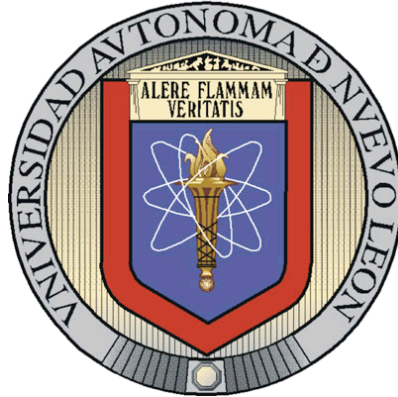


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LAS
REGIONES ITSs EN AGAVES DE LA SERIE *STRIATAE***

Por

BIOL. JORGE A. VERDUZCO MARTINEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS con especialidad en Botánica**

Diciembre 2005

**ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LAS
REGIONES ITSs EN AGAVES DE LA SERIE *STRIATAE***

Comité de la tesis

Dra Diana Reséndez Pérez
Director

Dr. Moisés Franco Molina
Secretario

Dra Cristina Rodríguez Padilla
1° Vocal

Dr. Juan Manuel Alcocer González
2° Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
3° Vocal

COMISIÓN DE TESIS

Dra Diana Reséndez Pérez
Director

Dr. Moisés Franco Molina
Secretario

Dra Cristina Rodríguez Padilla
1° Vocal

Dr. Juan M. Alcocer González
2° Vocal

Dr. Edgar Mendoza Gamboa
3° Vocal

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
NOMENCLATURA.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
1. RESUMEN Y ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. HIPÓTESIS.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos particulares.....	6
5. IMPORTANCIA.....	7
6. ANTECEDENTES.....	8
6.1 Distribución de los Agaves.....	8
6.2 Familia Agavaceae.....	8
6.3 Taxonomía de Agaves.....	9
6.4 Endemismo y abundancia de especies Agavaceas.....	11
6.5 Utilidad de los Agaves.....	12
6.6 Elección de la Serie Striatae para estudio.....	14
6.7. Distribución de las especies de la Serie Striatae.....	14
6.8 Regiones genómicas utilizadas en sistemática.....	16
6.9 Asociación entre yucas y palomillas.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1. Obtención del material biológico.....	18
7.2. Extracción de los ADNs genómicos de los Agaves.....	19
7.3. Diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación de las regiones ITS1 y 2.....	20
7.4. Amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 y 2 de los Agaves.....	20
7.5. Análisis del ADN mediante electroforesis en gel de Agarosa.....	22
7.6. Clonación de los fragmentos amplificados ITS1 y 2 en el vector pCR 2.1.....	22
7.7. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los Agaves.....	24
8. RESULTADOS.....	25
8.1 Colecta de Agaves.....	25
8.2 Extracción de los ADNs genómicos de las plantas de Agave.....	33
8.3 Amplificación de las secuencias ITS1 mediante PCR.....	34
8.4 Amplificación de las secuencias ITS2 mediante PCR.....	35
8.5. Clonación de las regiones ITSs en el plásmido PCR 2.1-TOPO.....	35
8.6. Caracterización de las clonas recombinantes con Eco R1.....	35
8.7 Análisis de las regiones ITSs mediante secuenciación.....	38

8.8	Alineamiento múltiple de las secuencias ITS1	39
8.9	Árbol de las secuencias nucleotídicas ITS1 de los Agaves	40
8.10	Alineamiento múltiple de las secuencias ITS2.....	42
8.11	Fenograma de las secuencias ITS2 de los Agaves.....	43
8.12	Alineamiento múltiple de las secuencias ITS1 Y 2.....	45
8.13	Árbol filogenético de las secuencias ITS1 y 2.....	46
8.14	Análisis de las secuencias ITS1 de <i>A. Dasyliroides</i>	47
8.15	Fenograma de las secuencias ITS1 de <i>A. dasyliroides</i>	48
9.	DISCUSIÓN	51
9.1	Extracción de ADN genómico de las plantas de Agave	51
9.2	Amplificación de las secuencias ITSs	52
9.3	Análisis de las secuencias ITSs	52
10.	CONCLUSIONES	54
11.	LITERATURA CITADA	55

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
° C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNcp	ADN cloroplasto
ADNr	ÁDN codificante de ARN ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
ARNnp	ARN nuclear pequeño
b-gal	Gen de la proteína b-galactosidasa
Ca ⁺⁺	Calcio
Coah	Coahuila
CTAB	Bromuro de Cetil Metil Amonio
D.O.	Densidad óptica
Dal	Daltones
dNTP	Dinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilen diamino-tetra-acético
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gal	Galactosa
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
H	Horas
Indel	Inserción/Delección
IPTG	Isopropilo β-D-galactosidasa
ITSs	Espaciadores internos transcritos
Ixmiqui	Ixmiquilpan
KCl ₂	Cloruro de Potasio
kDa	Kilodaltones
KoAc	Acetato de Potasio
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LiCl	Cloruro de Litio
Long	Longitud
M	Molaridad
mg	Miligramos
mg/k	Miligramo por kilogramo
mg/ml	Miligramos por mililitro
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
miliQ	Agua ultrapurificada

min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Mor	Morelos
N°	Número
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	Nanogramo
NL	Nuevo León
ng/μl	Nanogramo por microlitros
nm	Nanómetro
nv sp	Nueva especie
Oligo	Oligonucleótido
OV	Ovario
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
Pue	Puebla
Primer	Oligonucleótido
Quer	Querétaro
RNAasa	Enzima ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
S.O.C.	Medio de cultivo bacteriano rico en sales
ssp	Subespecie
Sta	Santa Catarina
Tamps	Tamaulipas
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tm	Temperatura media de alineamiento
Tris-HCl	Hydroxymethyl aminomethane hydrochloride
U/μl	Unidades por microlitro
UV	Ultravioleta
V	Voltio
v/v	Volumen a volumen
Wis	Wisconsin
X-Gal	5- bromo-4-cloro-3-indol-b-D-galactosido
μl	Microlitros

2. LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Relaciones taxonómicas en el género <i>Agave</i>	10
II	Endemismo y abundancia de especies Agavaceas en México.....	12
III	Origen de las especies de <i>Agaves</i> colectados.....	19
IV	Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las regiones ITSs de <i>Agaves</i>	21
V	Temperaturas durante el proceso de amplificación por PCR de las regiones ITSs de <i>Agaves</i>	22
VI	Secuencias nucleotídicas ITSs variantes.....	39
VII	No. de nucleótidos totales y clave de secuencias ITS1 utilizadas en el alineamiento múltiple.....	40
VIII	Porcentajes de identidad y divergencia de las diferentes secuencias ITS1 de los <i>Agaves</i>	42
IX	Nº de nucleótidos totales y clave de secuencias ITS2 utilizadas en el alineamiento múltiple de los diferentes <i>Agaves</i>	43
X	Porcentajes de identidad e índice y divergencia de las secuencias de los ITS2 de los <i>Agaves</i>	45
XI	Nº de nucleótidos totales y clave de secuencias ITS1 y 2 utilizadas en el alineamiento múltiple.....	46
XII	Porcentajes de identidad e índice de divergencia de las secuencias de los ITS1 de <i>A. dasyliroides</i> en dos poblaciones.....	49
XIII	Porcentajes de identidad e índice de divergencia de las secuencias de los ITS1 de <i>A. tequilana</i> de un mismo individuo.....	49

3. LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1	Mapa general de distribución de los Agaves..... 9
2	Aspecto de algunas especies de Agaves la Serie Striatae..... 15
3	Comparación morfológica entre cortes longitudinales de flores..... 15
4	Estructura de la región que contiene los ADNs ribosomales..... 16
5	Áreas de colecta de Agaves..... 18
6	PCR virtual de la regiones ITSs de <i>T. lanceolata</i> 20
7	Características morfológicas de <i>Agave striata</i> 27
8	Características morfológicas de <i>Agave striata</i> 27
9	Características morfológicas de <i>Agave striata</i> var. <i>nana</i> 28
10	Características morfológicas de <i>Agave striata falcata</i> 28
11	Características morfológicas de <i>Agave stricta</i> 29
12	Características morfológicas de <i>Agave tenuifolia</i> 29
13	Características morfológicas de <i>Agave dasyliroides</i> 30
14	Características morfológicas de <i>Agave reginae-montana</i> 30
15	Características morfológicas de <i>Agave victoriae-reginae</i> 31
16	Características morfológicas de <i>Agave lechuguilla</i> 31
17	Características morfológicas del híbrido entre <i>Agave lechuguilla</i> x <i>A. Americana</i> 32
18	Características morfológicas de <i>Agave americana</i> 32
19	Características morfológicas del híbrido <i>Agave bracteosa</i> x <i>victoriae-reginae</i> 33
20	Extracción de ADN genómico de los Agaves de la Serie Sriatae..... 33
21	Amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 de los Agaves..... 34
22	Amplificación mediante PCR de las regiones ITS2 de los ADNs..... 35
23	Clonación de las regiones ITS1 y 2 en el plásmido pCR TOPO 2.1..... 36
24	Caracterización de las clonas recombinantes pCR TOPO/ITS1 con la enzima de restricción Eco R1..... 37
25	Caracterización de las clonas recombinantes pCR2.1 TOPO/ITS2 con la enzima de restricción Eco R1..... 38
26	Fenograma de las secuencias ITS1 de los Agaves..... 41
27	Fenograma de las secuencias ITS2 de los Agaves..... 44
28	Fenograma de las secuencias nucleotídicas ITS1 y 2 de los Agaves..... 47
29	Fenograma de la secuencias ITS1 de <i>A. dasyliroides</i> pertenecientes a dos poblaciones..... 48

1. RESUMEN

El género *Agave* presenta un nivel alto de endemismo en México, una gran diversidad de especies, es un recurso natural y abundante de amplia distribución que en condiciones naturales posee diferentes usos y es muy adaptable a regiones con baja precipitación aún cuando corresponde al tipo árido. Son pocos los estudios taxonómicos descritos para la familia Agavaceae debido al alto grado de dificultad para identificar con precisión sus especies. Los criterios empleados para reconocer las especies de *Agaves* son imprecisos, ya que aún contando con todas las características morfológicas, no se puede reconocer con certeza a que especie pertenecen y además, existe cierto grado de hibridación natural entre las especies inclusive pertenecientes a diferentes Series y Subgéneros (Gentry, 1982). Por lo que, la genética molecular es una de las alternativas más prometedoras para brindar la accesibilidad y rapidez deseada en la identificación de especies de difícil clasificación. El objetivo de esta tesis fue utilizar la determinación taxonómica a nivel molecular usando el análisis de las regiones espaciadoras de los genes multicopia codificantes del ARN ribosomal (ARNnr) denominadas Secuencias Internas Transcritas (ITS1 y 2).

