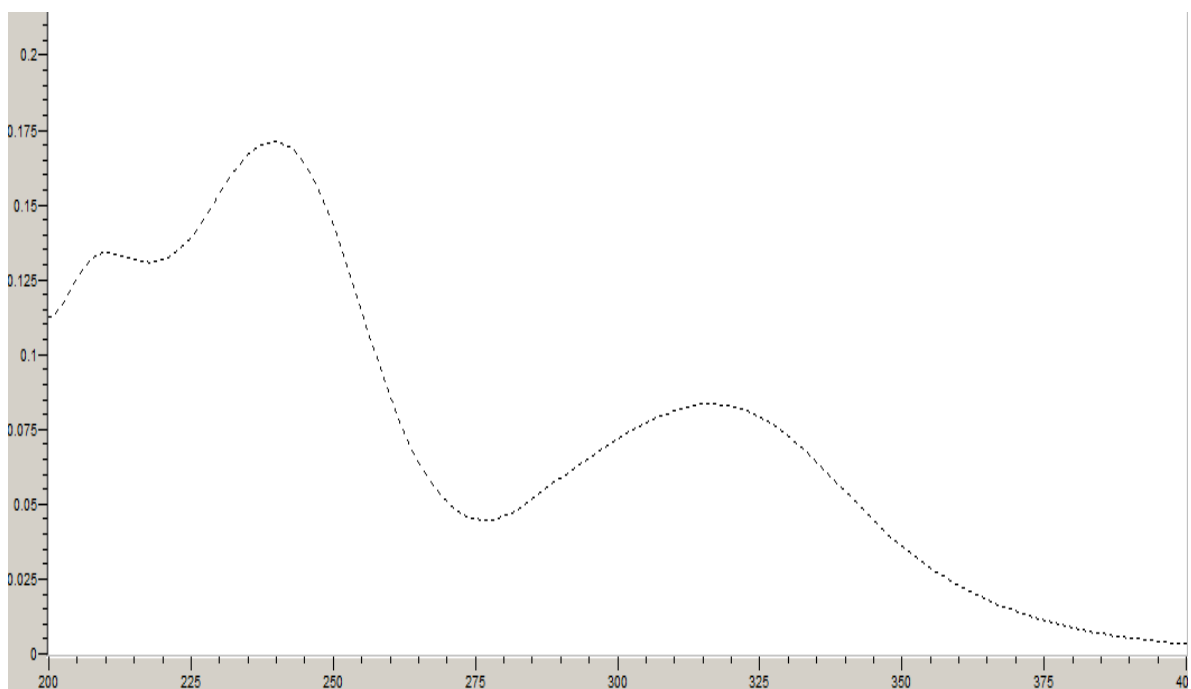
Compuesto 31: flavona glicósido, TR: 33.928



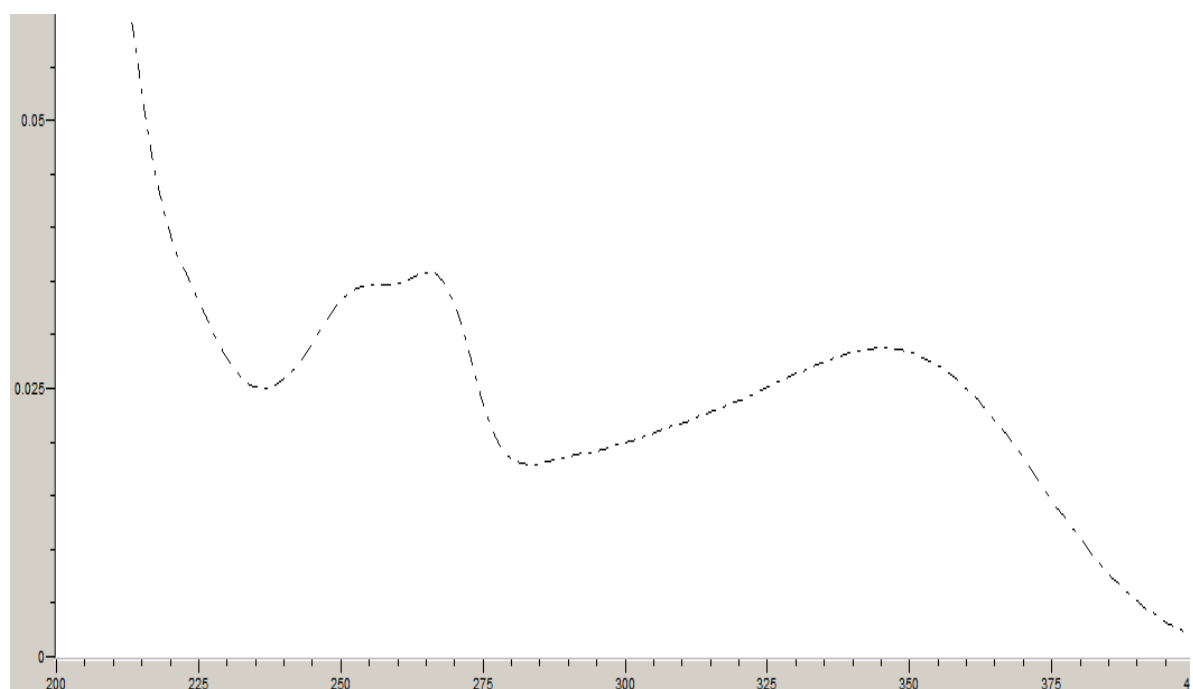
Compuesto 32: flavonol, TR: 34.035



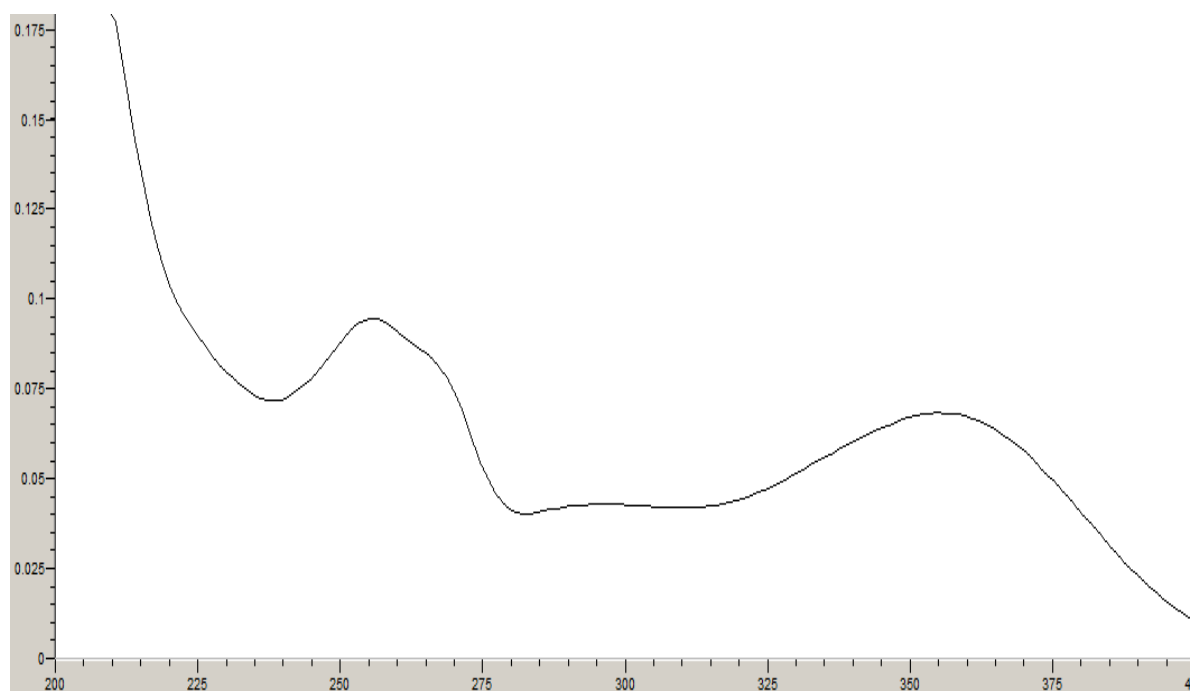
Compuesto 33: flavona, TR: 34.000



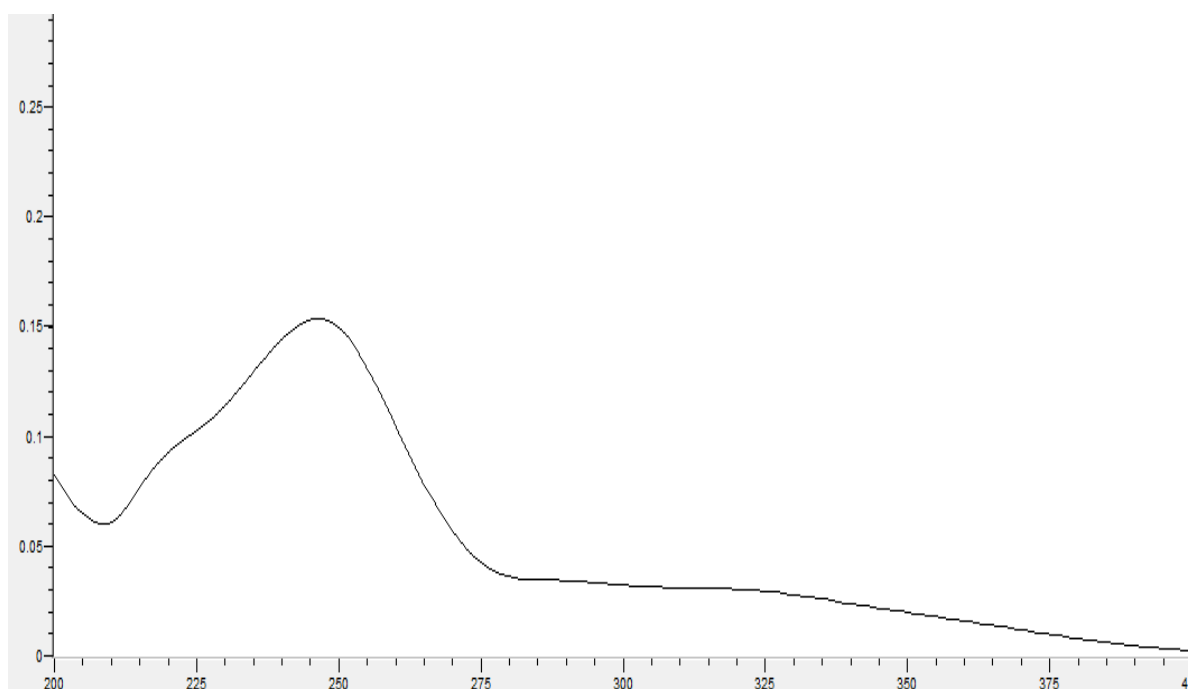
Compuesto 34: flavona, TR: 34.297



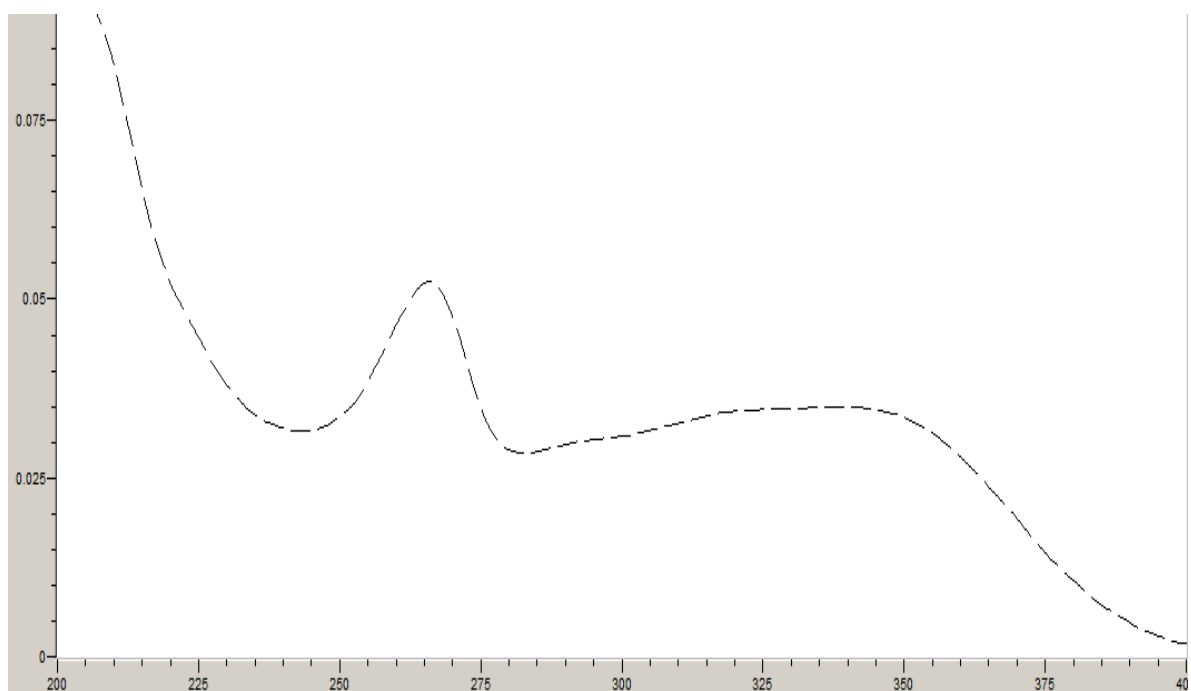
Compuesto 35: derivado glucósido de miricetina, TR: 34.771



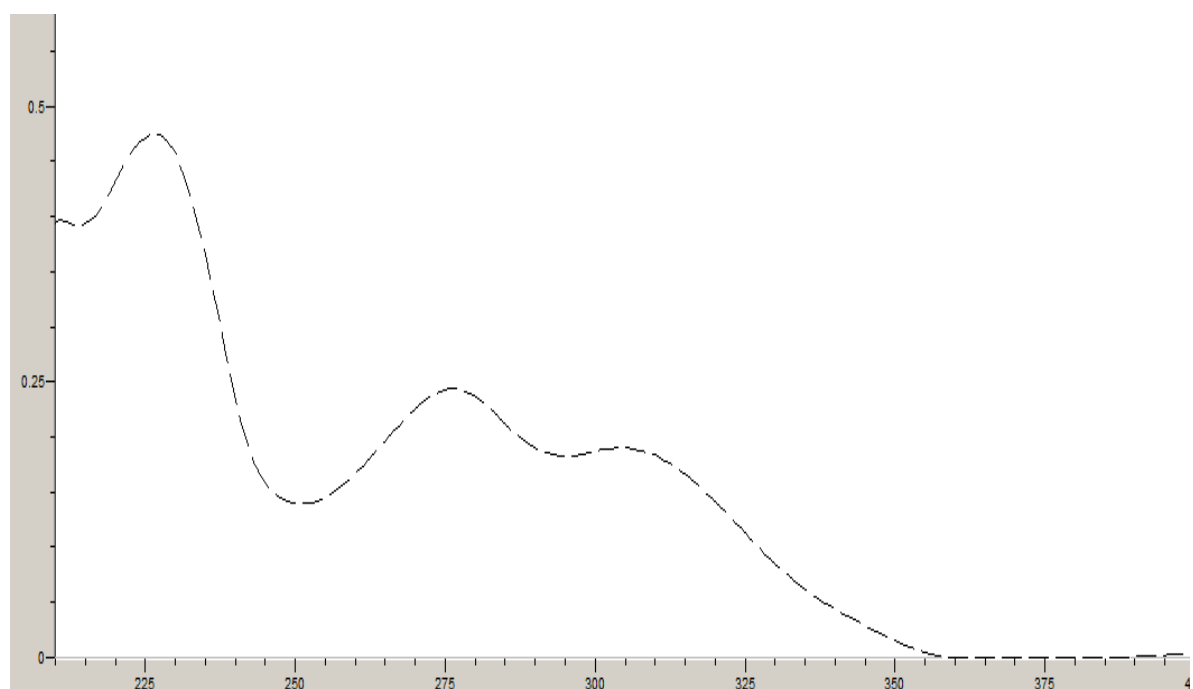
Compuesto 36: derivado glicósido de quercetina, TR: 34.822



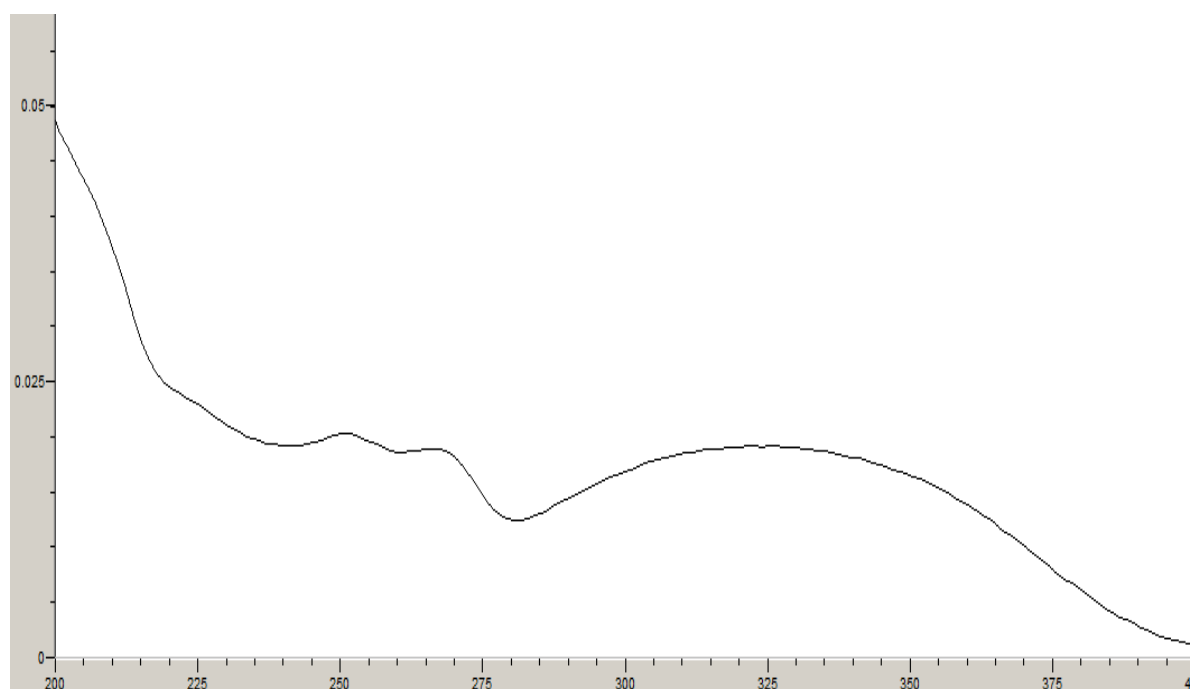
Compuesto 37: no identificado, TR: 34.666



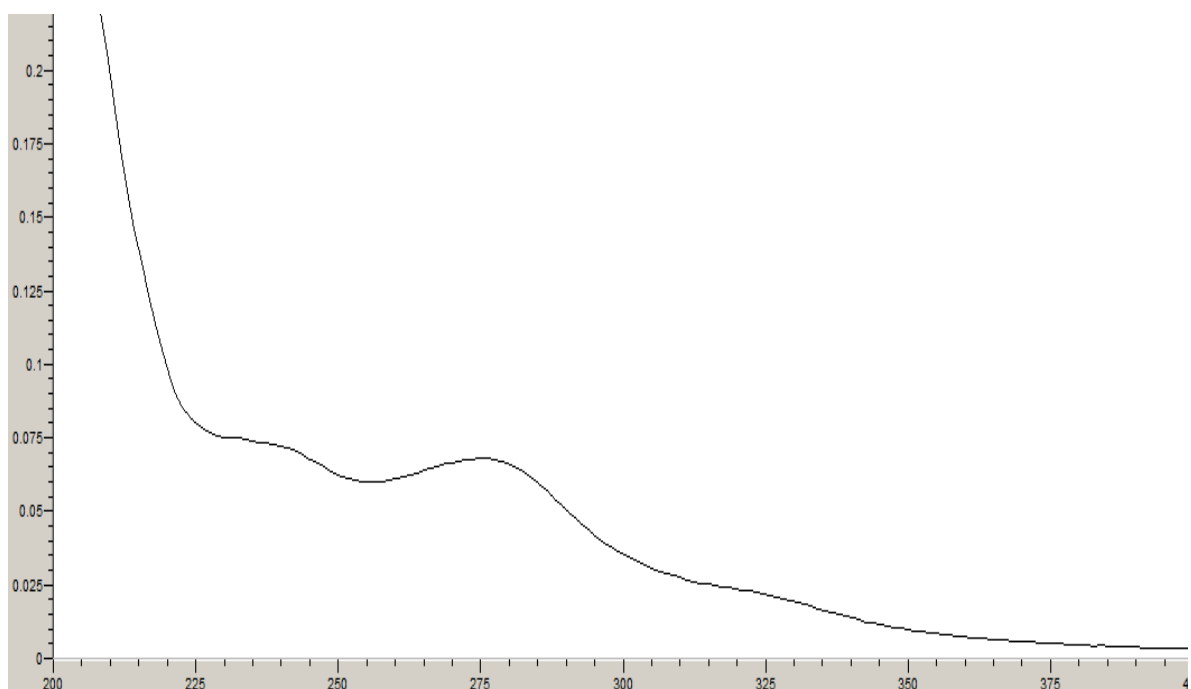
Compuesto 38: derivado glicósido de canferol, TR: 35.467