Para ello se purificaron los ADNs de *Agaves* mediante una modificación a la técnica de precipitación de cloruro de litio y se amplificaron por PCR las regiones ITS1 y 2 utilizando oligonucleótidos específicos dirigidos a los ADNr 18S, 5.8S y 28S. Los productos amplificados se insertaron en el vector plasmídico pCR 2.1-TOPO y las secuencias nucleotídicas de las clonas recombinantes fueron analizadas mediante alineamientos múltiples usando el programa Jotun Hein del MegAlign DNA Star. El análisis de las secuencias ITSs permitió detectar la presencia de marcadores moleculares específicos con los que se diferenció a los *Agaves* de la Serie *Striatae* e híbridos de otras Series. Además, se documentó la presencia de diferentes copias polimórficas de las secuencias ITSs en una misma especie, entre diferentes localidades y en un mismo individuo. Esta variabilidad inesperada, permitió postular este método para la genotipificación molecular de los *Agaves* (patente en trámite: "Método de genotipificación molecular de *Agaves* utilizando las secuencias nucleotídicas ITSs de los ADNs ribosomales").

La metodología desarrollada en esta la tesis para la taxonomía y genotipificación molecular de *Agaves* abre la posibilidad para ser utilizada en programas de protección de germoplasma, fitomejoramiento genético, protección de especies en peligro de extinción, así como en estudios de biogeografía y evolución vegetal.

1. ABSTRACT

Agave is an abundant and natural resource with a high level of endemism in Mexico, high diversity in species, wide distribution in natural conditions, different utilities, and high adaptable features to light rain precipitation regions even in arid conditions. There are only a few taxonomic studies for all the Agavaceae family due to the lack of reliable morphological markers for specie identification. Therefore, the criteria used to identify the *Agave* species are very imprecise. Moreover, there is certain natural hybridization degree between different Subgenus (Gentry, 1982). For these reasons molecular genetics is one of the most promising alternatives for a clear and precise identification of *Agave* species. The objective of this thesis was to performed a molecular taxonomic analysis using the sequences of the Internal Transcribed Spacer regions in the multicopy nuclear ribosomal DNA named ITS1 and 2. With this purpose, we purified genomic DNAs of *Agaves* using of an adaptation of the lithium chloride precipitation technique described by Sullivan *et al.*, 2000. ITS1 y 2 regions were amplified by PCR using specific oligonucleotides directed to 18S, 5.8S and 28S rDNA. PCR products were cloned in pCR2.1 TOPO and nucleotide sequences from the recombinant clones, were analyzed by multiple alignment using the software Jotun Hein of MegAligne in DNA Star. Sequence analysis of the ITS1 and 2 regions allowed us to detect the presence of specific molecular sequence markers to differentiate species of *Agave* Striatae Series as well as hybrids from other Series. Additionally, the presence of successfully different polymorphic copies detected on the ITSs nucleotide sequences of the same *Agave* specie, in plants of different localities and even in the same plant. This unexpected variability allowed us to propose this approach as a new method for molecular genotification of *Agaves* (Patent in process: "Method of *Agaves* molecular genotification using ITSs nucleotide sequences of the ribosomal DNAs").

The work developed in the molecular taxonomy and genotification of *Agaves* will allow to apply this methodology it in germoplasm protection programs, improvement of plants characters, endangered species protection, as well as biogeographical analysis and plant evolution studies.

2. INTRODUCCIÓN

Los *Agaves* son plantas endémicas de América de distribución tropical y subtropical, frecuentemente presentes en zonas de clima árido, y con el mayor número de especies originarias de nuestro país. La distribución, endemismo y abundancia de las diferentes especies de la Familia Agavaceae registran un total de 155 especies del Género *Agave*, de las que el 75% se encuentran en México siendo el 58% endémicas. Uno de los tipos de vegetación más característico de México es el rosetófilo representado principalmente por el género *Agave* que están especialmente adaptado a los ambientes con una precipitación anual muy baja. La condición árida predomina en más de la mitad del territorio nacional y en este ambiente el género *Agave* es abundante y con una gran diversidad de especies endémicas. Como género son muy adaptables a diferentes tipos de condiciones climáticas por lo que son relativamente fáciles de cultivar con un mínimo consumo de agua si se comparan con la mayoría de cultivos con mayor demanda comercial. Tradicionalmente en México, se ha aprovechado este recurso natural utilizando diferentes partes de las plantas: las fibras de sus hojas permiten fabricar cuerdas y la parte central del cuerpo rico en azúcares sirve para preparar miel y edulcorantes sustitutos de azúcar o para la alimentación del hombre o animales. Donde la savia rica en azúcares de algunos *Agaves* se utiliza para preparar bebidas como el Aguamiel y Pulque o de las plantas completas para la elaboración de Mezcal o Tequila. Además, estas monocotiledóneas son ecológicamente importantes para la protección del suelo deteniendo su erosión y por otro lado son fuente de sustento de animales de vida silvestre.

La mayoría de las especies de *Agaves* son un recurso natural que hasta la fecha ha permanecido sub-aprovechado. Consideramos que el mejoramiento genético de los agaves producción comercialmente más competitivas con híbridos que pueden incrementar el valor de sus fibras, el de sus azúcares y el de otras propiedades. Para efectuar el mejoramiento genético es indispensable la selección genética y la identificación taxonómica de las especies y variedades. Dentro de los procedimientos regulares en sistemática se requiere analizar caracteres anatómicos de varios individuos correspondientes a diferentes poblaciones de una misma especie. En el caso de las características útiles en sistemática de *Agaves*, se encuentra la anatomía de las hojas, flores y vástago floral así como de sus frutos y semillas. Aunque no se aplica a todos los *Agaves*, la mayoría de ellos son monocárpicos, semelperos, lo que significa que sólo tienen una floración en su vida, con maduración de unas tres semanas, al cabo de la cual la planta muere. Esto último depende de la especie y puede tomar en promedio hasta 12 años en plantas en estado silvestre, lo que hace que los estudios sean extremadamente prolongados si no se cuenta con poblaciones en donde se presenten suficientes plantas en floración. Por esta razón, la práctica de la sistemática tradicional con *Agaves* enfrenta serios problemas y además la carencia de caracteres distintivos para muchas de sus especies dificultan los límites entre grupos y series, a causa de la variación morfológica

de tipo clinal y la capacidad de generación de híbridos presentes en todo el género *Agave*.

La genética molecular es una disciplina que tiene mucho que aportar, pues es una de las alternativas más prometedoras para facilitar la accesibilidad y rapidez deseadas en la identificación de especies de difícil clasificación. Una de las secuencias nucleotídicas más utilizadas para estudios de taxonomía molecular a nivel de género y especie son las dos regiones espaciadoras entre los genes ribosomales llamadas Secuencias Internas Transcritas ITS1 y 2 que permitió determinar el origen polifilético de la familia Agavaceae

El uso de este enfoque molecular permitirá la detección de marcadores moleculares específicos que pueden ser utilizados en el análisis *Agaves* con fines taxonómicos, económicamente factibles y seguros en la identificación molecular poblaciones y de plantas individuales de *Agave*.

3. HIPÓTESIS

El análisis de las secuencias nucleotídicas en los ITSs de los *Agaves* de la Serie *Striatae*, permitirá seleccionar marcadores moleculares para identificar a las especies de este grupo de otras Series de *Agaves*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar las secuencias nucleotídicas de los ITS1 y 2 de *Agaves* de la Serie *Striatae* para determinar su utilidad como marcadores moleculares que permitan establecer métodos taxonómicos de identificación clara y precisa de las especies de *Agave*.

4.2 Objetivos Particulares

- 4.2.1 Colecta de ejemplares de *Agaves* de la Serie *Striatae* en sus diferentes localidades.
- 4.2.2 Obtención del ADN genómico de las diferentes especies de *Agaves* utilizadas en el estudio.
- 4.2.3 Diseño de oligonucleótidos específicos para ITS1 y 2 y establecimiento de las condiciones de amplificación mediante PCR de las especies de la serie *Striatae*.
- 4.2.4 Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis en Agarosa.
- 4.2.5 Ligación de los productos amplificados y transformación de bacterias *Calcio* competentes.
- 4.2.6 Selección de las colonias positivas y obtención del ADN mediante minipreparación.
- 4.2.7 Análisis de los productos de digestión con la Enzima Eco R1, mediante electroforesis en geles de Agarosa.
- 4.2.8 Obtención del ADN plasmídico y conservación de clonas transformantes con los insertos ITS1 y 2.
- 4.2.9 Determinación de la secuencia nucleotídica de las regiones ITS1 y 2 de las especies de *Agaves* de la Serie *Striatae*.
- 4.2.10 Análisis de las secuencias nucleotídicas y construcción de un árbol fenético

5. IMPORTANCIA

Los *Agaves* en nuestro país son un recurso natural que aunque se explota, todavía puede ser utilizado de muchas formas y en diferentes lugares que hasta ahora no han sido valorados, sobre todo en regiones o áreas áridas y con baja precipitación anual. La abundancia de plantas y la diversidad de especies endémicas de México constituyen una riqueza subutilizada que requiere de investigación taxonómica fundamental para sustentar programas de fitomejoramiento. Mediante los procedimientos de la taxonomía tradicional, hasta ahora no ha sido posible ofrecer una clara delimitación taxonómica que defina las relaciones de parentesco entre la mayoría de las especies de *Agave*.

Debido a que la identificación clara de las especies es piedra angular de proyectos dirigidos a la obtención de híbridos y variedades competitivas comercialmente la taxonomía molecular ofrece un campo de valor taxonómico que solo hasta tiempos recientes no había sido posible siquiera imaginar. Con este tipo de tecnología se podría superar los requisitos de claridad, rapidez y accesibilidad que permitan acelerar la investigación en este campo.

El uso de la taxonomía molecular en la diferenciación de especies de *Agave* morfológicamente semejantes, es muy valioso ya que estos procedimientos de identificación además de ser precisos podrían permitir establecer programas de mejoramiento genético en estas y otras especies.