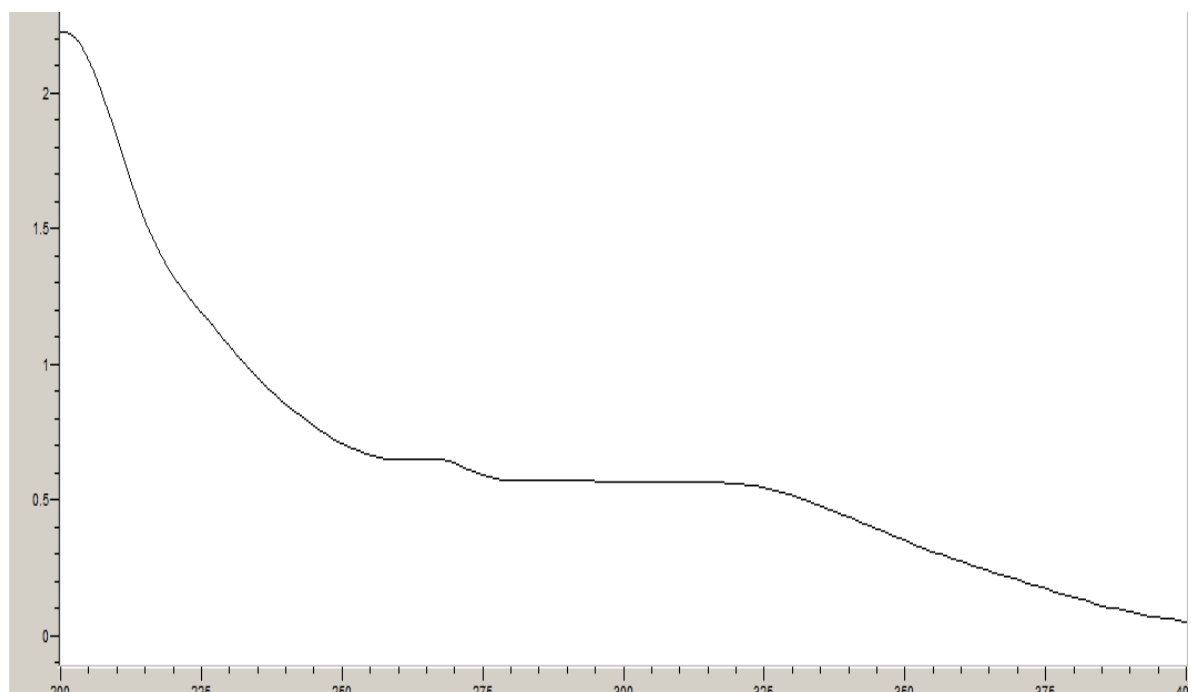
Compuesto 39: flavona, TR: 35.189



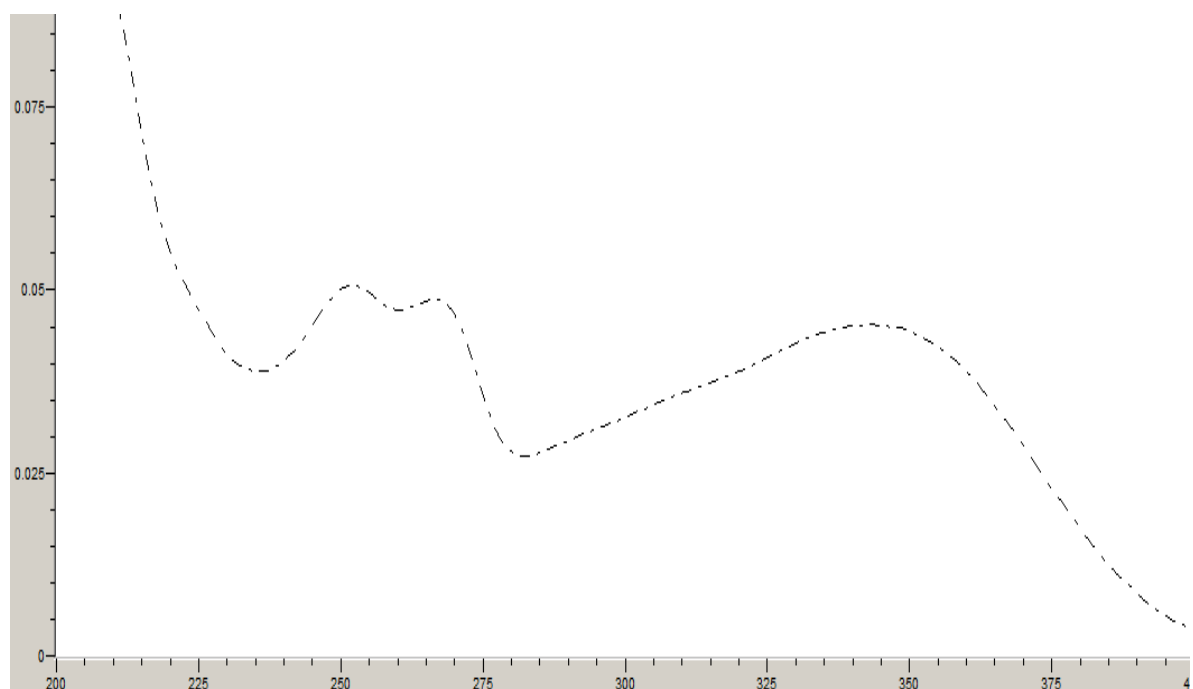
Compuesto 40: flavona, TR: 35.774



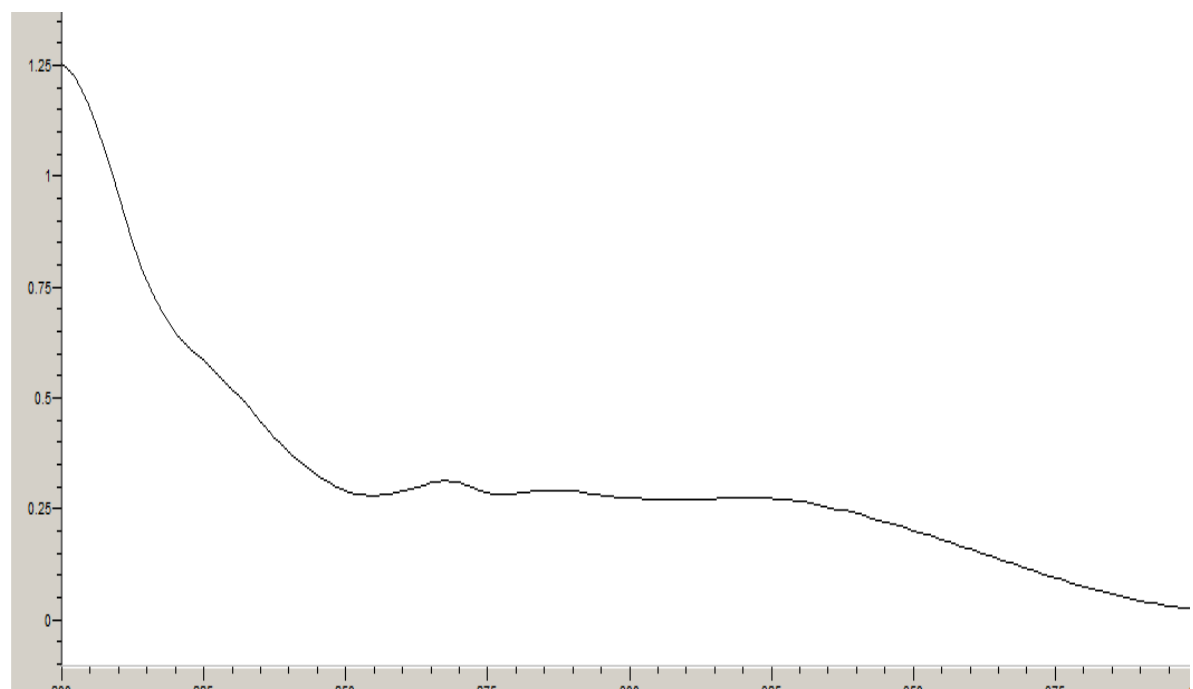
Compuesto 41: no identificado, TR: 35.901



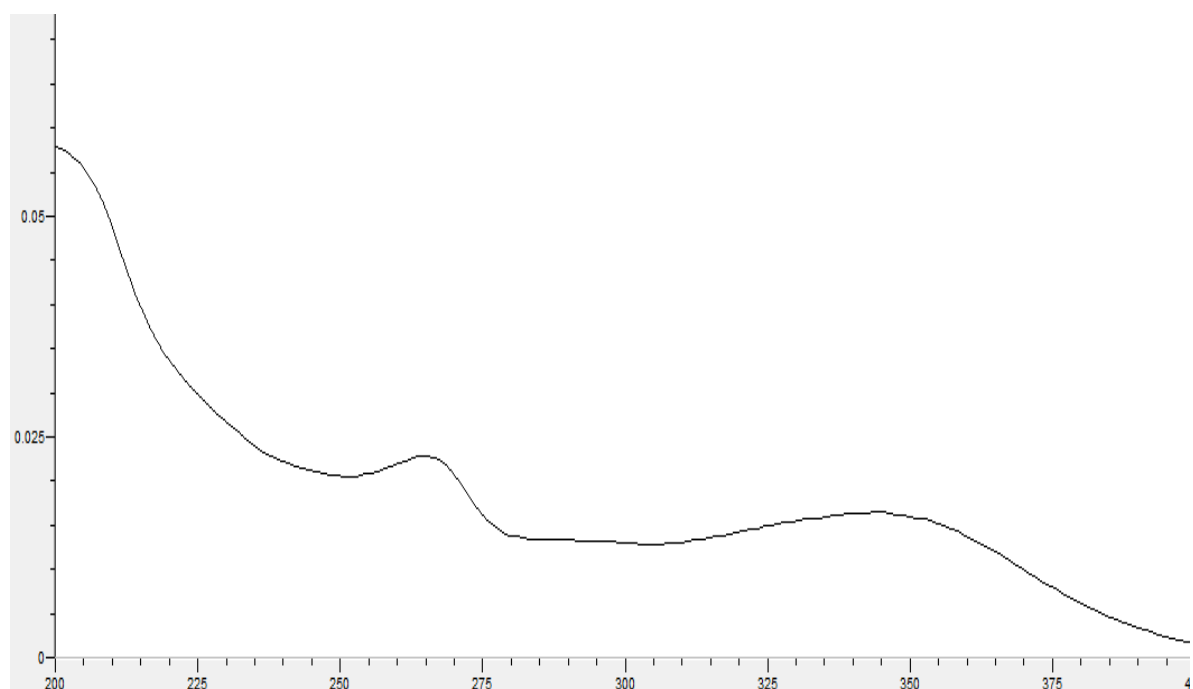
Compuesto 42: no identificado, TR: 36.174



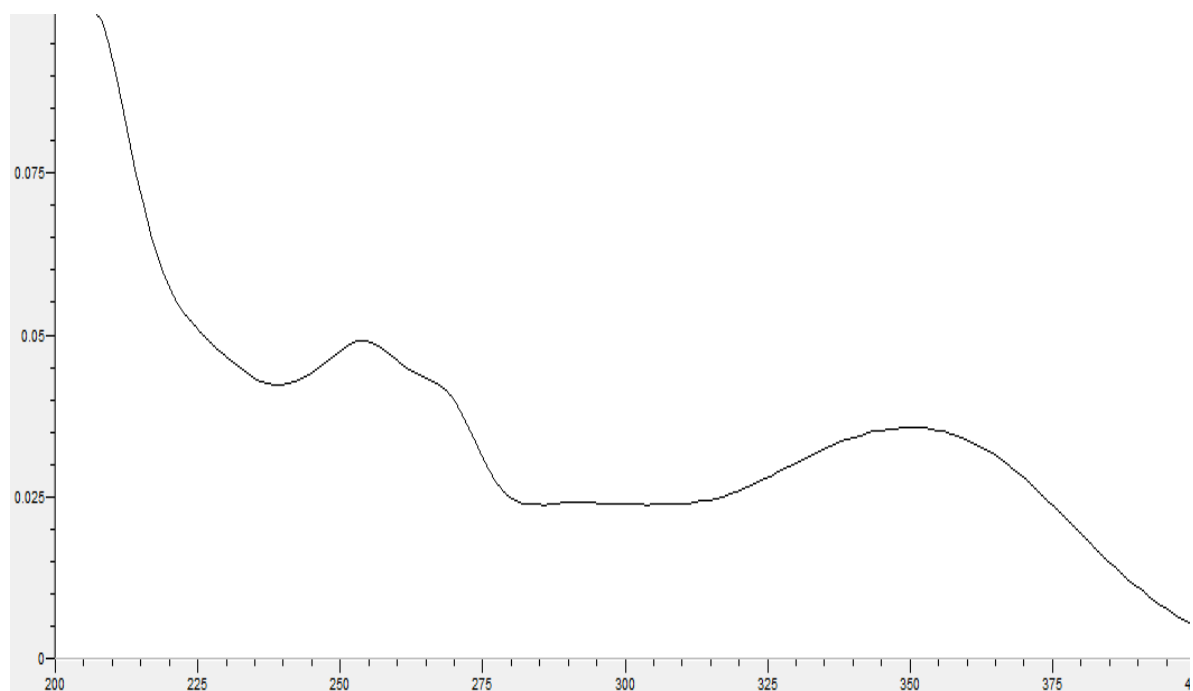
Compuesto 43: derivado glicósido de luteolina, TR: 36.238



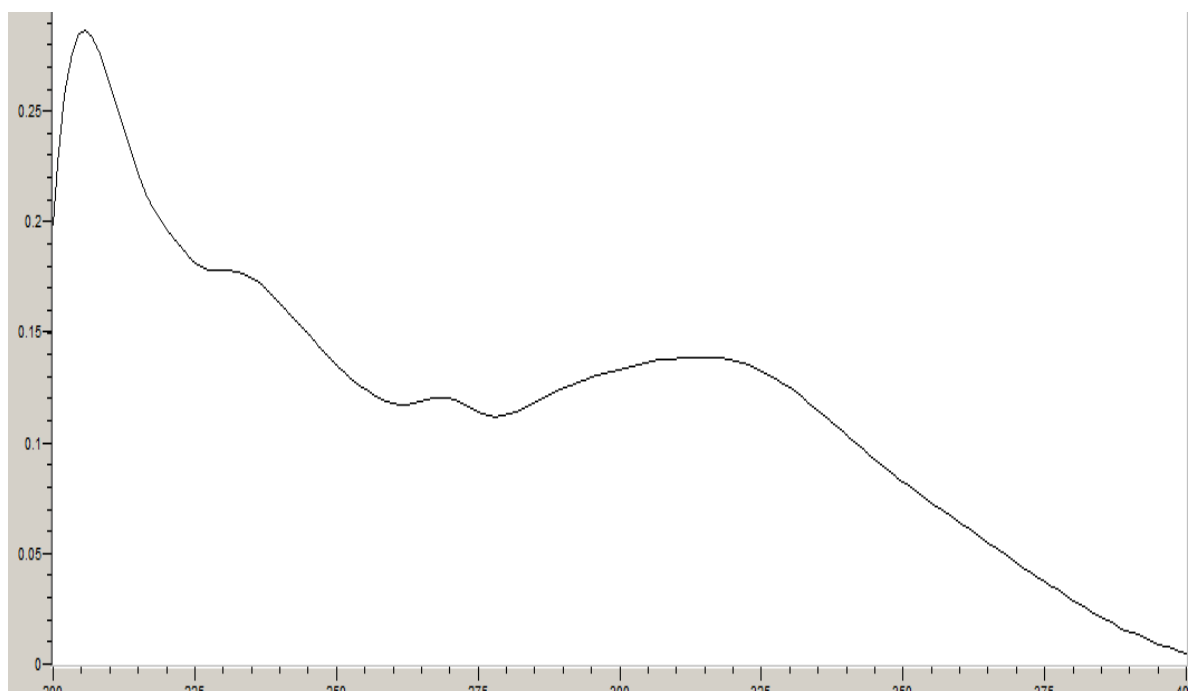
Compuesto 44: no identificado, TR: 36.500



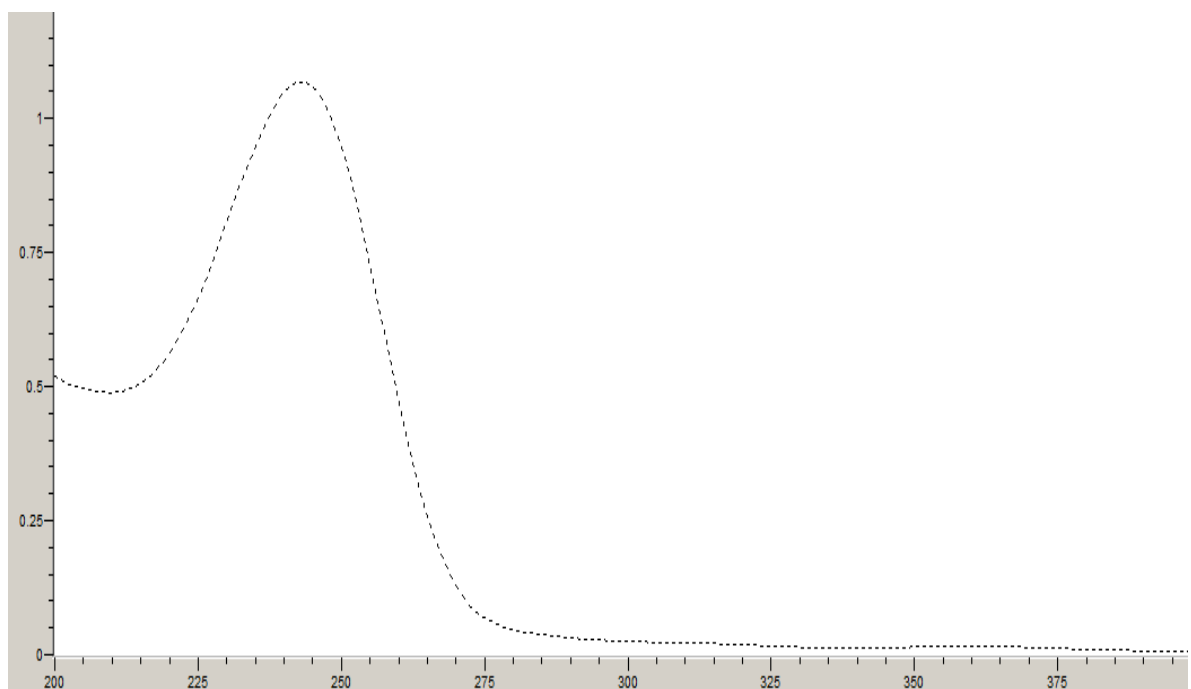
Compuesto 45: derivado glicósido de canferol, TR: 36.670



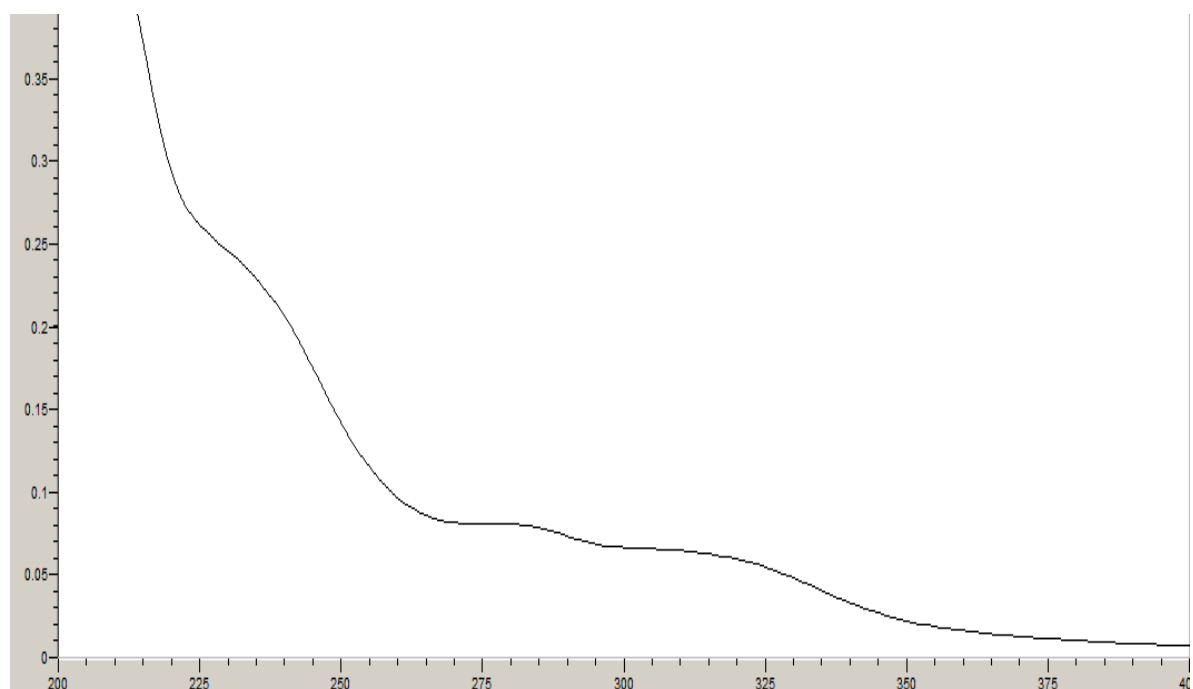
Compuesto 46: derivado glicósido de quercetina, TR: 37.206



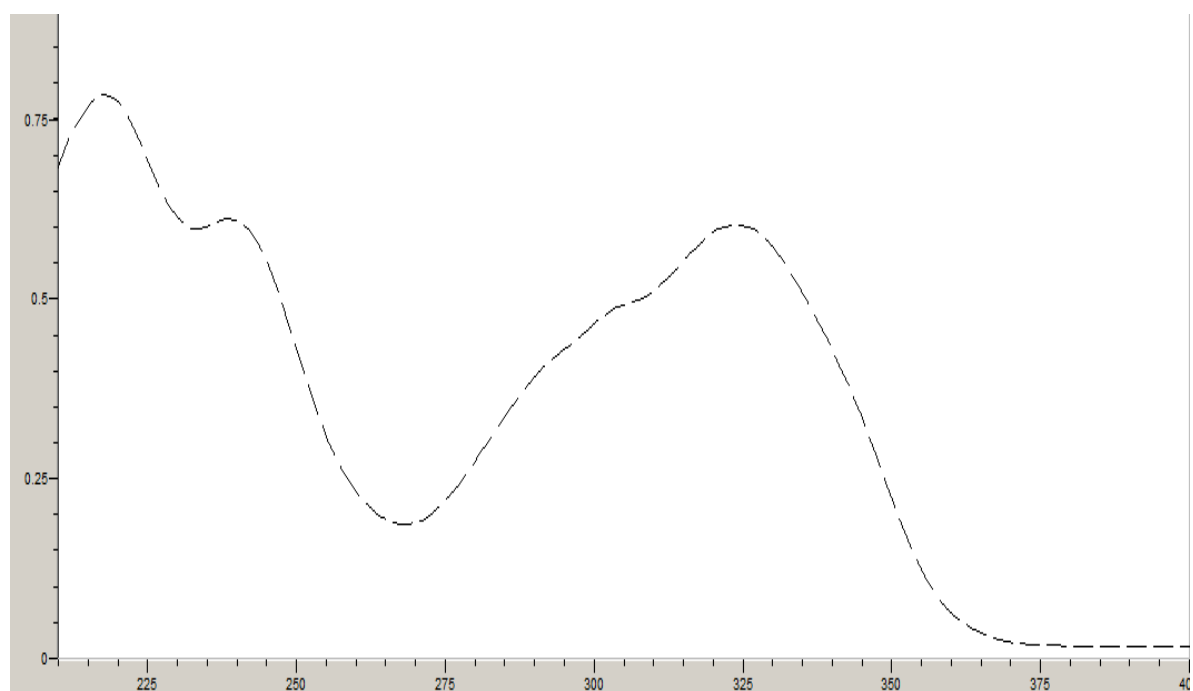
Compuesto 47: no identificado, TR: 37.398



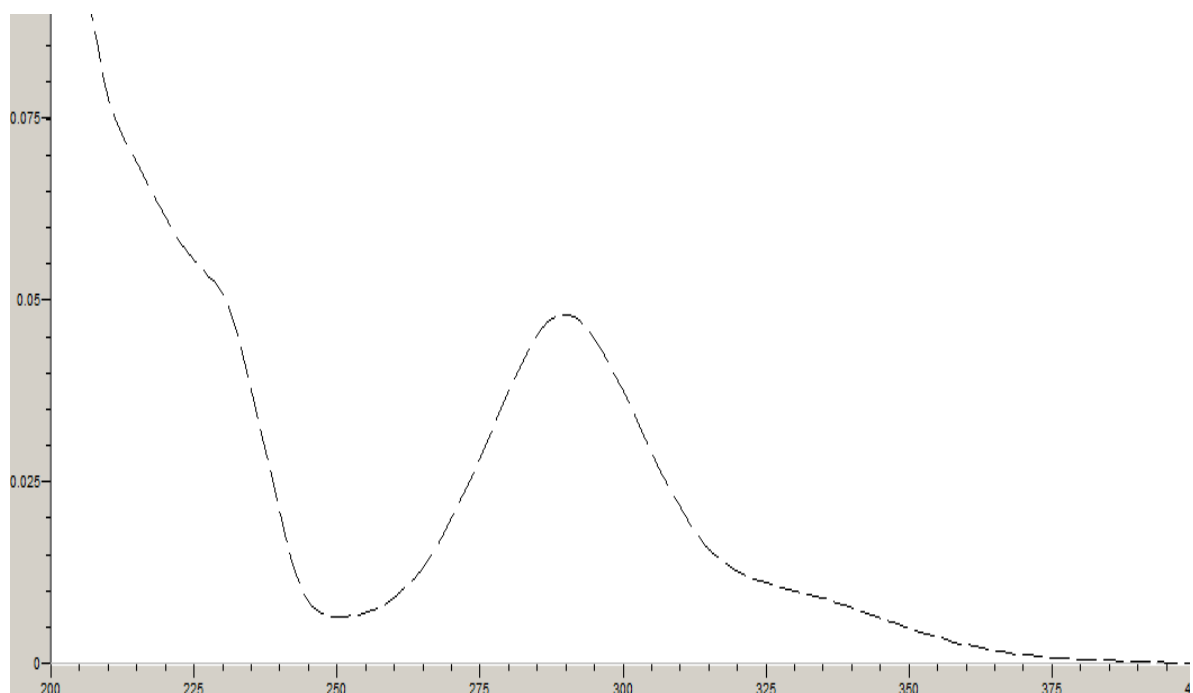
Compuesto 48: derivado de ácido benzoico, TR: 37.565



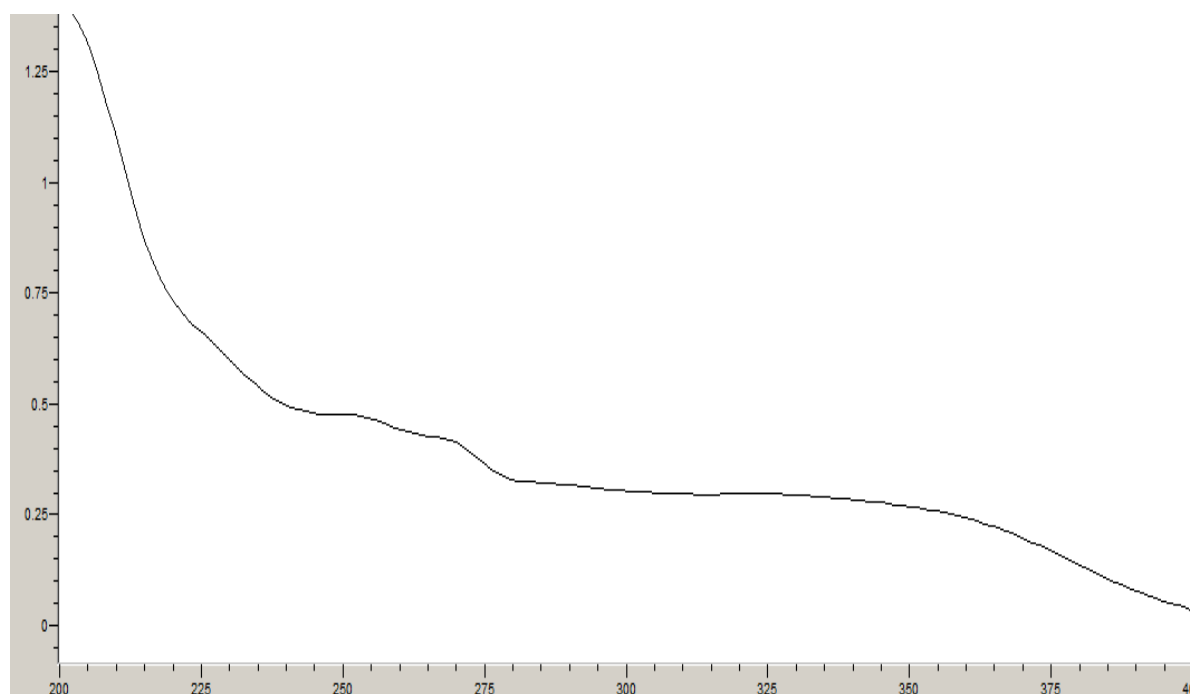
Compuesto 49: no identificado, TR: 37.829



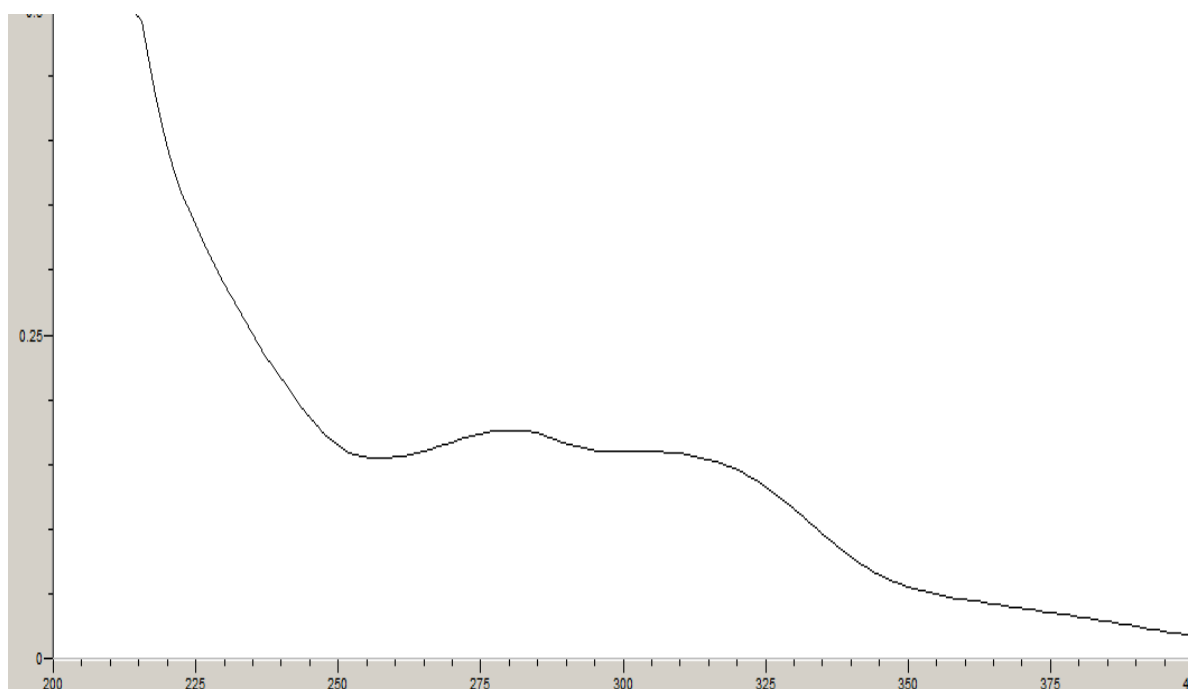
Compuesto 50: ácido hidroxibenzoico, TR: 38.269



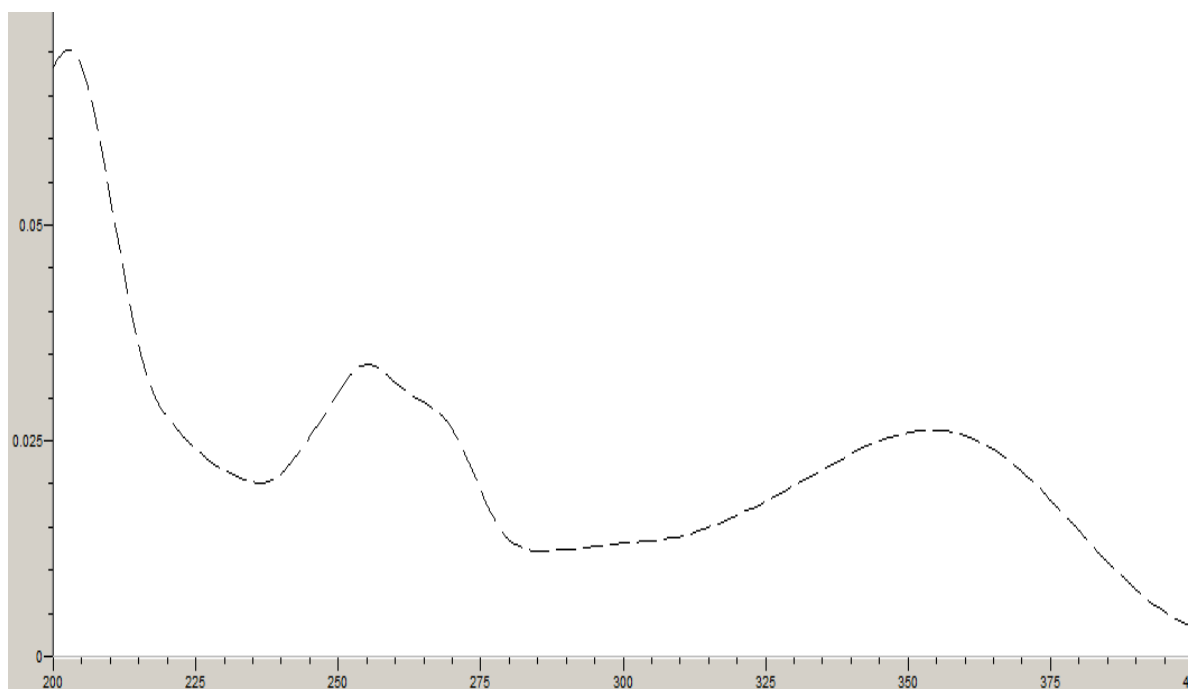
Compuesto 51: dihidroflavonoide, TR: 38.172



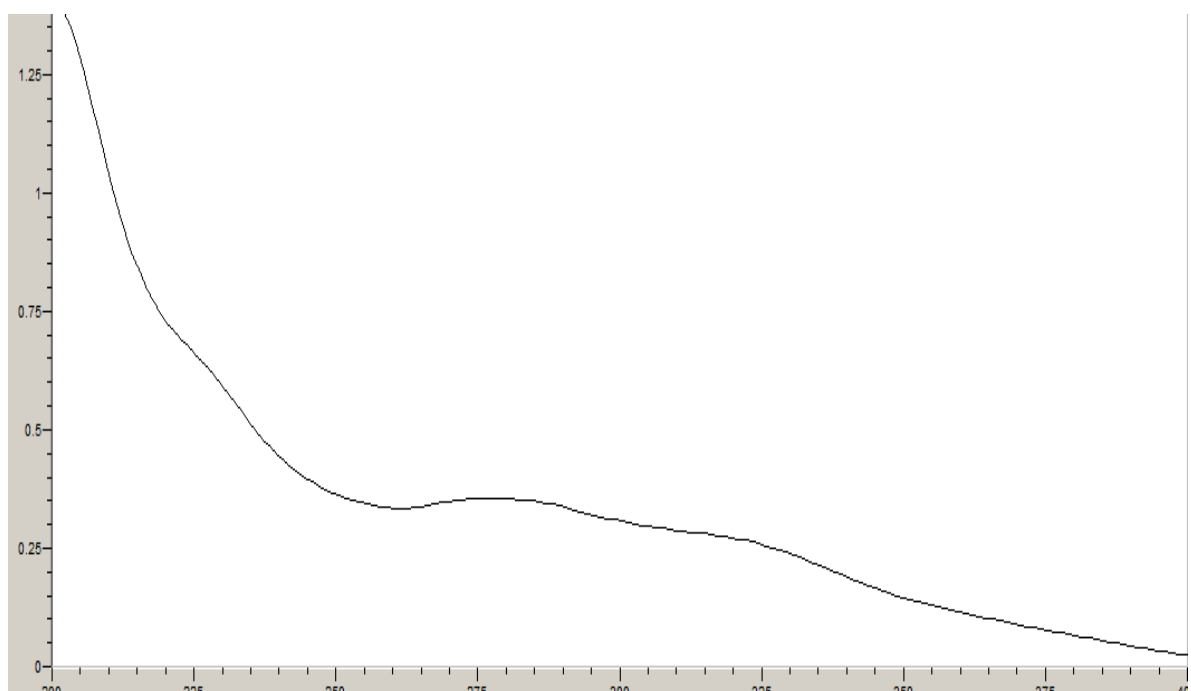
Compuesto 52: no identificado, TR: 39.340



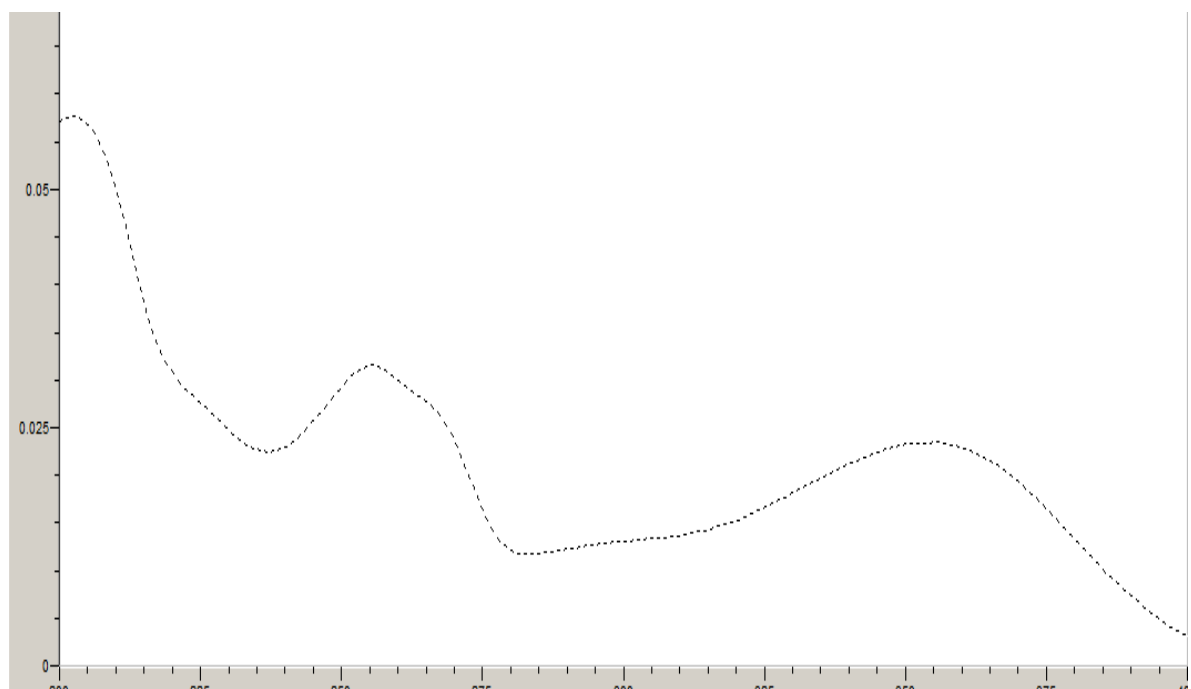
Compuesto 53: no identificado, TR: 38.907



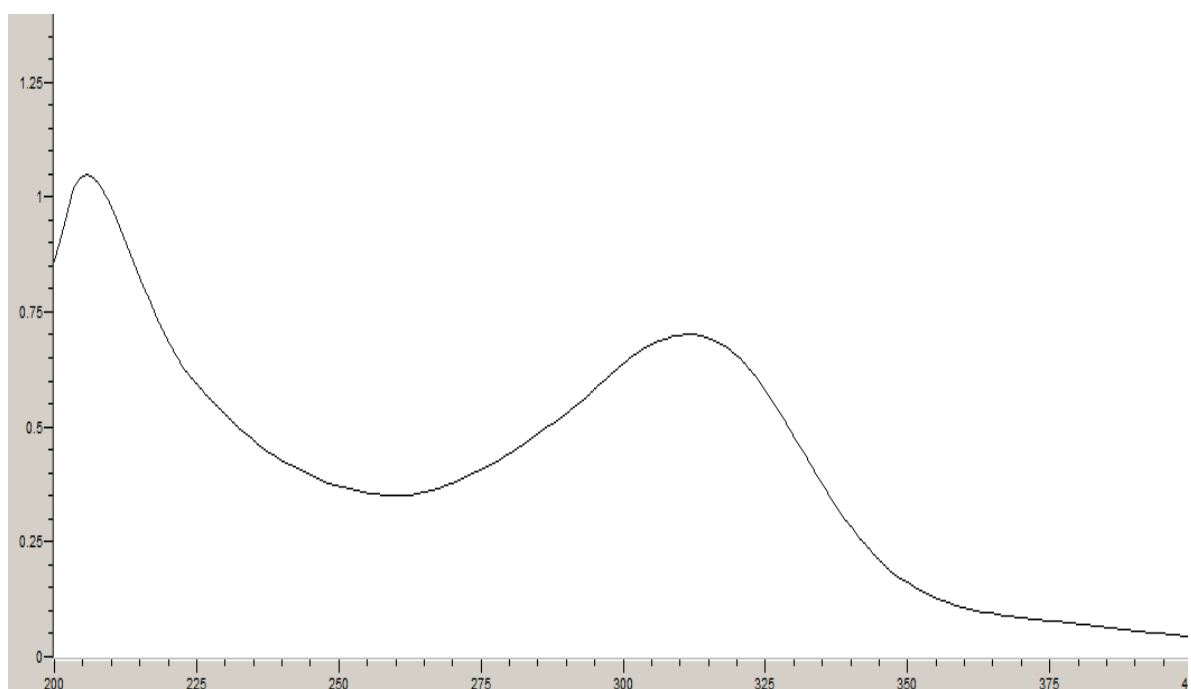
Compuesto 54: derivado glicósido de quercetina, TR: 39.164



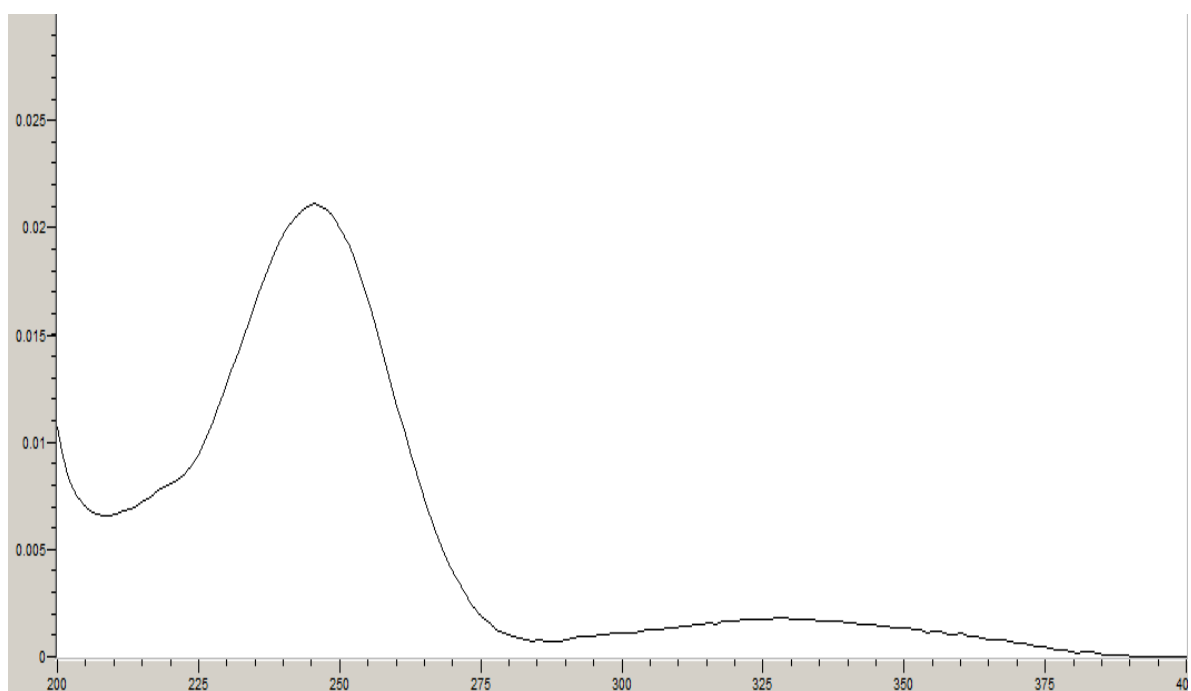
Compuesto 55: no identificado, TR: 39.700