6. ANTECEDENTES

6.1 Distribución de los *Agaves*

Los *Agaves* se distribuyen preferentemente en ambientes áridos del Centro y Norte de América, la mayoría se encuentra adaptada a las grandes áreas desérticas ubicadas entre los 20° y 45° latitud Norte y 99° y 122° longitud Oeste del Meridiano de Greenwich y abarcan una superficie de 1,295,000 Km² que incluye los desiertos de la Gran Cuenca de Mojave, el Sonorense y el Chihuahuense (Figura 1). El desierto Sonorense esta ubicado en la mitad occidental del estado de Sonora y en la mayor parte de la península de la Baja California, su altitud no sobrepasa los 600 m sobre el nivel del mar (snm) principalmente son llanuras y lomeríos, con un máximo de precipitación anual de 500 mm y como mínimo llega a ser inferior a los 100mm. El desierto Chihuahuense está ubicado en el altiplano Mexicano, sus altitudes oscilan entre los 1000 y los 2200 m snm. Este se encuentra localizado en los estados de San Luís Potosí, Zacatecas, Chihuahua, Durango, Coahuila, en parte de Nuevo León y Tamaulipas, con precipitación anual entre 200 y 450 mm (Velasco 1991). Las regiones áridas en México llegan a formar más de la mitad del territorio nacional, principalmente en el centro y norte del país (Rzedowski y Huerta, 1981). Uno de los tipos de vegetación más característico y abundante de estos lugares es el rosetófilo, constituido por plantas suculentas que en su mayoría pertenecen al Género *Agave* resistente a condiciones ambientales con alta radiación solar y muy baja precipitación anual (Cronquist, 1977).

6.2 Familia Agavaceae

El Género *Agave* pertenece a la Familia Agavaceae la que aproximadamente cuenta con 20 géneros y 500 especies, de distribución tropical y sub-tropical, frecuentemente presente en zonas de clima árido. Entre las especies de *Agaves* nacionales de relevancia económica, ecológica u ornamental; podemos citar al henequén (*Agave fourcroydes*), al sisal (*A. sisalana*) la lechuguilla (*A. lechuguilla*). el maguey tequilero (*A. tequilana*), los magueyes pulqueros (*A. atrovirens*, *A. mexicana*, *A. lurida*, *A. americana*, *A. ferox*) y otras de importancia ornamental como la noa (*A. victoriae-reginae*).

Otros géneros de la Familia Agavaceae que son endémicos de éstas zonas áridas también son importantes por ser utilizados en la elaboración de bebidas alcohólicas como: el soyate (*Nolina nelsoni*), el varacuate (*Dasyilirion longissimum*), el sotol (*D. texanum* y *D. berlandieri*). Asimismo tienen importancia por las fibras que producen las "palmas", pitas o izotes, del género *Yucca* (Cano, Marroquín, 1994).



Figura 1. Mapa general de distribución de los Agaves. La distribución de los Agaves, abarca desde la región meridional de Estados Unidos de Norteamérica hasta Centroamérica. La línea punteada indica los límites de distribución. 1) indica el área aproximada de la Gran Cuenca de Mojave, 2) del Desierto Sonorense y 3) del Desierto Chihuahuense.

6.3 Taxonomía de *Agaves*

La taxonomía a nivel de especie en muchos casos no es clara, y resulta difícil definir los límites entre las Series, por lo que Gentry menciona que estas secciones son casi lo mismo que las Series de la taxonomía formal, indicando que los límites entre estos grupos, las “Series”, son indefinidos a causa de la variación morfológica de tipo clinal en el género *Agave*, con cambios graduales de caracteres, en forma parecida a otros géneros de la misma Familia Agavaceae. El Género *Agave* fue redefinido por Gentry quien estableció categorías que denominó Grupos o “Series” después de los Subgéneros *Littaea* y *Agave* y antes de la categoría de Especie (Tabla I).

TABLA I

Especie de la serie Striatae

Género	Sub Género	Serie	Especie	Sub Especie
		Americanae		
		Campaniflorae		
		Deserticolae		
		Crenatae		
		Ditepalae		
		Hieminiflorae		
	<i>AGAVE</i>	Marmoratae		
		Parryanae		
		Rigidae		
		Salmianae		
		Sisalanae		
		Umbeliflorae		
<i>AGAVE</i>				
			<i>striata</i>	striata
			<i>striata</i>	falcata
		Striatae	<i>stricta</i>	
		Amolae	<i>tenuifolia</i>	
		Choritepalae	<i>dasyliroides</i>	
	<i>LITTAEA</i>	Filiferae	<i>striata</i>	nana
		Marginatae	<i>dasilirioides</i>	minor
		Parviflorae	<i>reginae- montanae</i>	
		Polycephalae		
		Urceolatae		

6.4 Endemismo y abundancia de especies de la Familia Agavaceae

Los *Agaves* son endémicos de América, su distribución abarca desde la región meridional de Estados Unidos de Norteamérica pasando hacia el sur por México, llegan hasta Centroamérica. El mayor número de especies del género son originarias de nuestro país, de un total de 131 especies de *Agaves* 120 (91.6 %) son de distribución nacional y el 8.4 % restante son de regiones comprendidas en territorio de EUA, Guatemala, Belice, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá. En nuestro País se les puede localizar en casi todos los estados, son particularmente abundantes las especies de *Agaves*: Sonora, Baja California, Oaxaca, San Luis Potosí, Chihuahua, Durango, Puebla, Coahuila y Jalisco. Los estados que menos especies poseen son: Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Guanajuato y Colima (Figura 1 ; Gentry, 1982).

Ramírez en 1995 postuló que México es el centro de origen del Género *Agave* así como también de la Familia *Agavaceae* a la que pertenecen junto con otros siete Géneros más, de las 273 especies descritas de toda la familia, todas están distribuidas en el continente Americano desde Dakota del Norte, E U A hasta Bolivia y Paraguay. Asimismo consideró que en México, se encuentra la mayor diversidad de especies del Género *Agave*.

García Mendoza en 1995 y en 2002, realizaron un estudio de la distribución y del endemismo y abundancia de las diferentes especies de la Familia Agavaceae en México registrando que de 155 especies totales del Género *Agave*, 116 (75%) se encuentran en México, de las cuales 90 (58%) son endémicas (Tabla II).

TABLA II

Endemismo y abundancia de especies de la Familia
Agavaceae en México

Género o Subgénero	No. total de Especies	Especies en México (%)	Especies Endémicas (%)
<i>Agave</i>	155	116 (75)	90(58)
<i>Littaea</i>	53	47 (88)	41(77)
<i>Agave</i>	102	69 (68)	49(48)
<i>Beschorneira</i>	7	7(100)	6(86)
<i>Furcraea</i>	20	11(55)	8(35)
<i>Hesperaloe</i>	3	3(100)	2(67)
<i>Manfreda</i>	26	26(100)	18(69)
<i>Polianthes</i>	12	12(100)	12(100)
<i>Prochnyanthes</i>	1	1(100)	1(100)
<i>Yucca</i>	49	29(59)	14(29)
Total	273	205(75)	151(55)

6.5 Utilidad de los *Agaves*

Históricamente, los *Agaves* han sido utilizados por las poblaciones indígenas para múltiples usos. Los Españoles y Portugueses llevaron en sus viajes estas plantas a Europa dispersándolas principalmente en las regiones costeras del Mediterráneo y desde ahí se distribuyeron a otras en partes de Asia, África, Filipinas e Indonesia.

Tradicionalmente en México, se ha aprovechado este recurso natural utilizando diferentes partes de las plantas; la base de su estructura floral, para construcción de barreras y viviendas, las Hojas “pencas”, para aislamiento de fenómenos climáticos y estando secas se usan como combustible para cocinar alimentos, de las fibras de sus hojas se pueden fabricar cuerdas, vestimenta y otros utensilios. De las flores o los brotes

tiernos de las inflorescencias se preparan alimentos y de la parte central del cuerpo rico en azúcares, sirven para preparar miel y edulcorantes sustitutos de azúcar o para alimentación del hombre o animales. Los fluidos de algunos *Agaves* se usan para preparar bebidas como el Aguamiel y Pulque o de las plantas completas para elaborar Mezcal. Además, del uso ornamental de los *Agaves* en jardines, quizá una de las funciones más importantes es la protección del suelo deteniendo su erosión. (Granados, 1993; Maldonado-Cantú, 1996). Por otro lado los *Agaves* son importante fuente de sustento de colibríes, insectos como las abejas (Tuttle y Moreno, 2004) y murciélagos que son considerados benéficos para la agricultura como el murciélago pálido y el murciélago magueyero *Choeronycteris mexicana* que además de alimentarse de insectos también lo hacen del néctar de los *Agaves*. Praznik *et al.*, 2002 investigó la composición de los azúcares en *Agave tequilana* Weber var. Azul, encontrando que este *Agave* (a los siete años de edad) presenta niveles de 20%, de fructanos principalmente en el cuerpo de planta. En general los polímeros de fructosa tienen muchas aplicaciones como edulcorantes, y los polímeros de cadena larga forman emulsiones con textura parecida a grasas y sabor natural. El tracto digestivo de humanos no contiene enzimas capaces para degradar los polímeros de fructosa; inulina y oligofructosa, también llamados prebióticos. El consumo de estos compuestos, se cree que puede ayudar a regenerar la flora intestinal, y así prevenir las infecciones, hay un gran interés de la industria de los alimentos para usarlos como ingredientes en comidas con bajo contenido de calorías. En las plantas adicionalmente a su función de reserva de carbohidratos; han sido implicados en la protección de las plantas contra la congelación (Livingston y Henson 1998), los daños causados por la sequía o por bajas temperaturas. Las cualidades de resistencia y capacidad productiva de los *Agaves* pueden ser mejoradas mediante la ingeniería genética, introduciendo genes que permitan incrementar metabolitos benéficos específicos en las plantas de cultivo, como en el caso reportado por Se'venier, *et al.*, 2002, en el que modifican genéticamente plantas de betabel, de tomate y otras más, para hacerlas más nutritivas induciendo la acumulación de fructanos de donde se pueden extraer para uso industrial o para elevar los niveles de antioxidantes naturales de plantas de tomate. Actualmente los usos con mayor importancia económica para México son: la elaboración de Tequila, Mezcal, Pulque y fibras textiles de Henequén y Lechuguilla (Valenzuela 2003; Maiti 1995). Esta importancia es notoria ya en la legislación publicada de la "Norma Oficial Mexicana" (SECOFI en 1994), en relación a las bebidas alcohólicas denominadas Tequila se especifica que estas plantas pueden ser utilizadas en la elaboración de ésta bebida y describen las regiones de donde se originan. Aunque habría que mencionar que la descripción de la especie autorizada, no incluye características específicas inequívocas, por lo que se dificulta mucho la identificación asertiva de las mismas. La industria del Tequila se ha desarrollado principalmente en los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas, que son los lugares en donde son cultivados los *Agaves* (SECOFI 1993, 1994a, b) incluidos en "La Denominación de Origen" requerida por la "Ley de Invenciones y Marcas" y por la "Norma Oficial Mexicana". Las especies que se han explotado más tradicionalmente son los *Agaves*: *tequilana*, *sisalana*, *fourcroydes*, *salmiana*, *mapisaga* y *atrovirens*, solo por mencionar algunos. Ornamentalmente las especies que más se han aprovechado son *Agave americana* y el *Agave victoriae-reginae*.