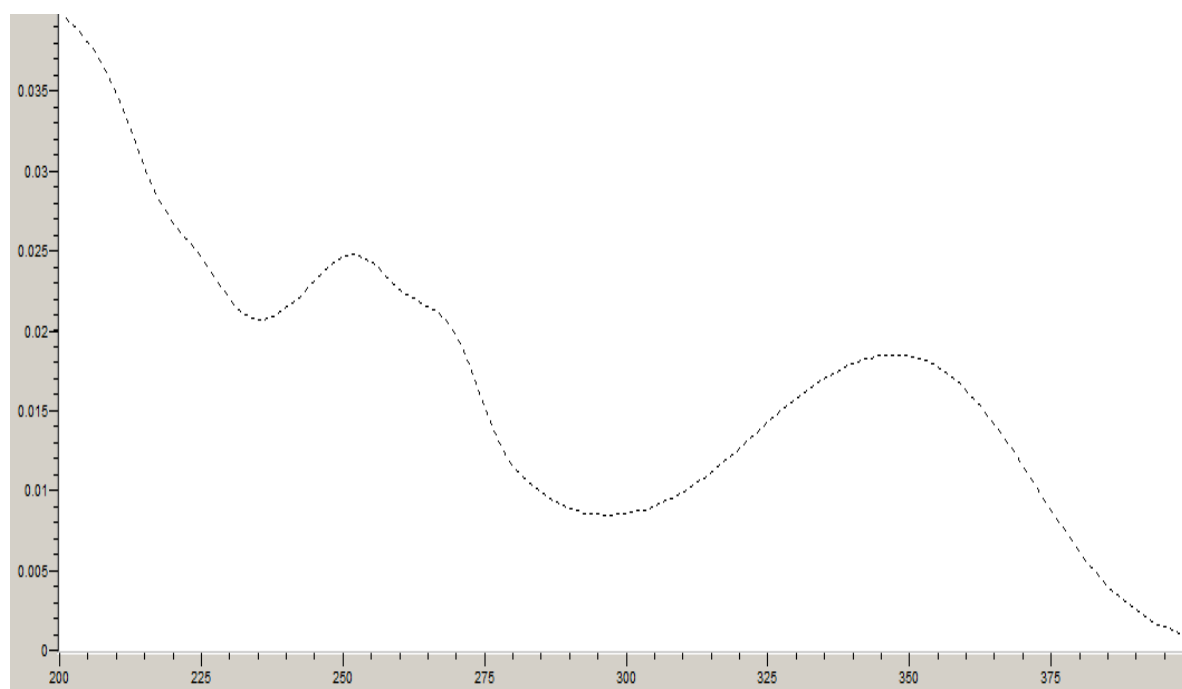
Compuesto 56: derivado glicósido de quercetina; TR: 39.180



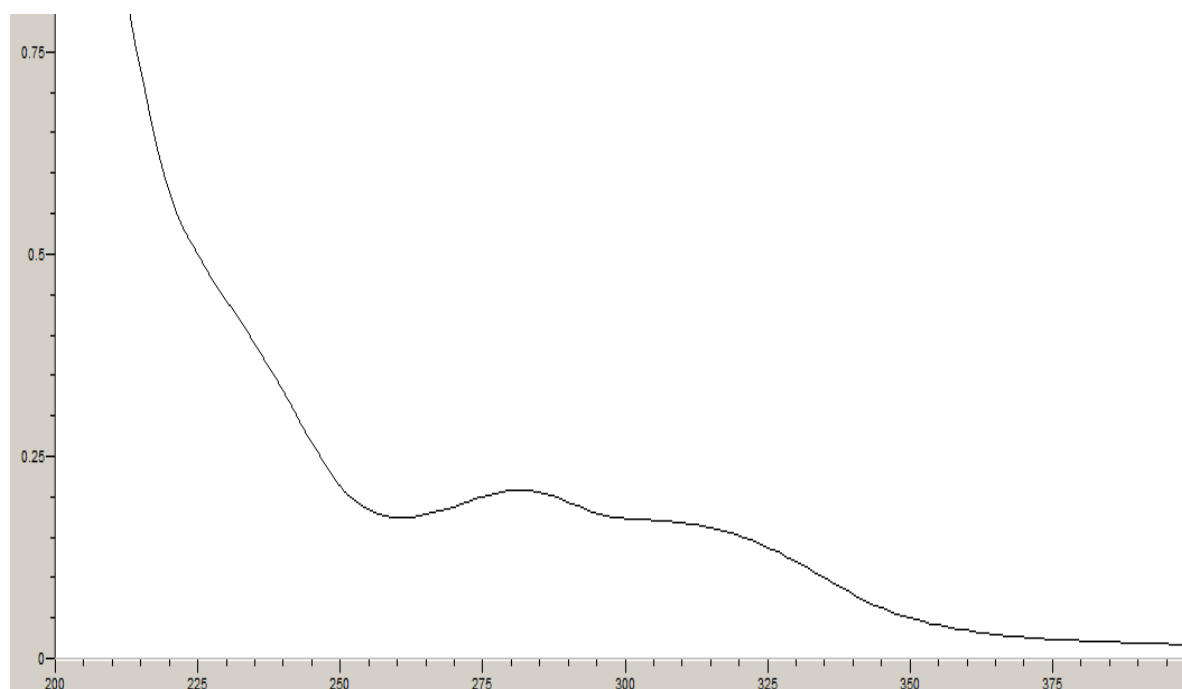
Compuesto 57: flavona, TR: 40.264



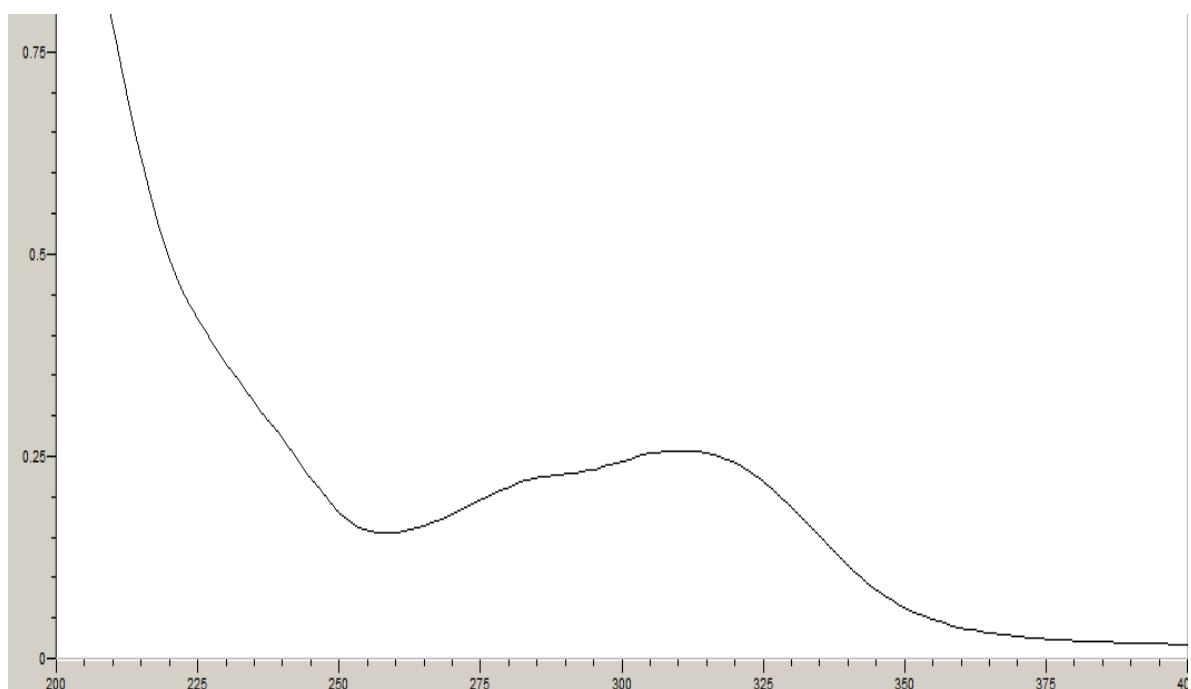
Compuesto 58: ácido fenólico, TR: 40.875



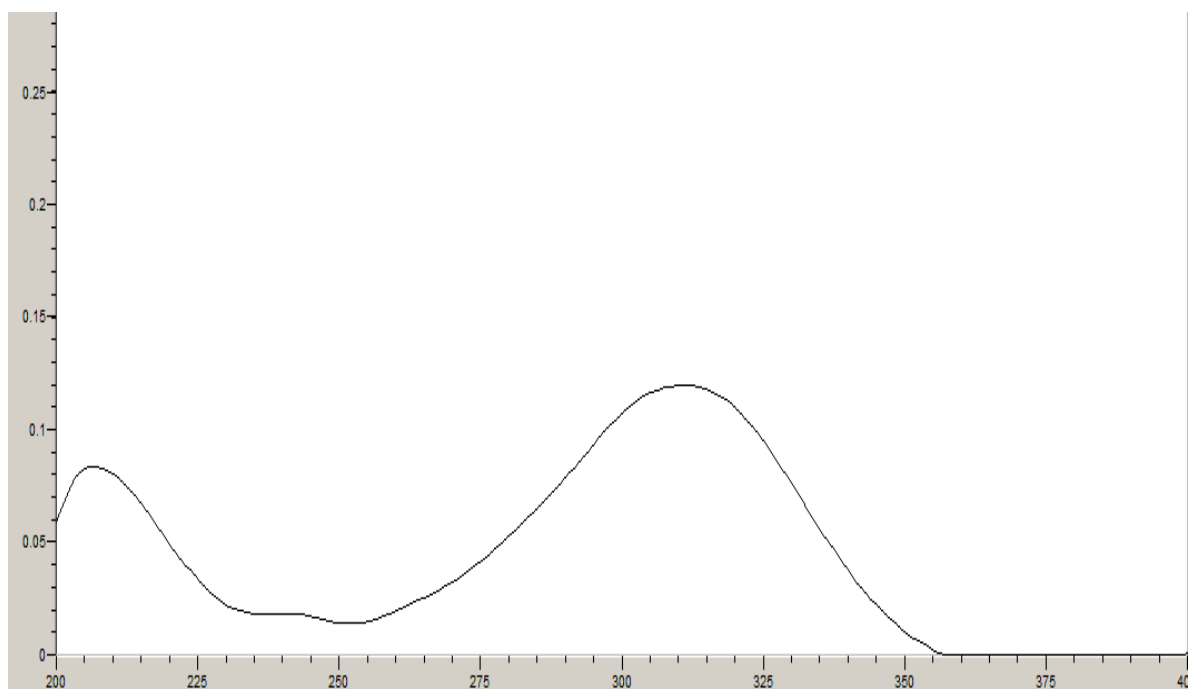
Compuesto 59: derivado glucósido de quercetina, TR: 40.772



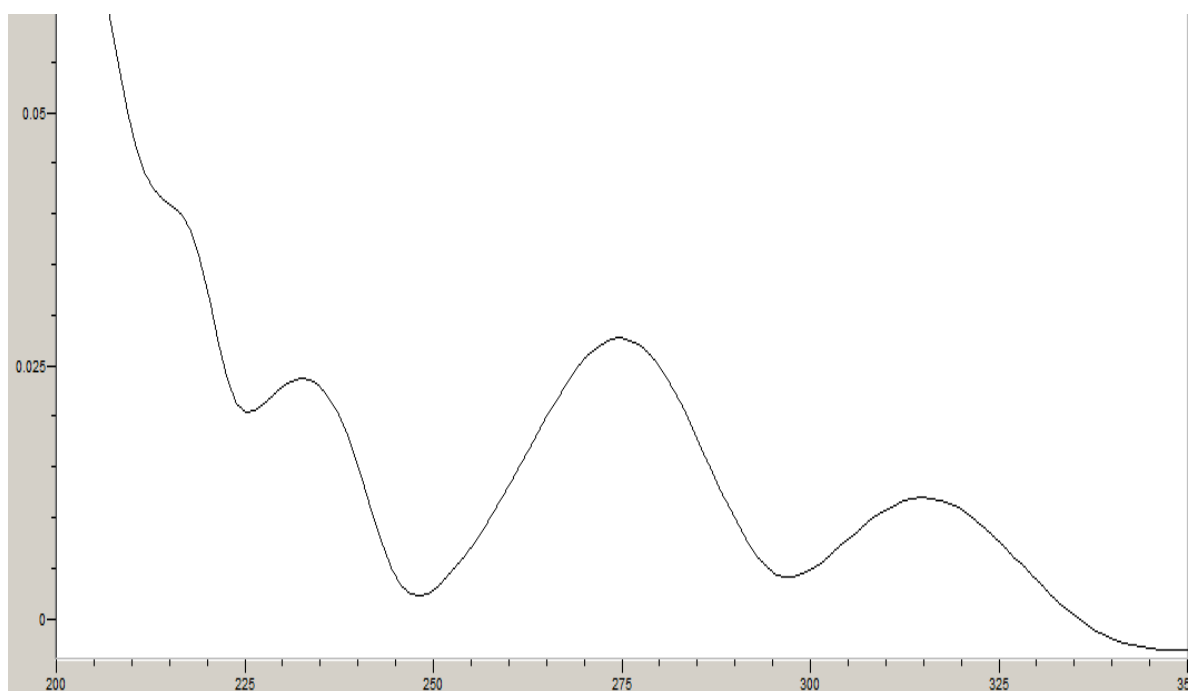
Compuesto 60: no identificado, TR: 41.085



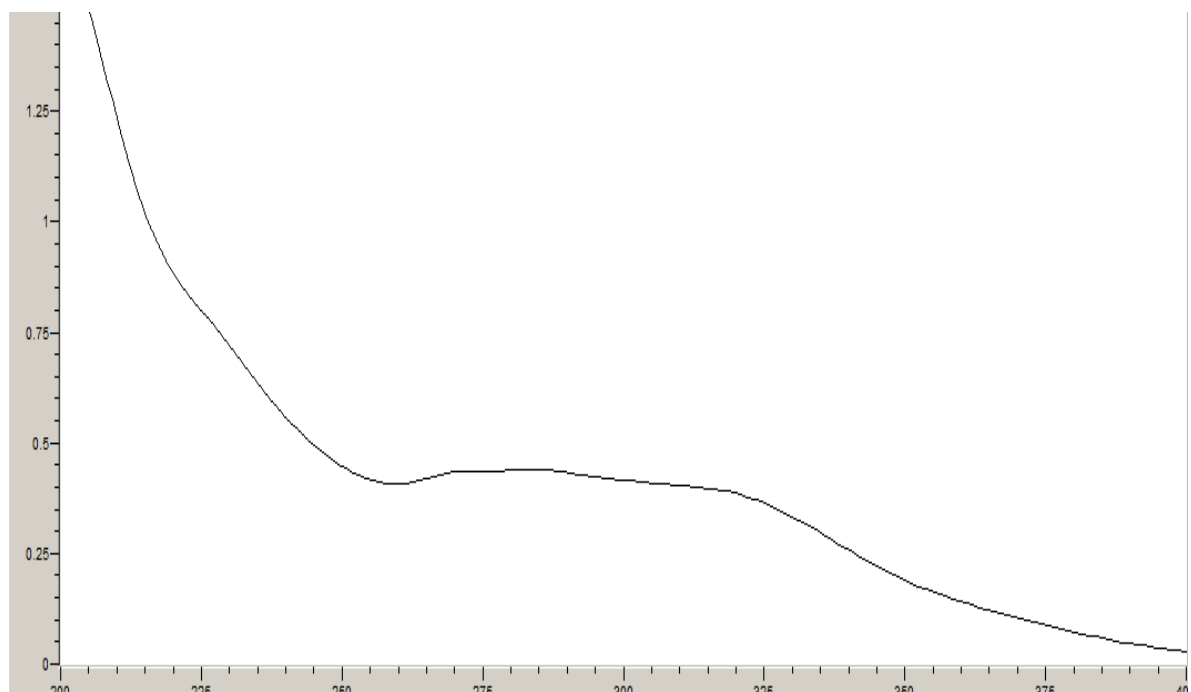
Compuesto 61: ácido fenólico, TR: 42.566



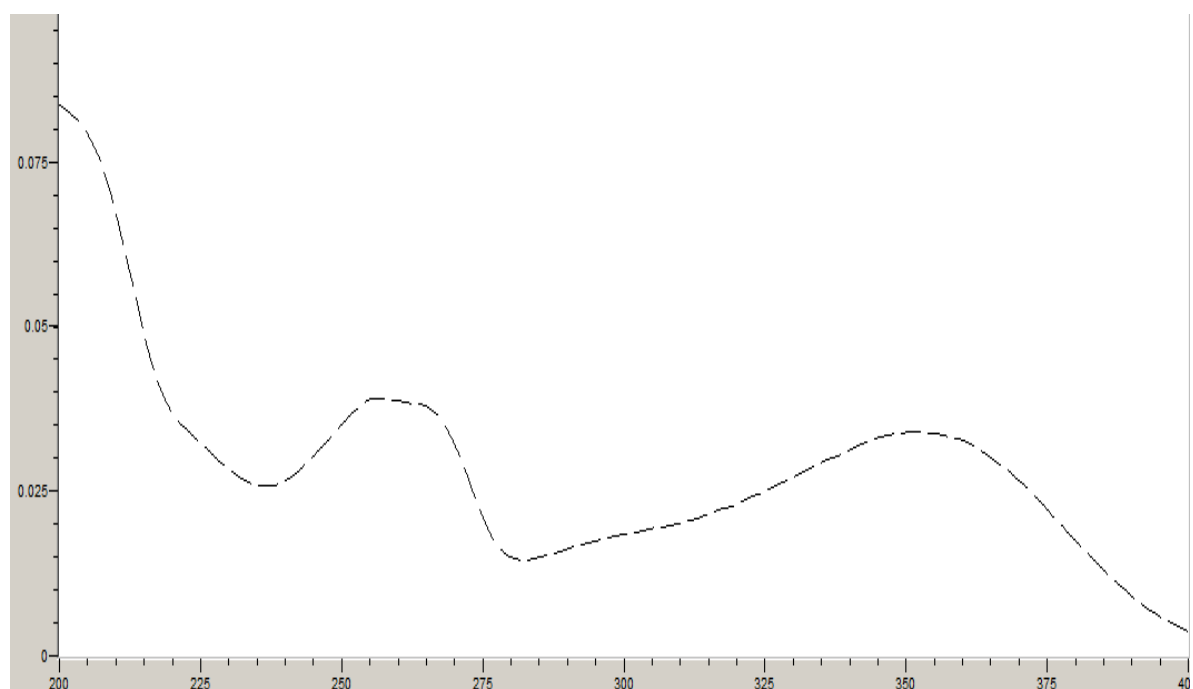
Compuesto 62: ácido fenólico, TR: 42.530



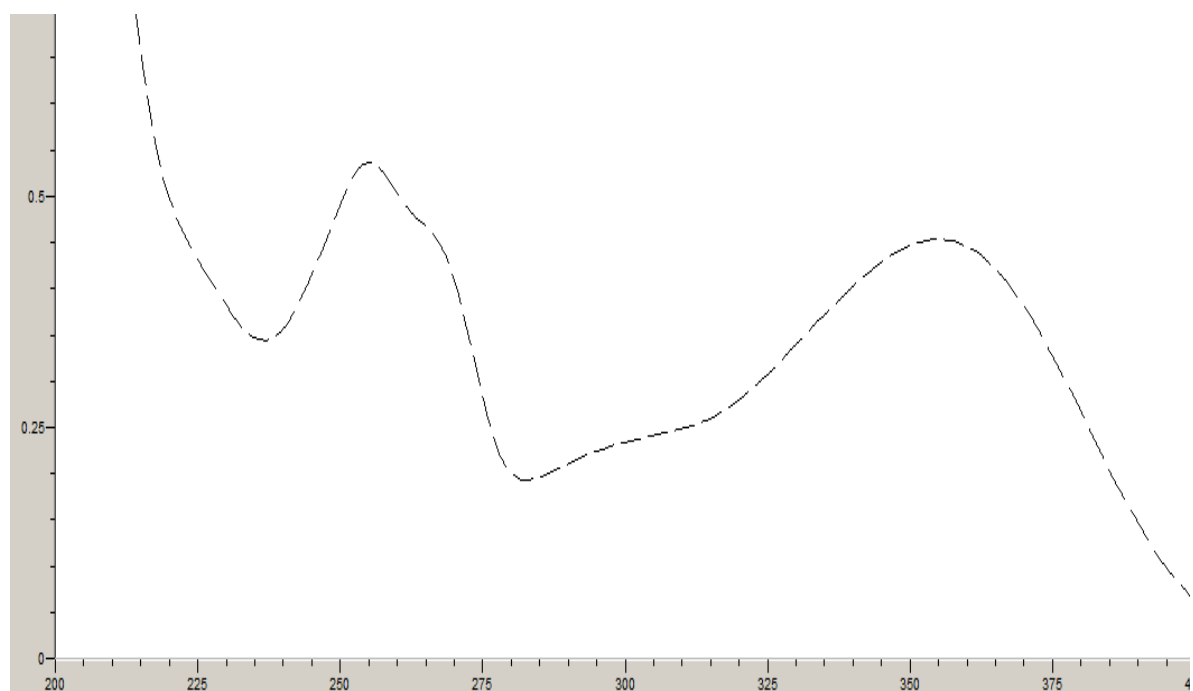
Compuesto 63: flavanona, TR: 42.618



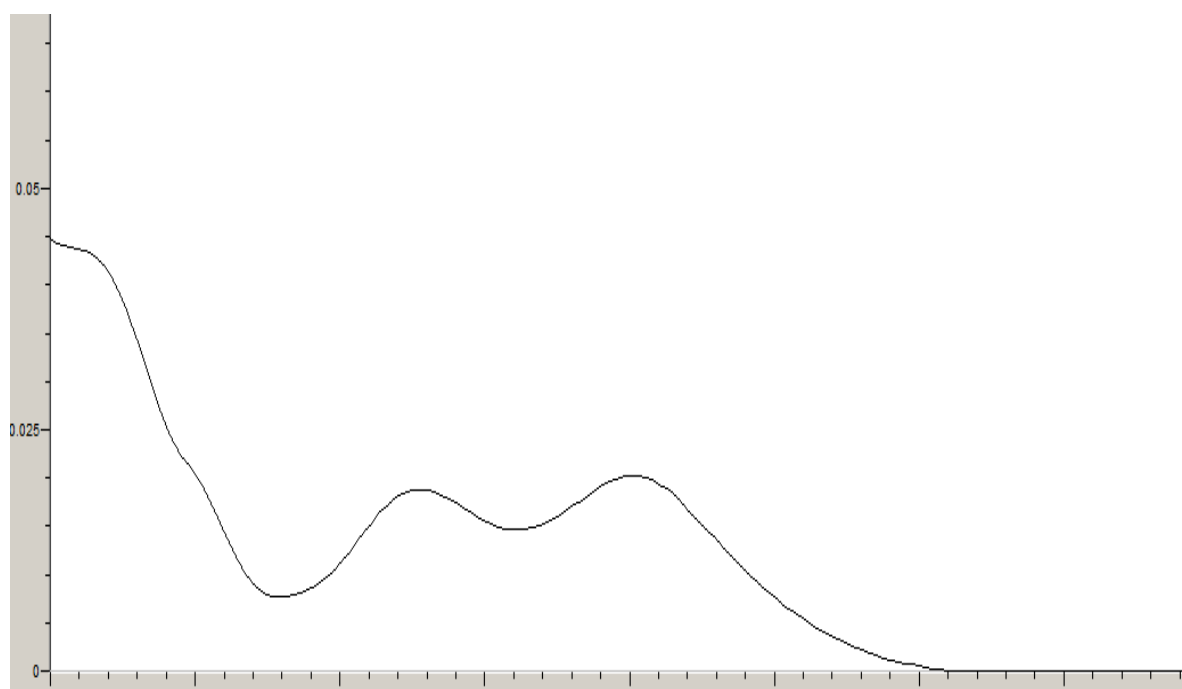
Compuesto 64: no identificado, TR: 42.936