6.6 Elección de la Serie Striatae para estudio

Los representantes del Subgénero *Agave* tienen mayor cantidad de cromosomas y son principalmente poliploides a diferencia de los *Agaves* del Subgénero *Littaea* que tienen menor cantidad de cromosomas y son diploides (Granados 1993). En el subgénero *Littaea* las especies que tienen menor número cromosómico son las de la Serie Striatae y la que tiene menor número de cromosomas es *A. striata* con solo 25 cromosomas. Lo que sugiere que pudieran ser más recomendables para realizar estudios moleculares por su simplicidad genética.

6.7 Distribución de las especies de la Serie Striatae

Existen cuatro especies con una Subespecie en la Serie Striatae. Gentry en 1982 consideró en ésta Serie a *Agave striata* (especie tipo), dos subespecies (*A. striata striata* y *A. striata falcata*), *A. dasylirioides* y *A. stricta*, recientemente, se incluyó a *A. tenuifolia* (Zamudio y Sánchez 1995) como se muestra en la Figura 2. Existen otras posibles especies o variedades en proceso de descripción como: *A. reginae-montana*, *A. striata nana*, *A. dasylirioides minor*. En México las especies del Grupo Serie Striatae se distribuyen principalmente en el oriente de la meseta central de la República hacia sus partes áridas. *A. striata striata* y la subespecie *A. s. falcata* son las especies más importantes por su abundancia. *A. striata* tiene su mayor presencia en los estados de Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Coahuila en el Norte desde los límites fronterizos con Estados Unidos de Norteamérica aunque también se les localiza en menor número al Sur en Querétaro, Hidalgo y Zacatecas. *Agave. s. falcata* tiene una distribución casi exclusiva de Coahuila aunque también se ha localizado al Norte y Sur de Nuevo León. Les siguen en importancia por su distribución *A. dasylirioides* distribuida principalmente en lo alto de las montañas desde San Luis Potosí y Morelos hasta los límites de la frontera con Guatemala, pudiéndose distribuir en contadas localidades hasta la República de El Salvador. *Agave. stricta* se localiza en partes bajas exclusivamente en el Estado de Puebla. *Agave tenuifolia* se localiza en el estado de Hidalgo y posiblemente en estados más al norte como San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León. *Agave striata var. nana*, *Agave dasylirioides minor* y *Agave reginae-montana*, son de menor distribución localizados en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí y Nuevo León respectivamente.

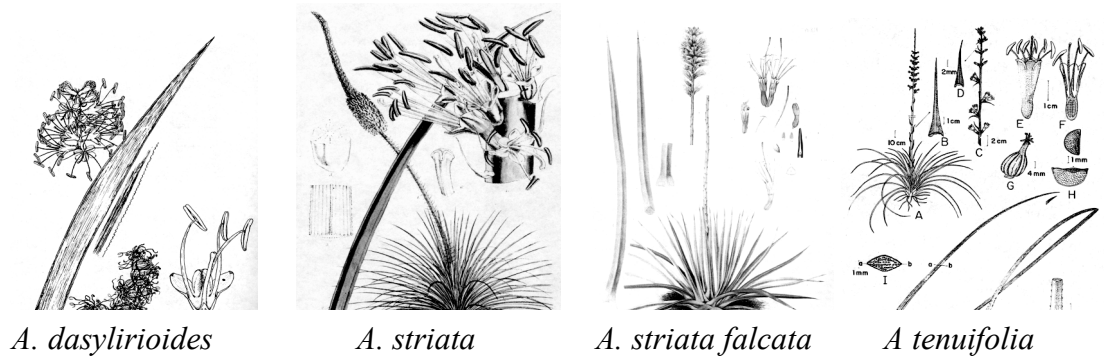


Figura 2. Aspecto de algunas especies de Agaves la Serie Striatae. El aspecto general entre las plantas de Agave es muy similar, solo con diferencias en las hojas: en grosor en número y en tamaño que en ocasiones resultan indistinguibles.

Existe la posibilidad de que la Serie Striatae pudiera ocultar relaciones taxonómicas diferentes de las reportadas, ésta posibilidad se incrementa dadas las características tan semejantes y la diversidad de sus habitat. Por ejemplo, las especies *A. s striata*, *A. s falcata* al ser comparada con *A. tenuifolia* presentan características morfológicas muy semejantes y aunque difieren principalmente en dimensiones y preferencias por ambientes xerófitos, pudieran tratarse de variantes en forma de una misma especie, pues en ocasiones resulta casi imposible diferenciarlas por su morfología como sucede con las características de las flores de *A. s striata* de diferentes localidades (Figura 3).