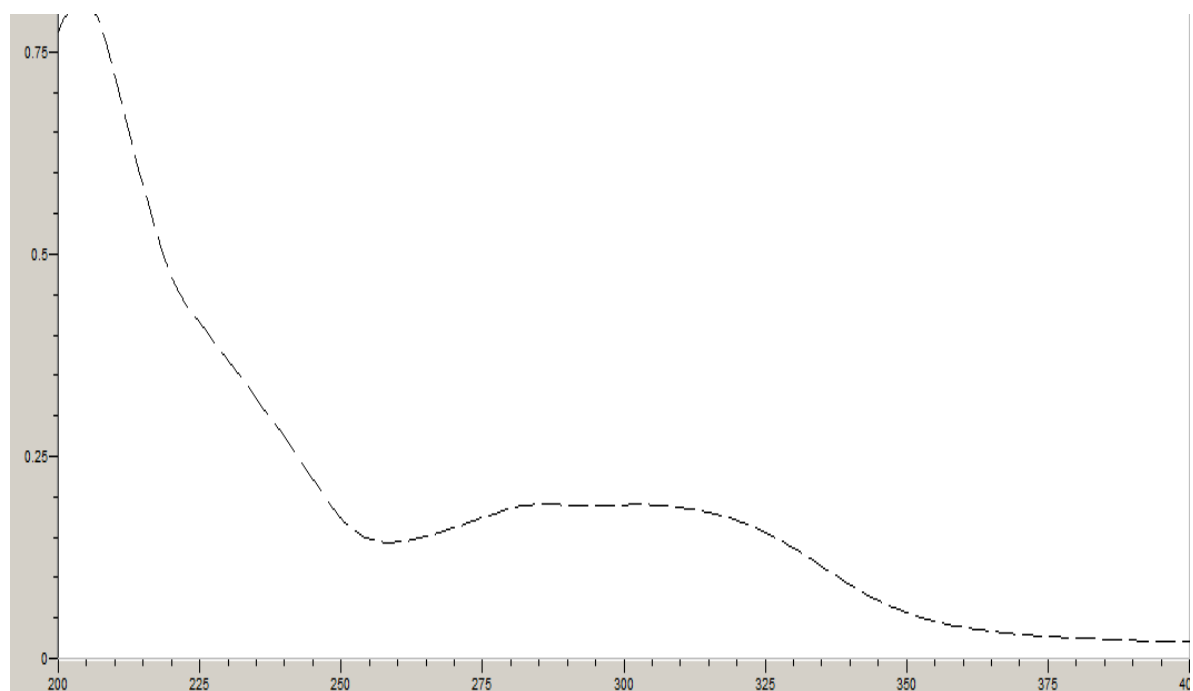
Compuesto 65: miricetina-3-O-galactósido, TR: 42.923



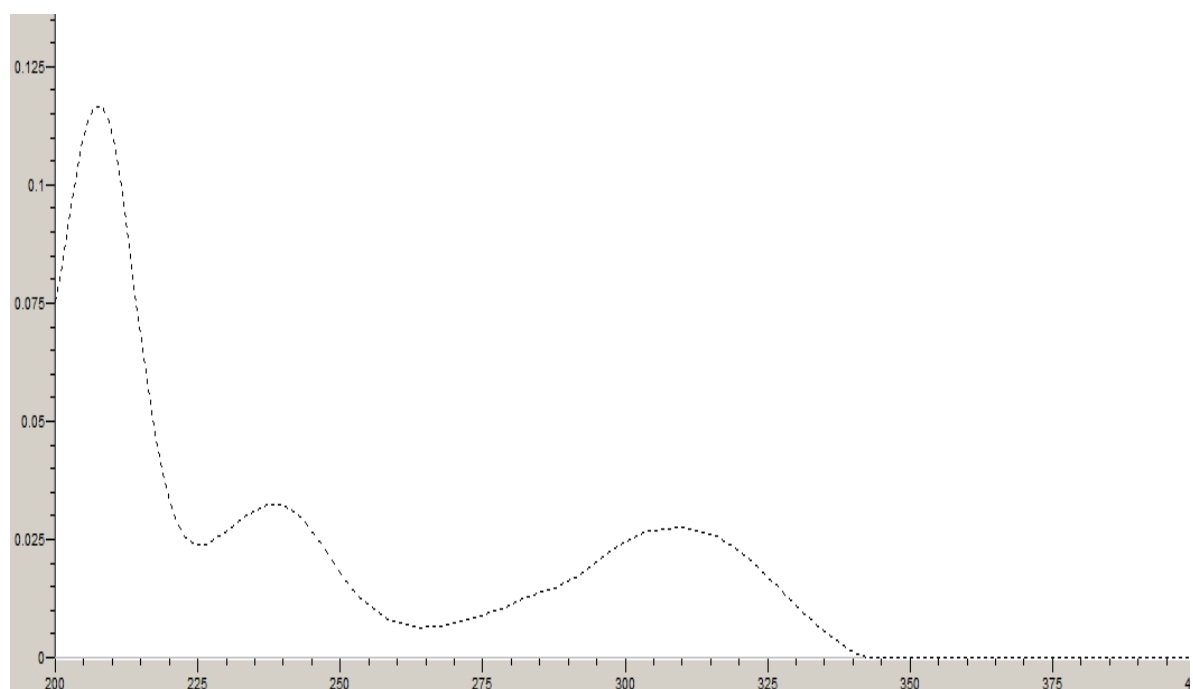
Compuesto 66: isoramnetina-3-O-[ramno(1-6)glucósido], TR: 42.641



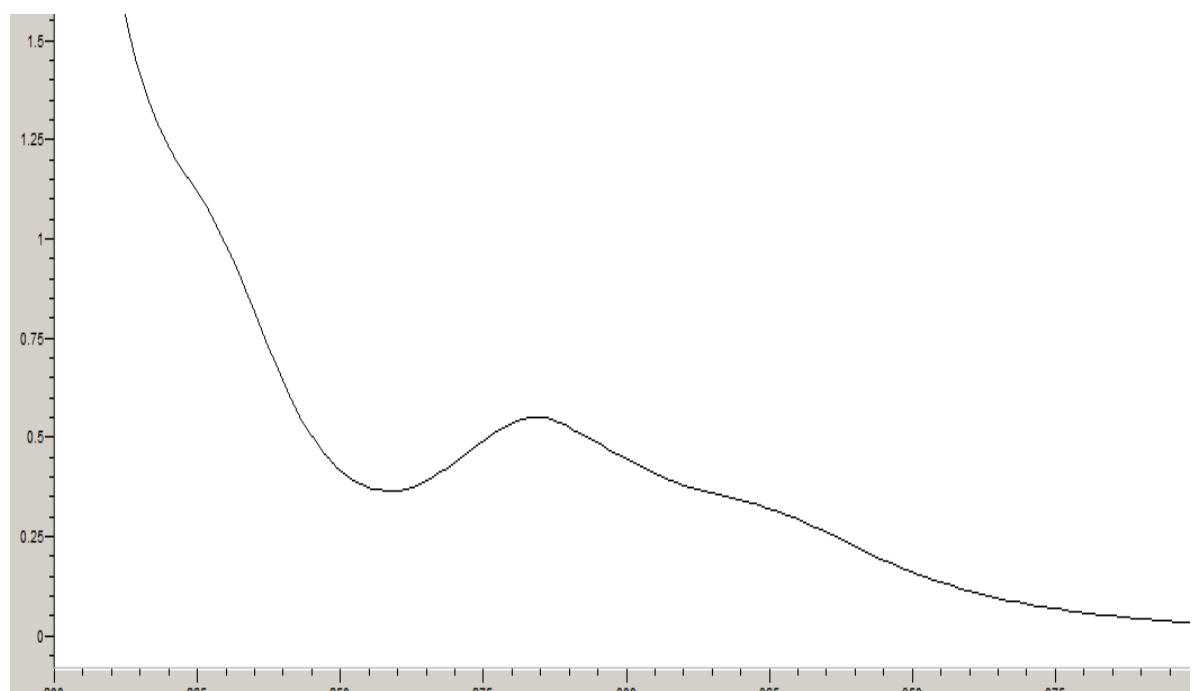
Compuesto 67: no identificado, TR: 43.271



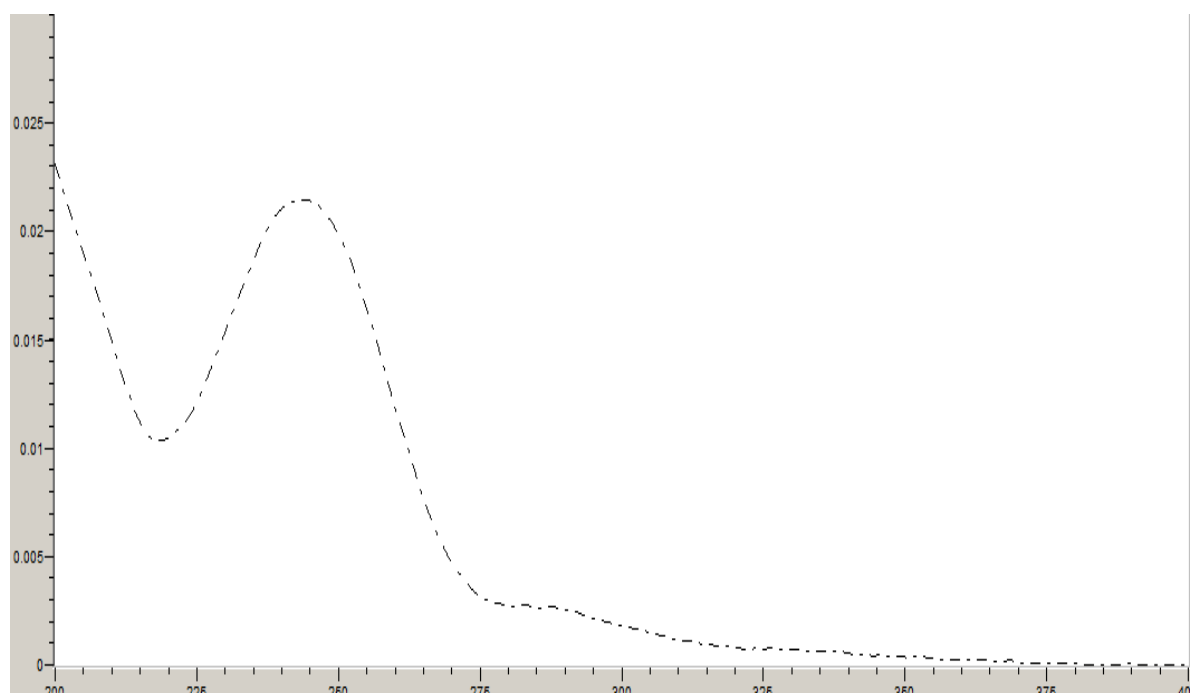
Compuesto 68: derivado de ácido cinámico, TR: 43.455



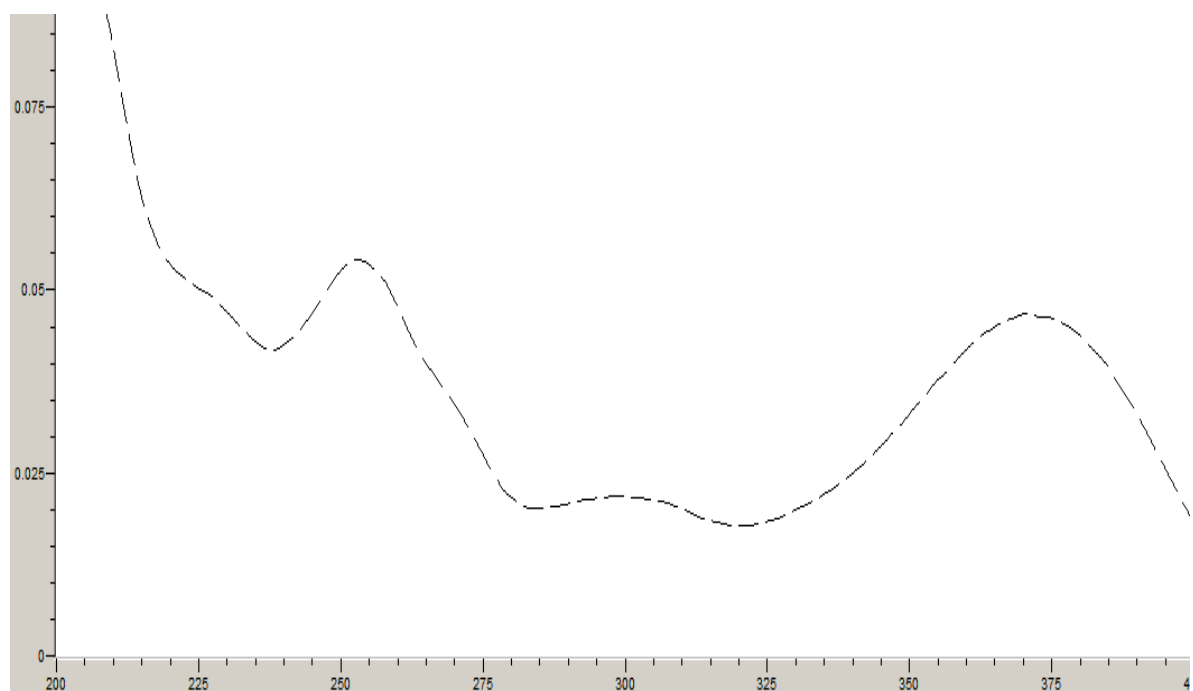
Compuesto 69: ácido fenólico, TR: 44.811



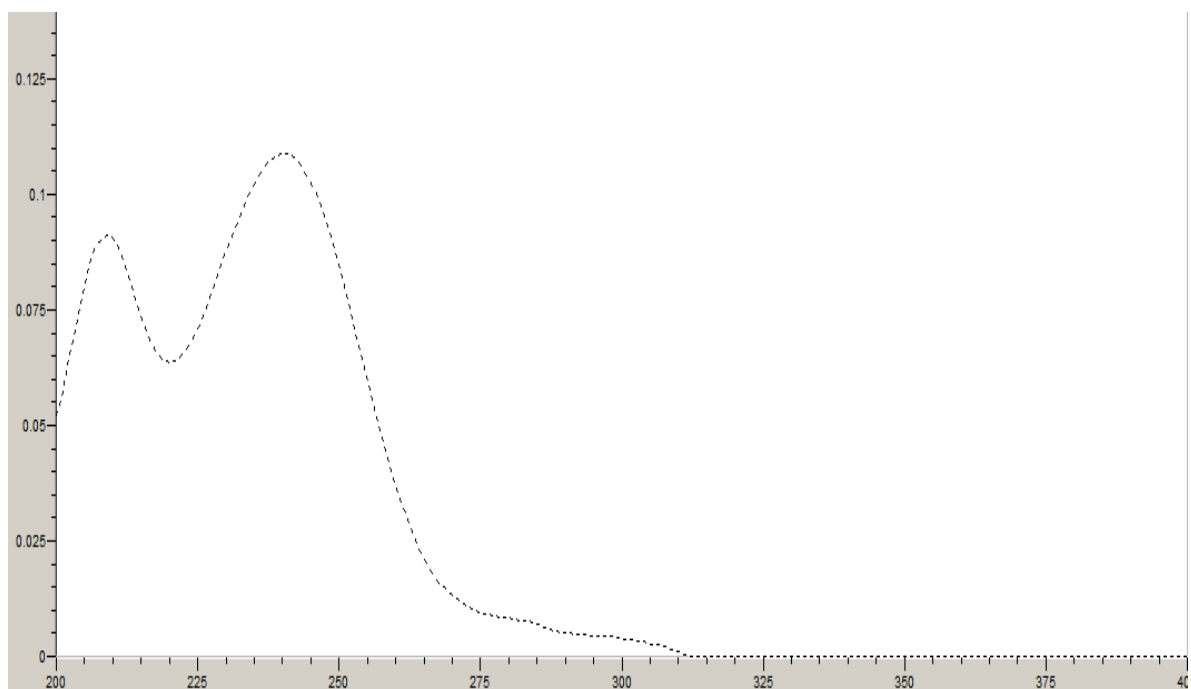
Compuesto 70: no identificado, TR: 44.784



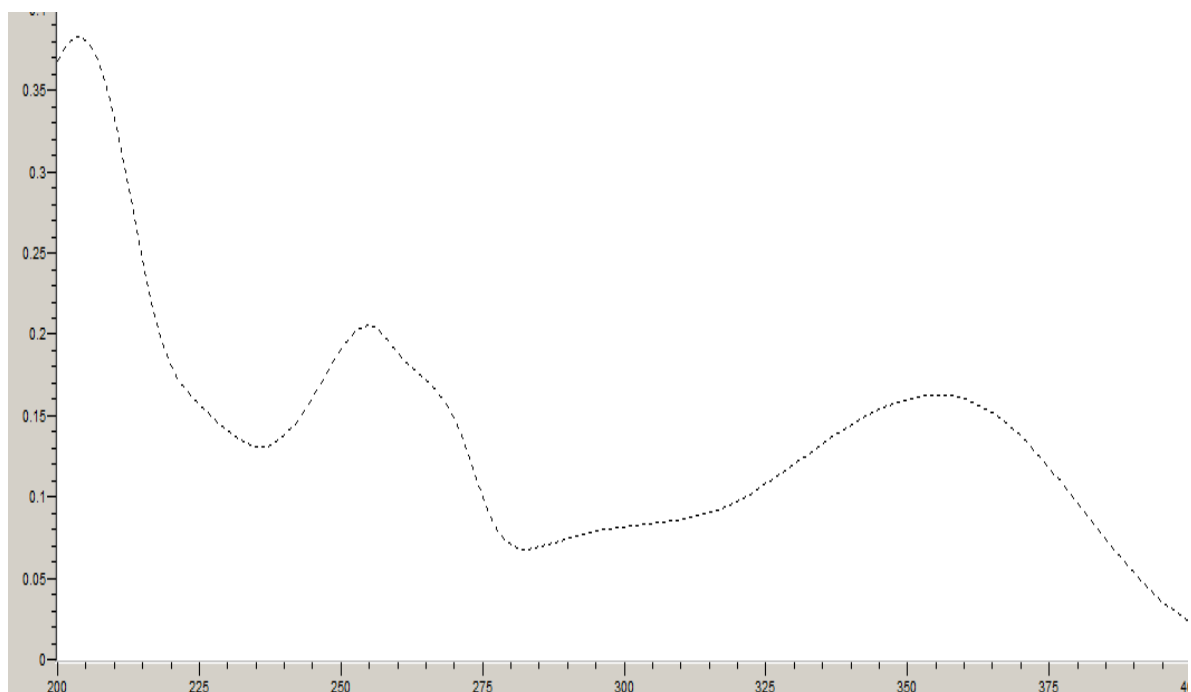
Compuesto 71: derivado de ácido benzoico, TR: 45.076



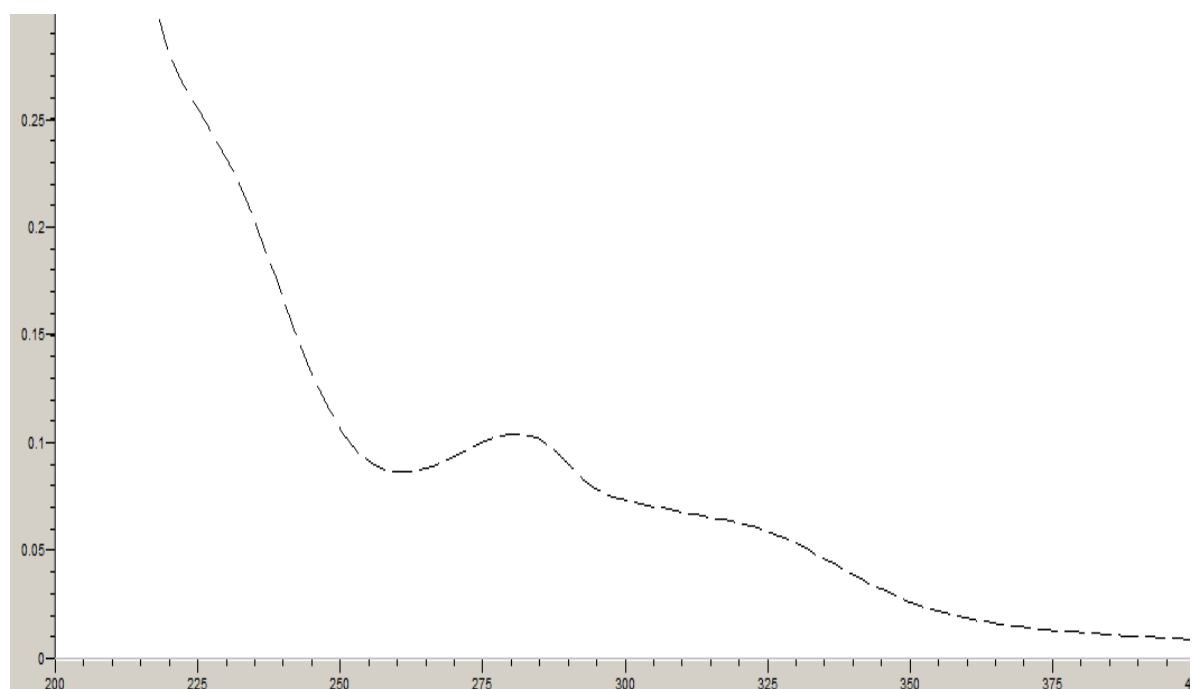
Compuesto 72: derivado glicósido de canferol, TR: 45.368



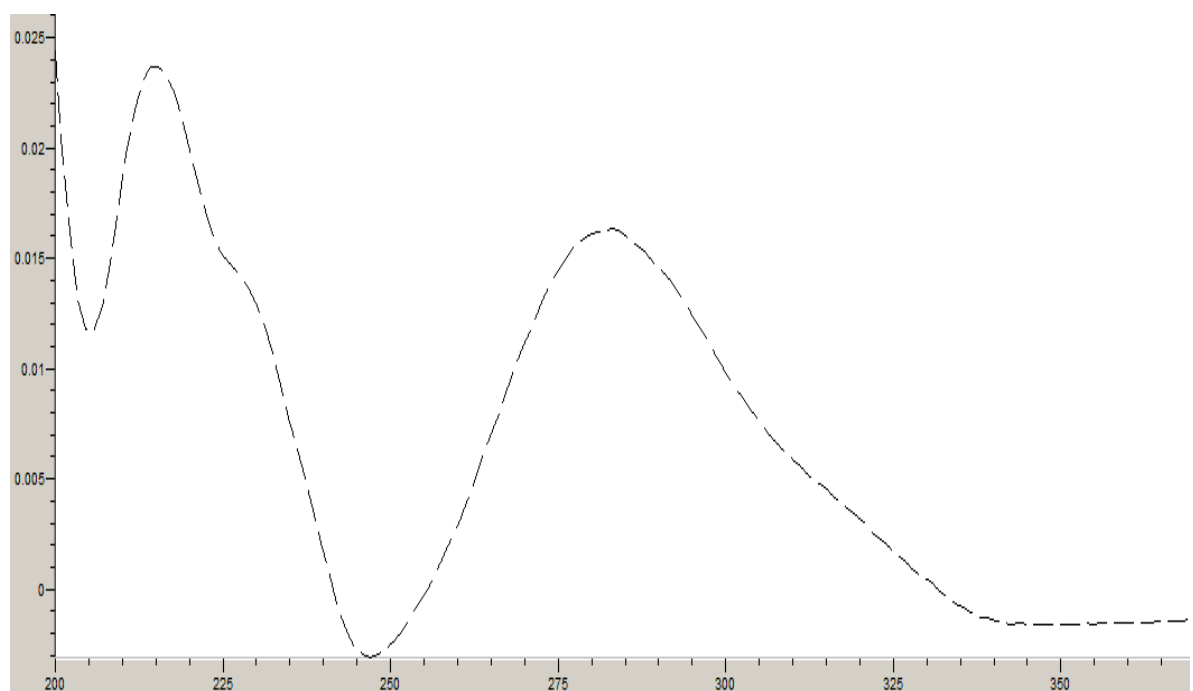
Compuesto 73: ácido fenólico, TR: 45.764



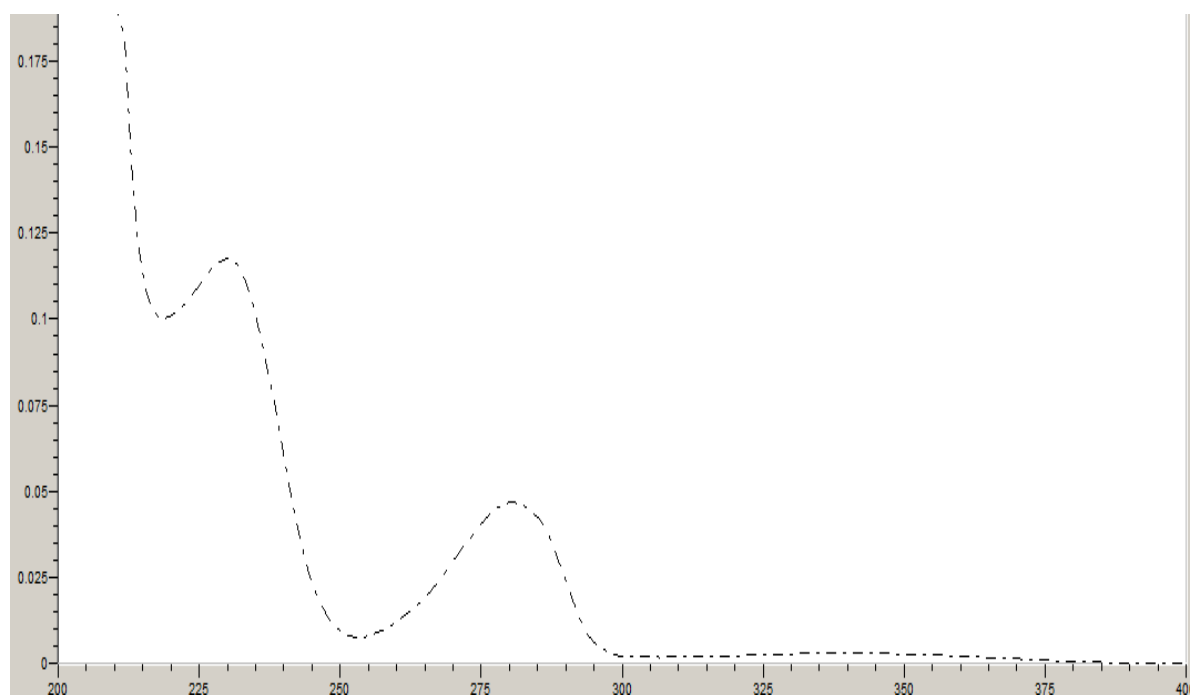
Compuesto 74: derivado glicósido de quercetina, TR: 46.036



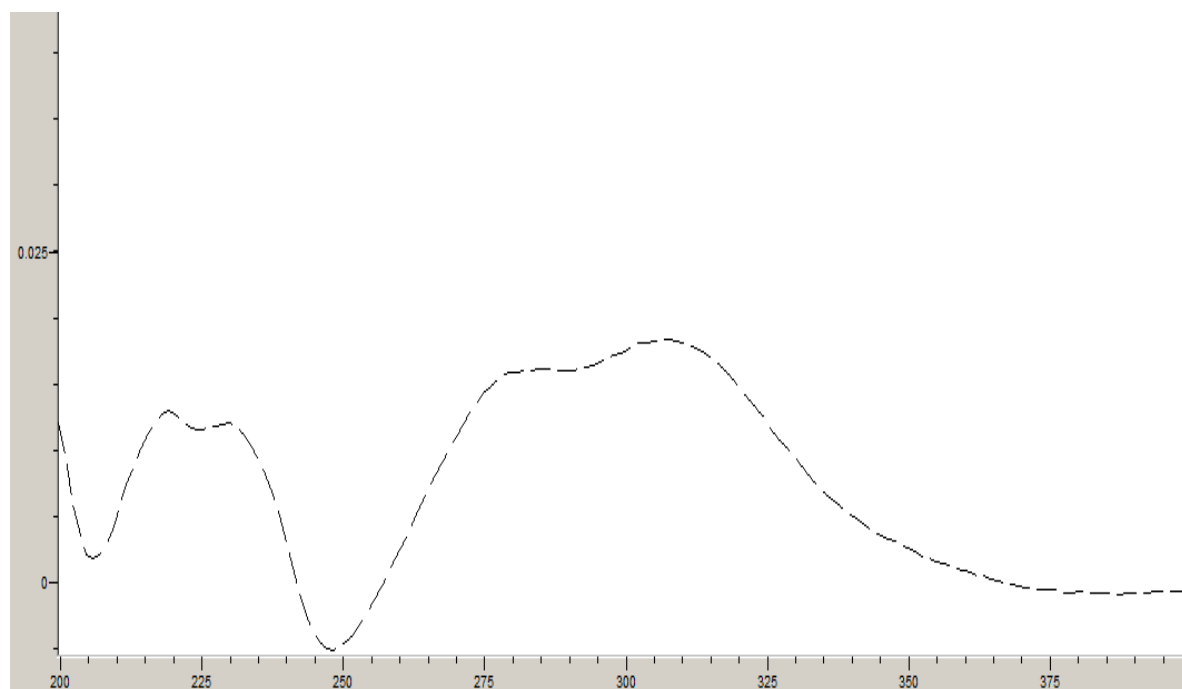
Compuesto 75: no identificado, TR: 46.350



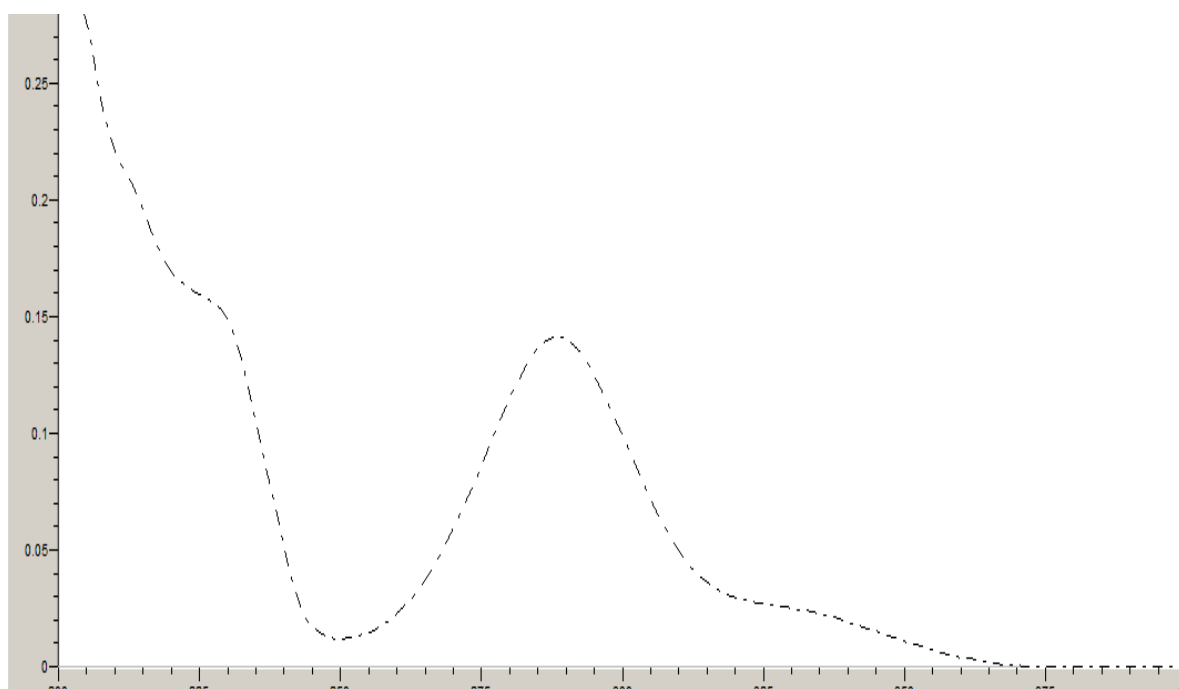
Compuesto 76: dihidroflavonoide, TR: 47.758



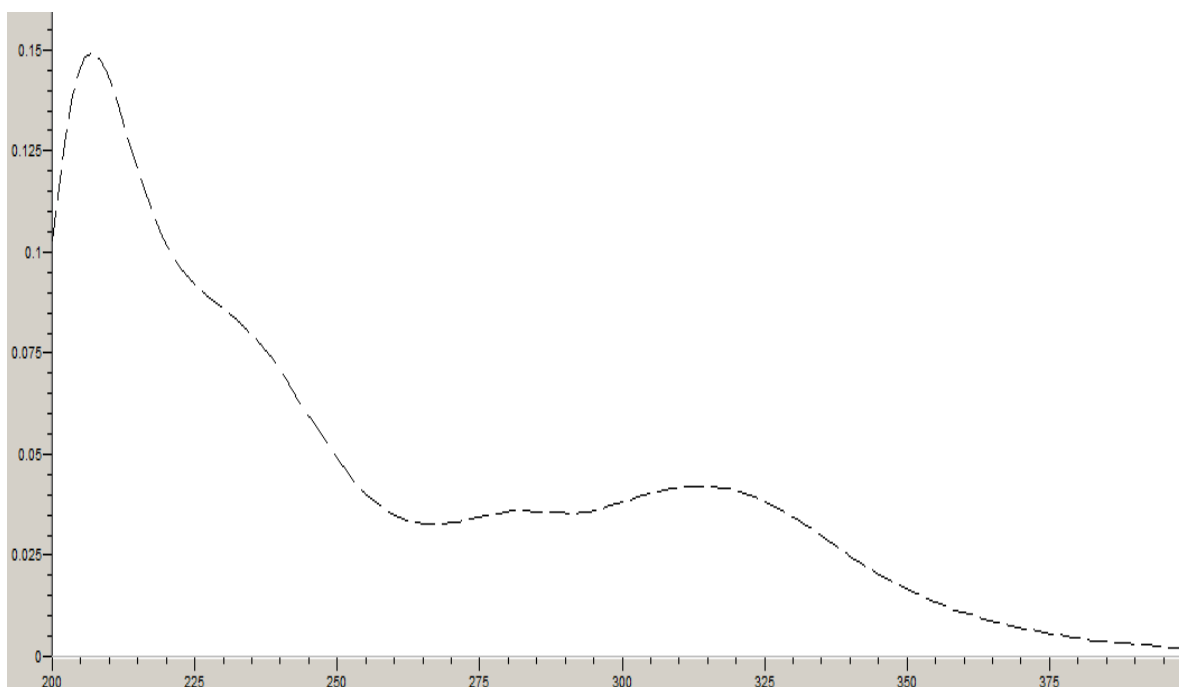
Compuesto 77: dihidroflavonoide, TR: 48.491



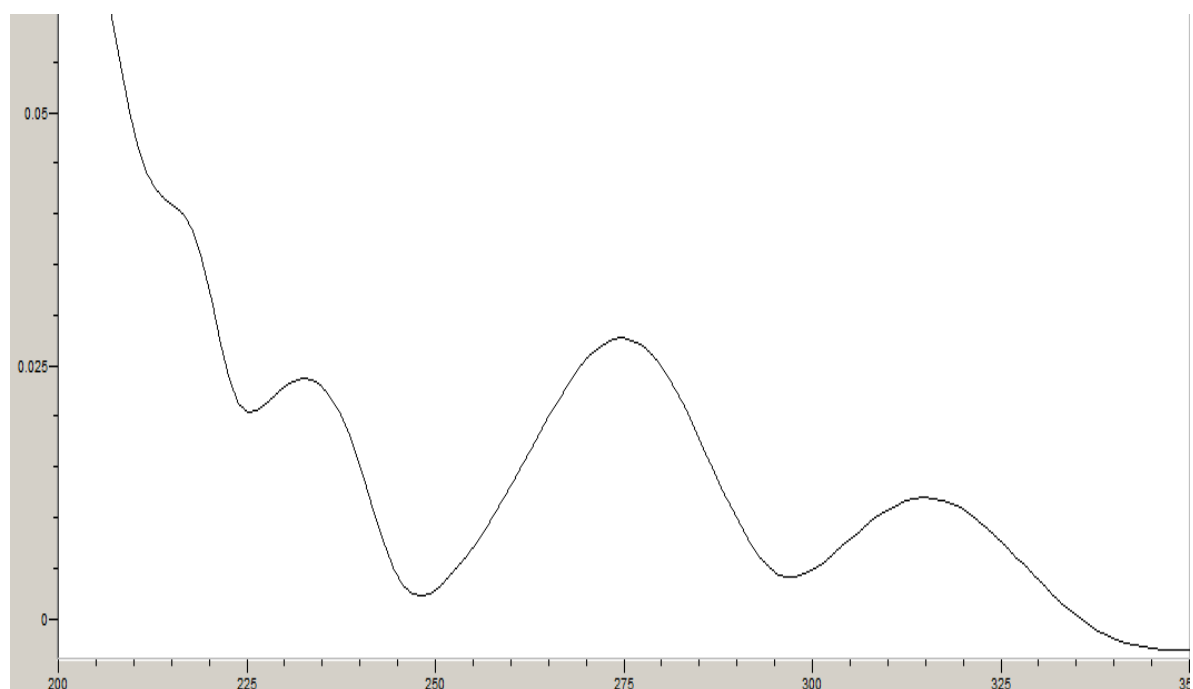
Compuesto 78: derivado de ácido cinámico, TR: 47.298



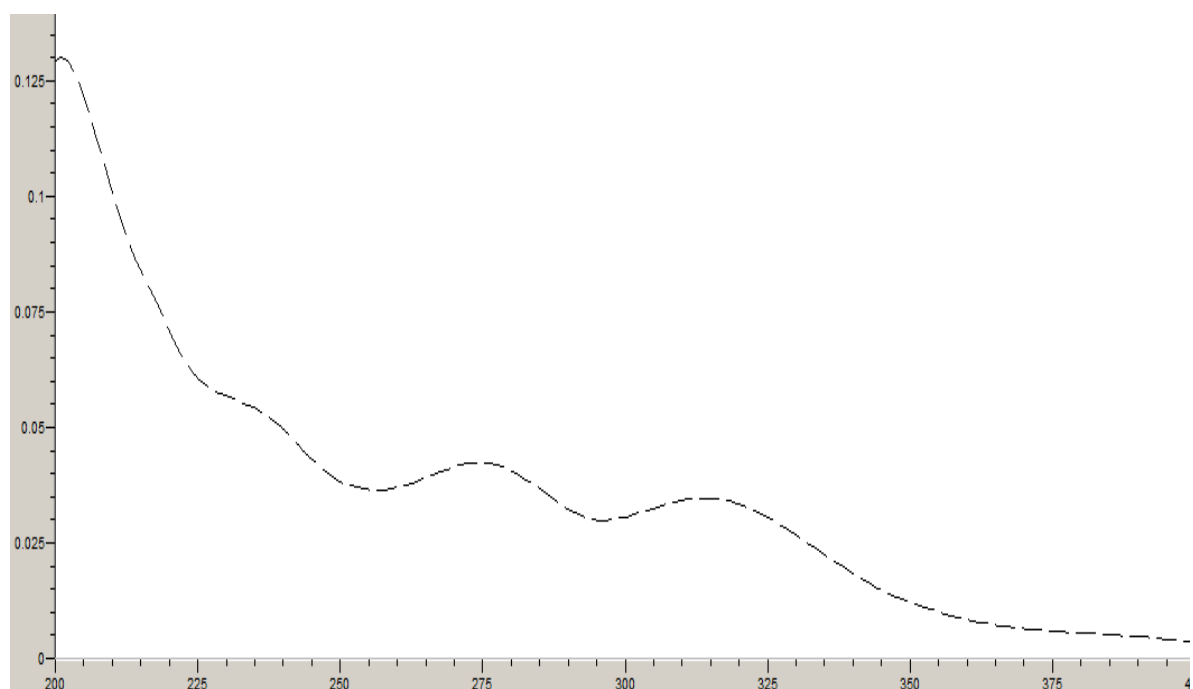
Compuesto 79: eriodictiol, TR: 49.158



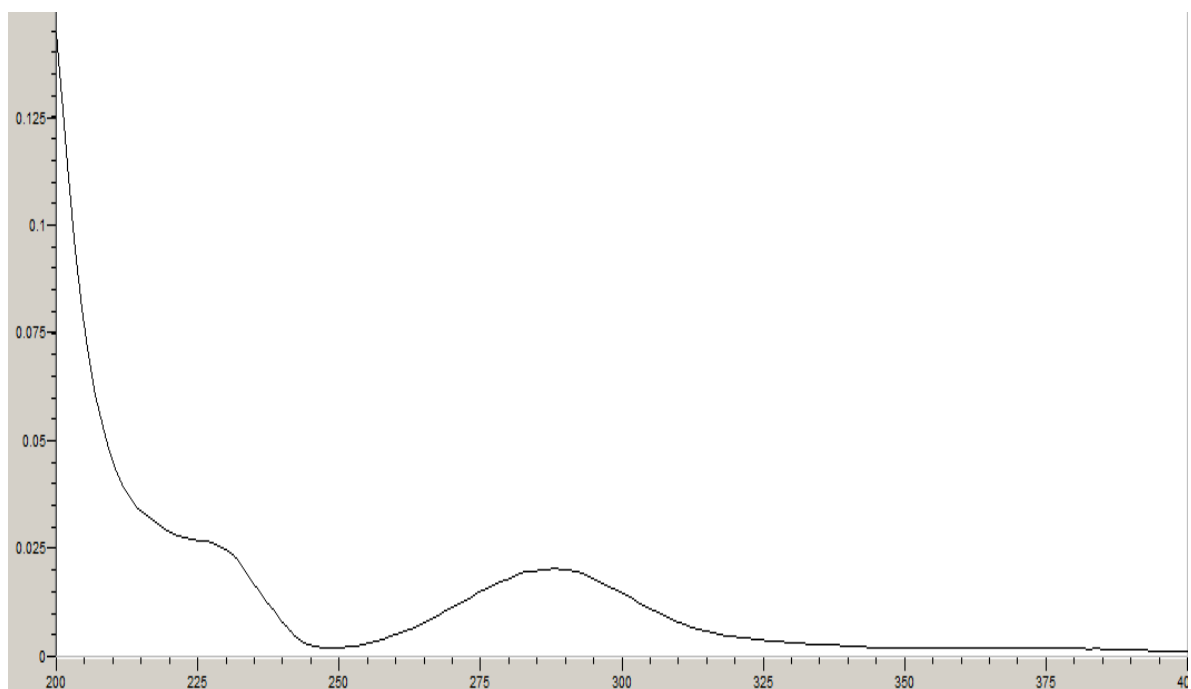
Compuesto 80: derivado de ácido cinámico, TR: 49.738



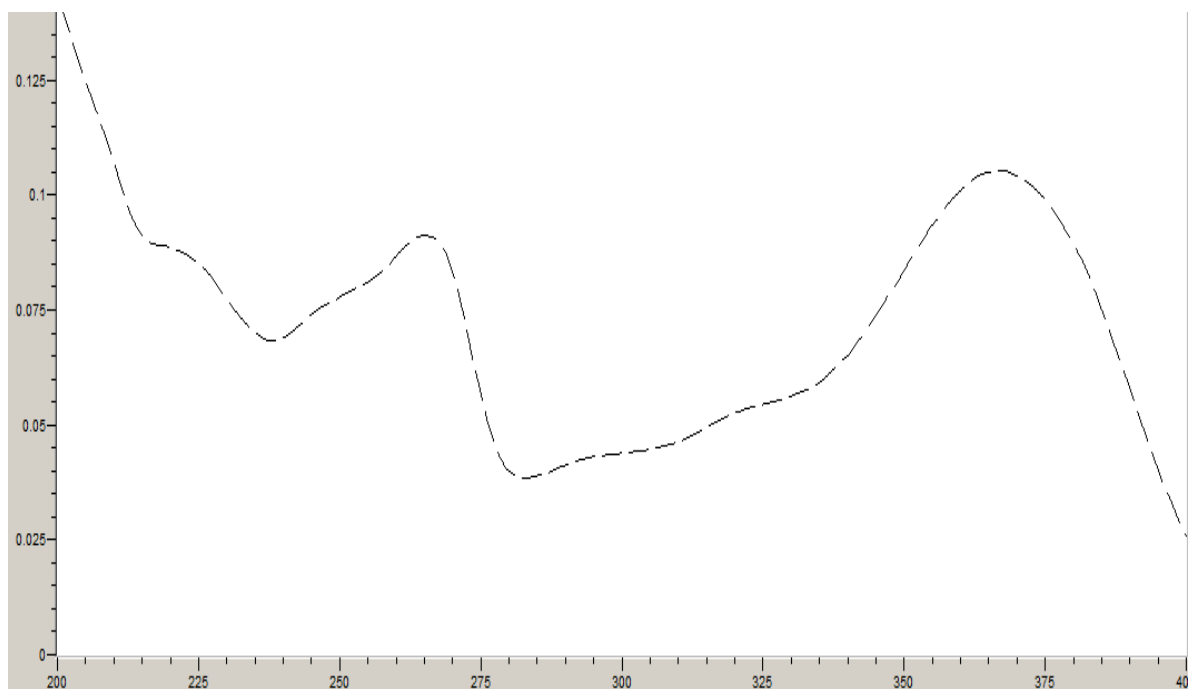
Compuesto 81: flavanona, TR: 49.269



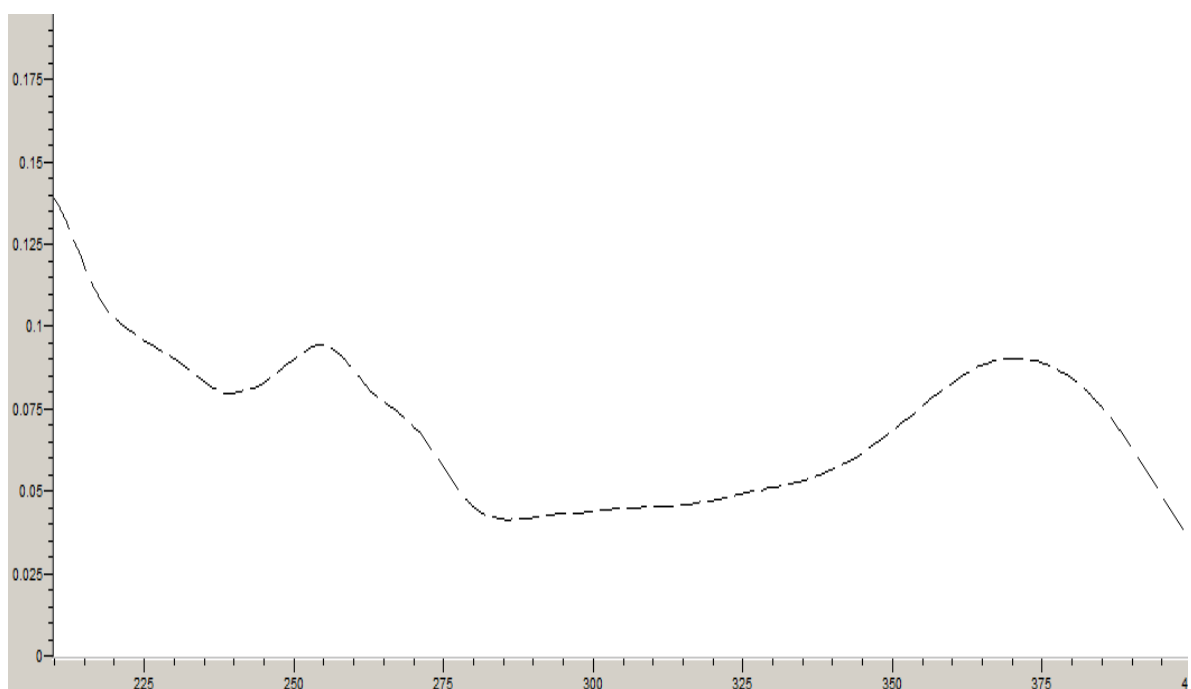
Compuesto 82: no identificado, TR: 50.325



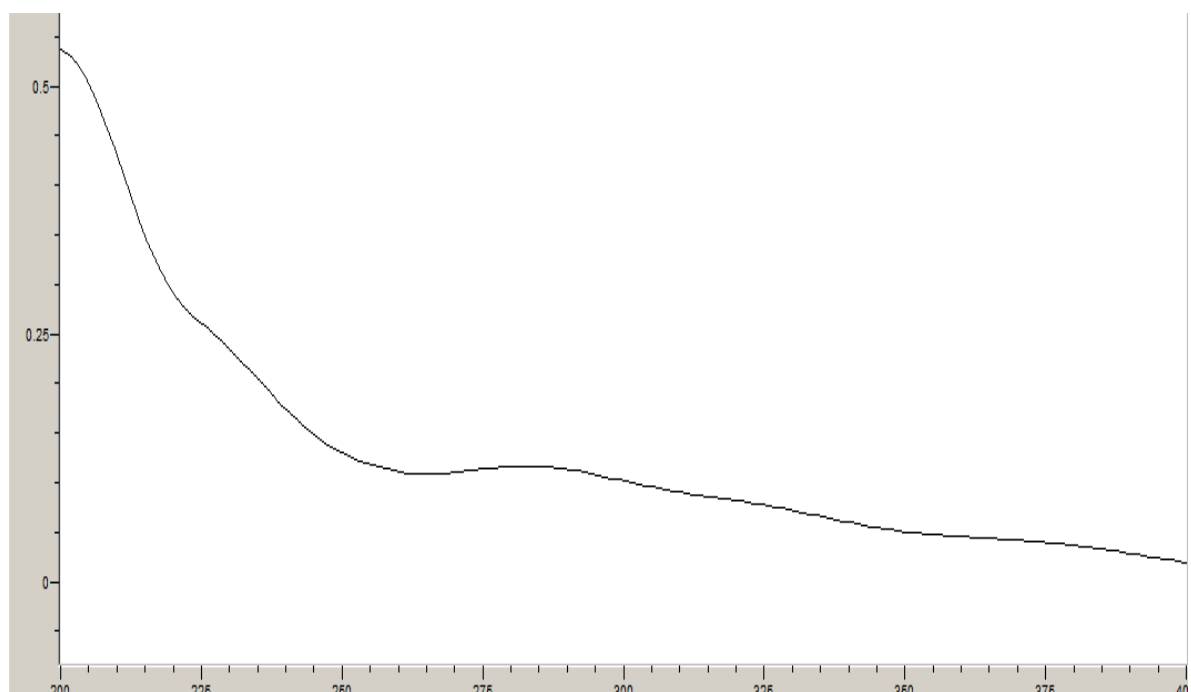
Compuesto 83: ácido fenólico, TR: 50.903



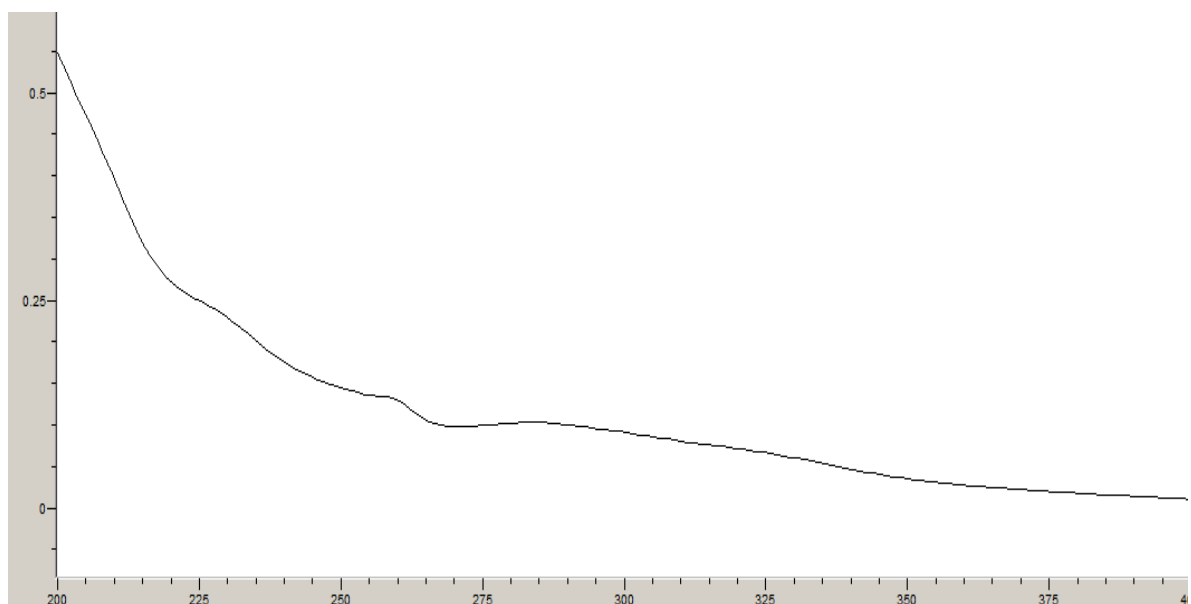
Compuesto 84: derivado glicósido de canferol, TR: 51.440



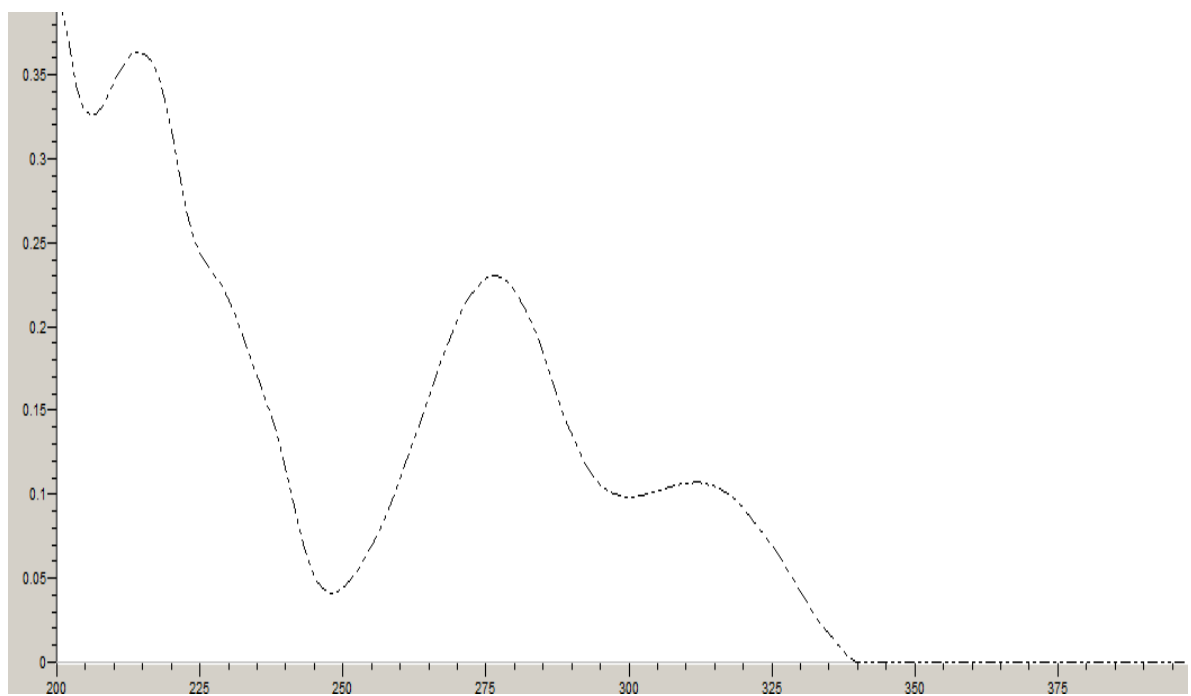
Compuesto 85: flavonol glicósido, TR: 52.173



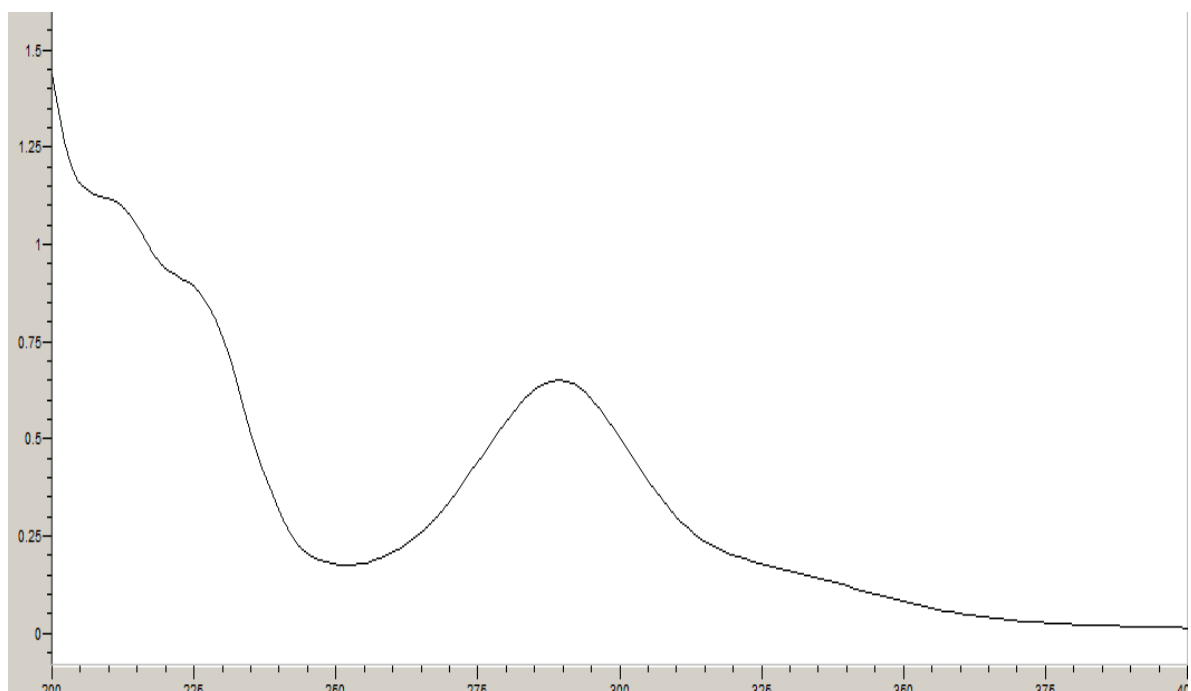
Compuesto 86: no identificado, TR: 52.892



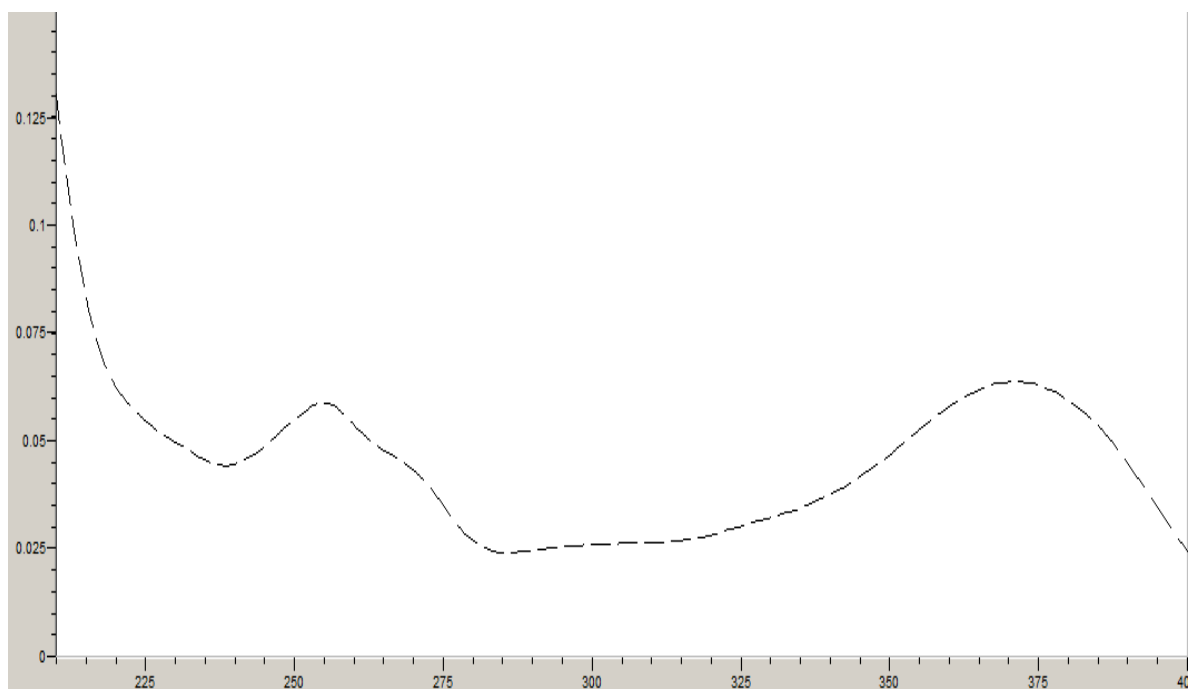
Compuesto 87: no identificado, TR: 54.124



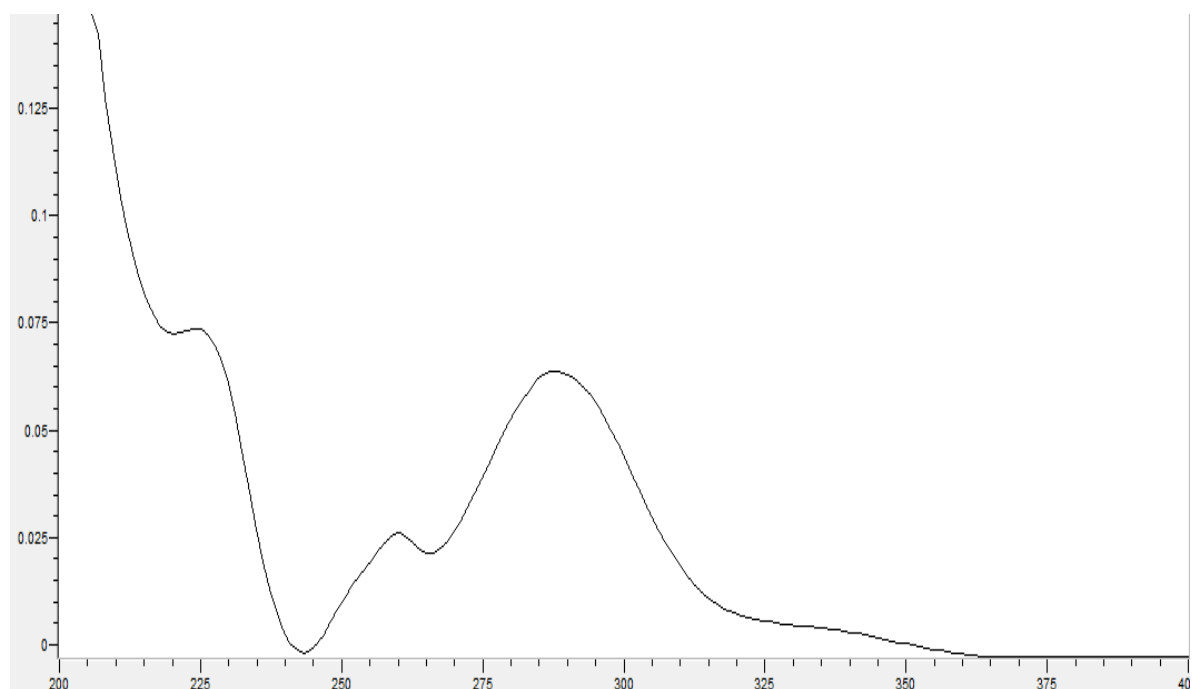
Compuesto 88: dihidroflavonoide, TR: 52.794



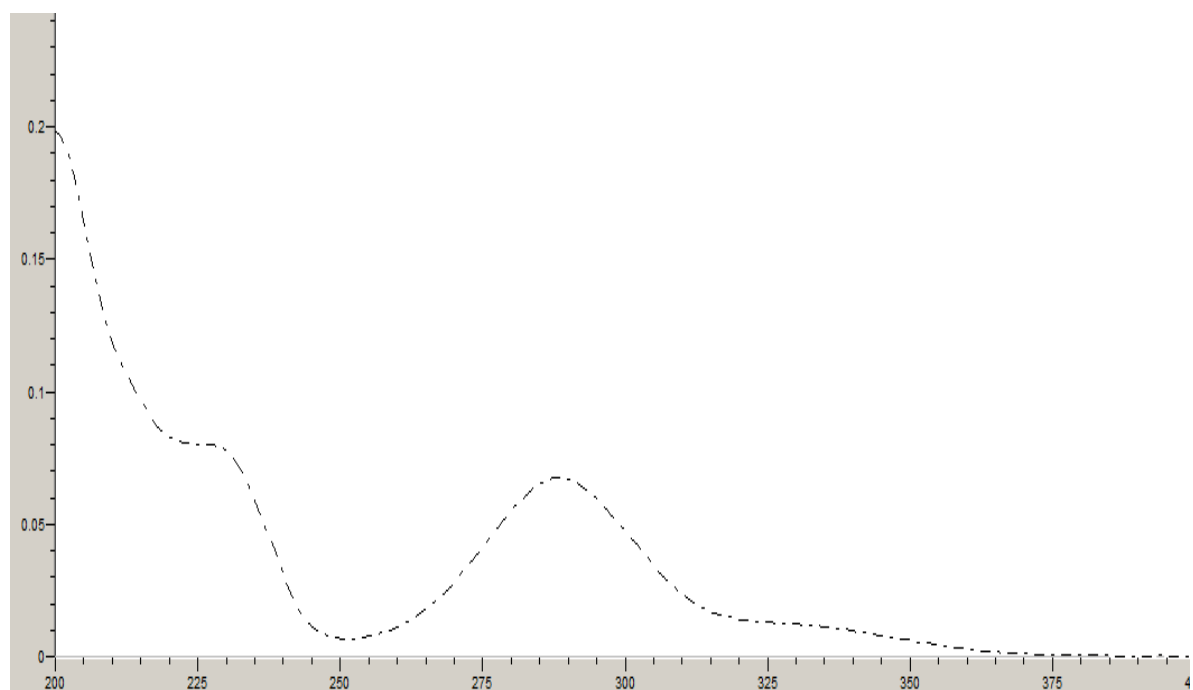
Compuesto 89: dihidroflavonoide, TR: 53.009



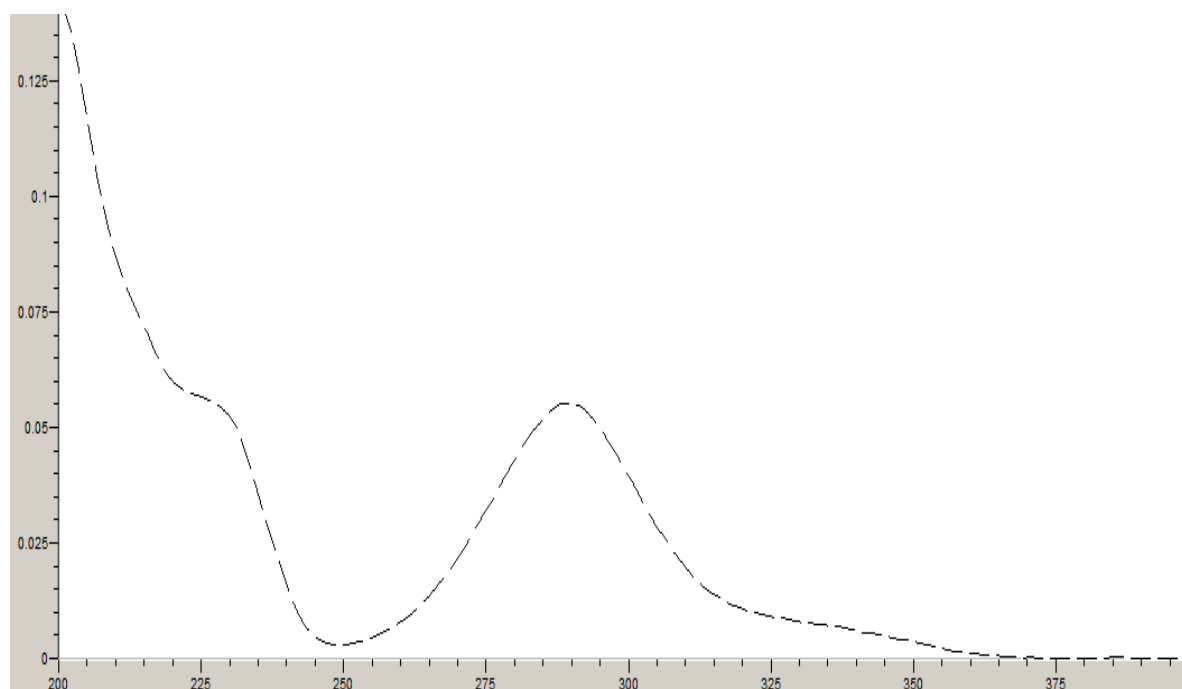
Compuesto 90: flavonol glicósido, TR: 52.444



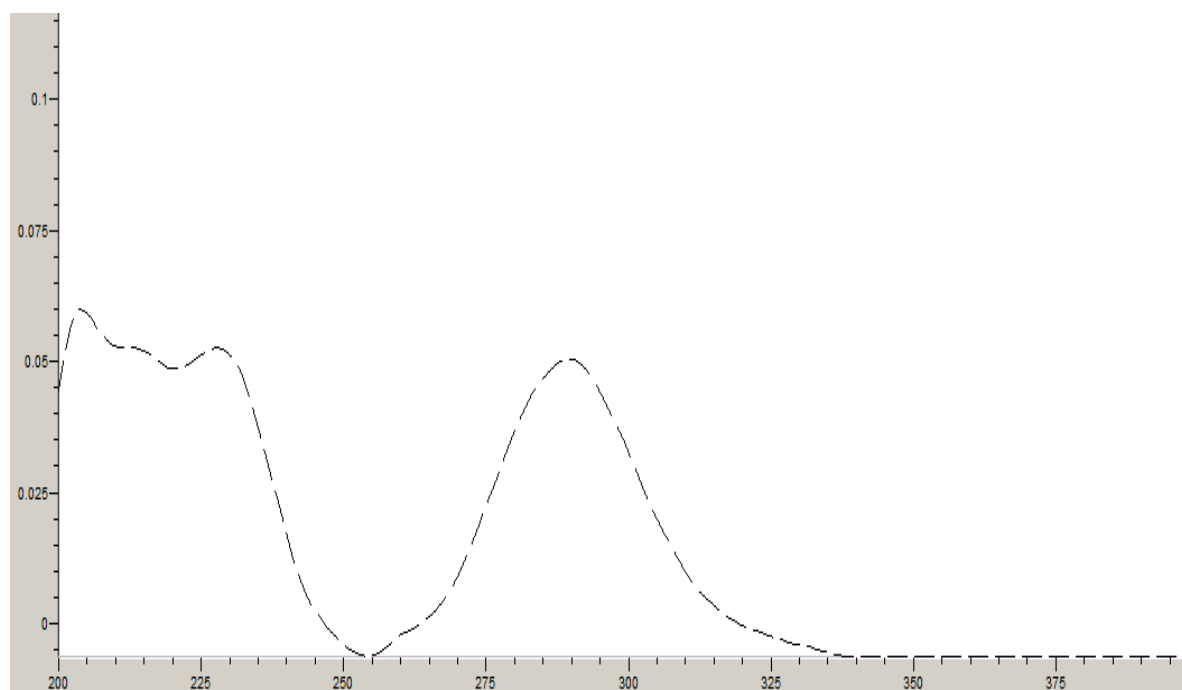
Compuesto 91: ácido fenólico, TR: 53.977



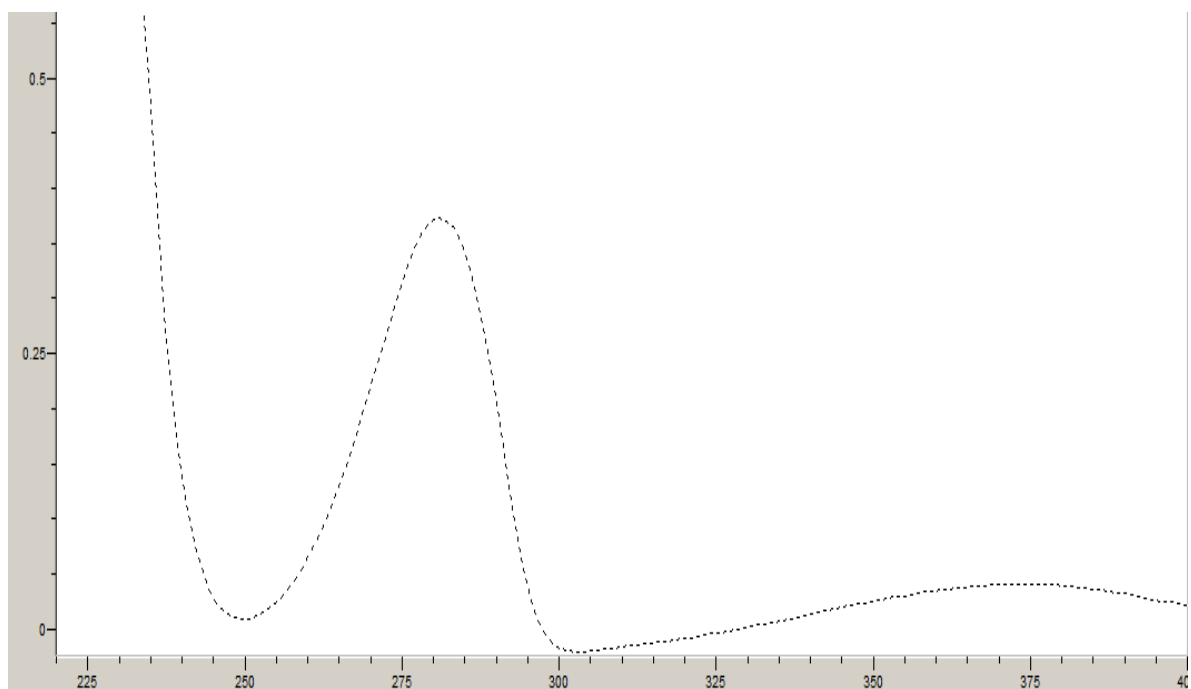
Compuesto 92: dihidroflavonoide, TR: 54.160



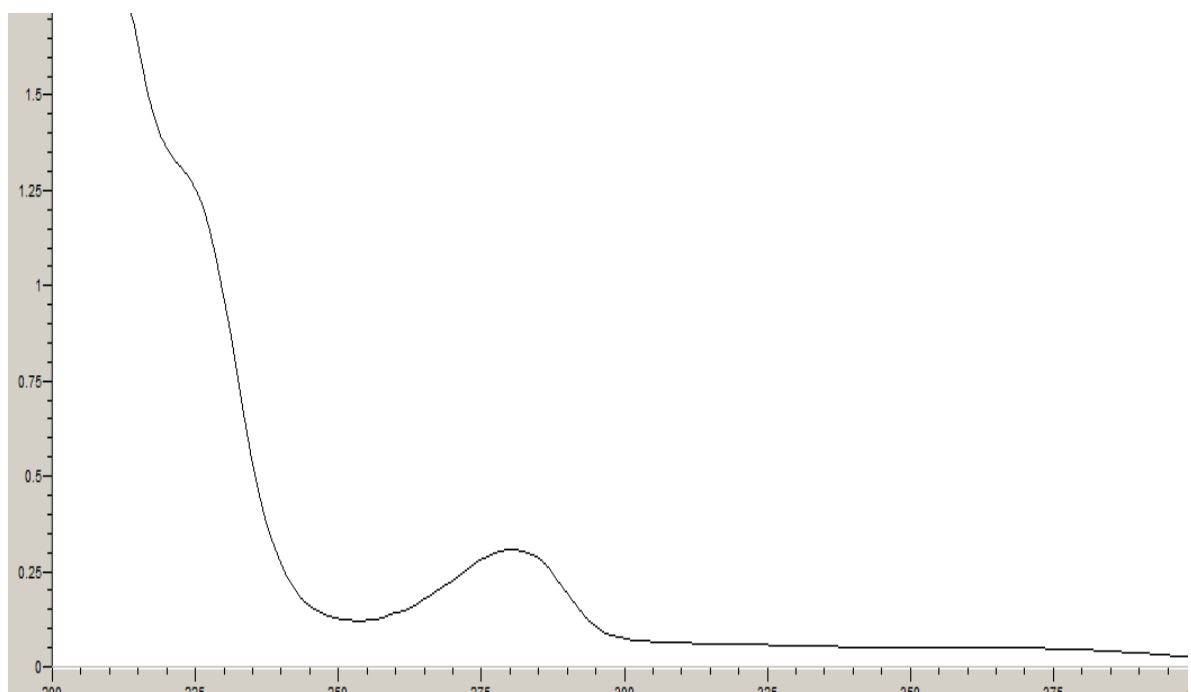
Compuesto 93: dihidroflavonoide, TR: 53.974



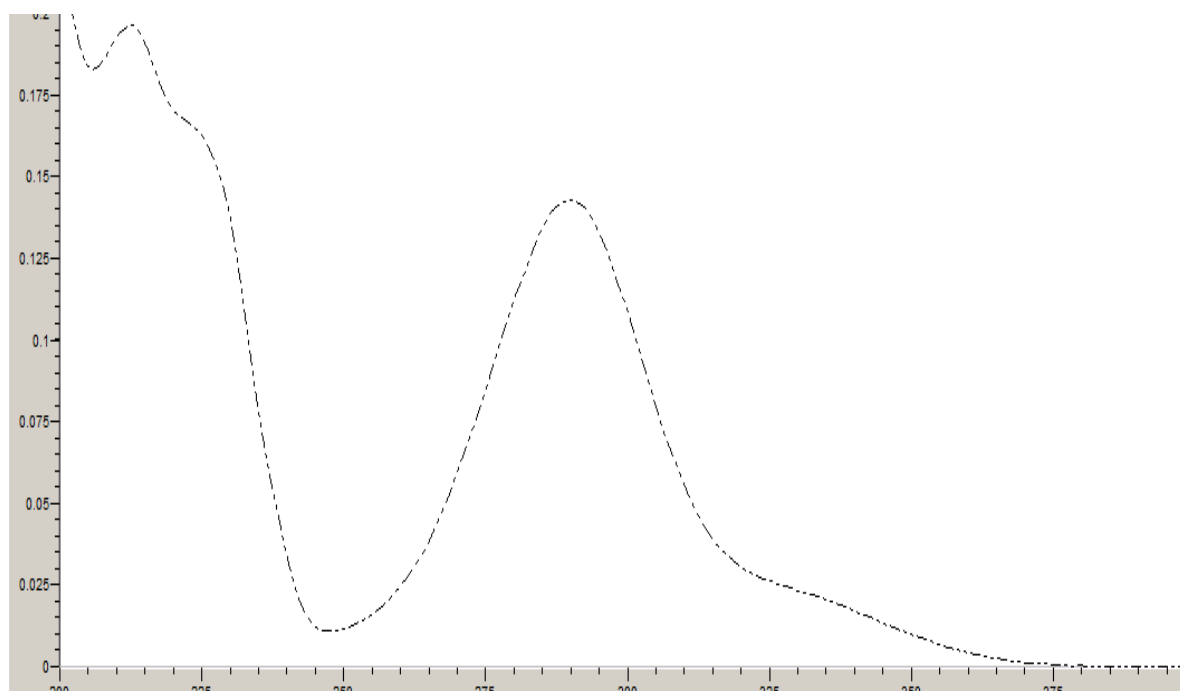
Compuesto 94: dihidroflavonoide, TR: 54.916



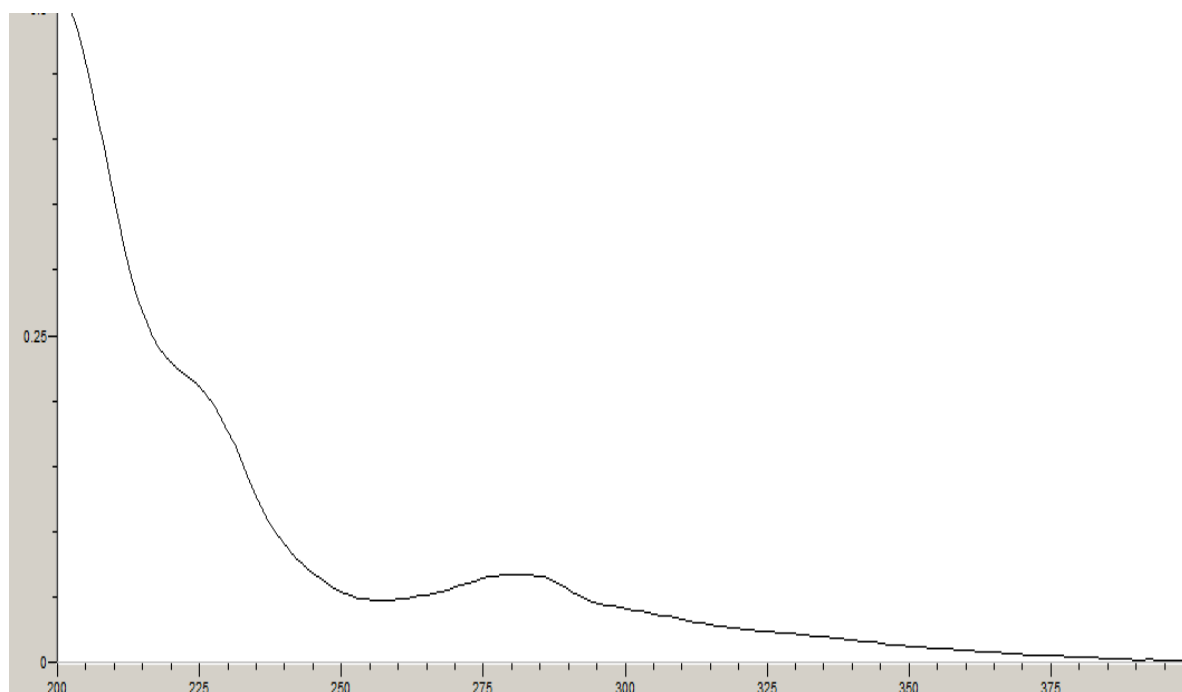
Compuesto 95: dihidroflavonide, TR: 56.338



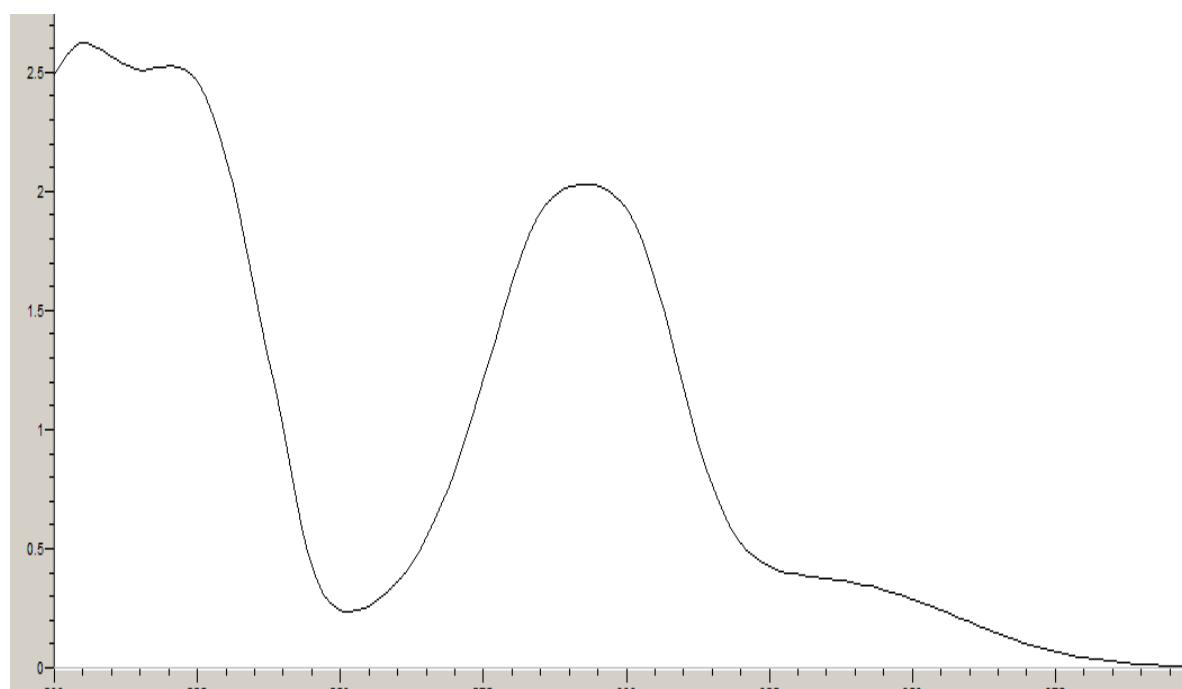
Compuesto 96: derivado de ácido fenólico, TR: 56.118



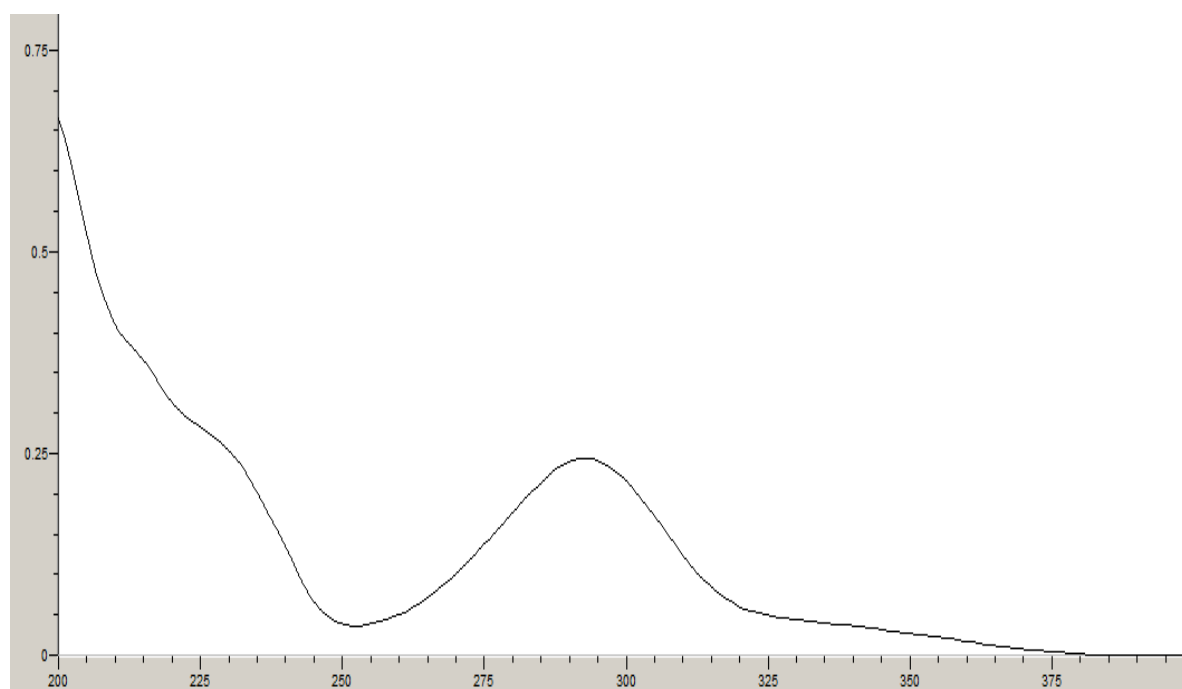
Compuesto 97: dihidroflavonoide, TR: 58.069



Compuesto 98: no identificado, TR: 58.870



Compuesto 99: dihidroflavonoide, TR: 60.602



Compuesto 100: dihidroflavonoide, TR: 62.499