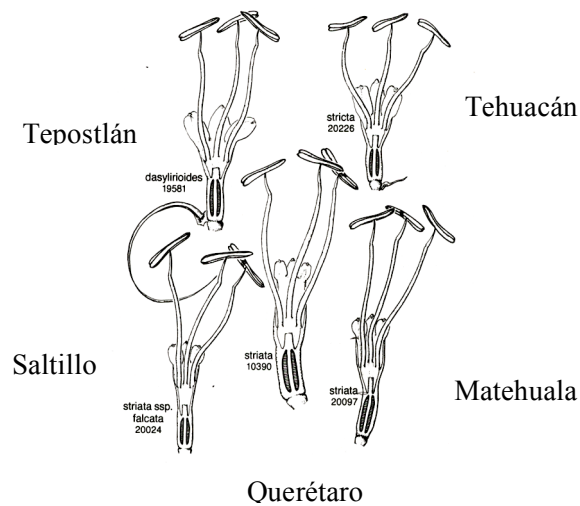


Figura 3. Comparación morfológica entre cortes longitudinales de flores Agaves striatae. Las diferentes partes de la flor de una misma especie presenta variaciones en tamaño aún cuando estas características son uno de los principales criterios morfológicos en la taxonomía de agaves de la serie Stratae. *A. striatae* de Querétaro Qro. y Matehuala S.L.P., *A. striata falcata* de Saltillo Coah., *A. dasylirioides* de Tepostlán Mor., y *A. striata* de Tehuacán Puebla.

6.8 Regiones genómicas utilizadas en sistemática

Los métodos moleculares han demostrado ser de enorme utilidad al permitir identificar con precisión especies, subespecies, definir relaciones filogenéticas y también de explicar la dinámica de sus poblaciones (Arnheim *et al.*, 1990; Davis, 1996; Manos 1997; Strand *et al.*, 1997). Algunos de los criterios moleculares que usualmente se toman en cuenta para seleccionar la región del genoma en estudios de taxonomía molecular y filogenética son: 1) Categoría Taxonómica del grupo de organismos que se piensa comparar; Orden, Familia, Género, Especie, etc. 2) Organelo de donde procede la secuencia nucleotídica; núcleo, mitocondria ó cloroplasto. 3) Número de copias existentes de la secuencia; únicas, medianamente repetidas o altamente repetidas y otras más según sea el caso. Una de las regiones mas estudiadas para establecer las relaciones filogenéticas entre categorías taxonómicas mayores de eucariotes, como Clase, Orden o Familia corresponden a secuencias conservadas repetidas (Figura 4) de los genes ribosomales 28S, 5.8S y 18S (Stefanovic *et al.*, 1998; Kuzoff *et al.*, 1998; Starr *et al.*, 2003), así como secuencias conservadas de genes únicos, por ejemplo el de la enzima Ribulosa 1,5 carboxilasa.

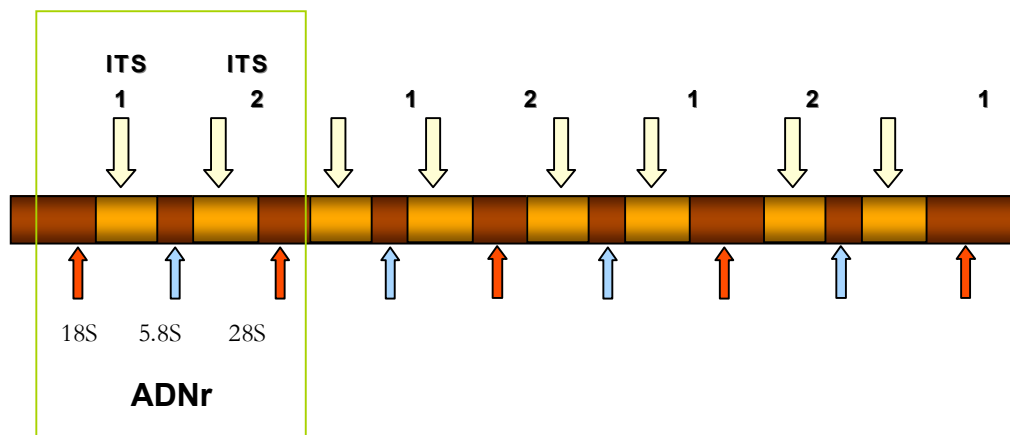


Figura 4. Estructura de la región que contiene los ADNs ribosomales. El diagrama representa las Secuencias Internas Transcritas ITS 1 y 2 intercaladas entre cada unidad de los ADNr 18S, 5.8 S y 28S dispuestos en tándem cientos de veces.

Otras secuencias muy utilizadas para estudios de taxonomía molecular a nivel de Género y Especie son las dos regiones espaciadoras entre los genes ribosomales, llamadas Secuencias Internas Transcritas, ITS1 y 2 (Figura 4) A diferencia de las secuencias 18S y 28S, éstas secuencias frecuentemente presentan mayor variabilidad nucleotídica, por lo que resultan muy útiles para estudios taxonómicos a nivel de especie, ya que por no ser codificantes, permiten acumular mayor número de mutaciones que otras regiones altamente conservadas (Kelly, 1988; Koch *et al.*, 2003; Kornkeven *et*

al., 1998; Moller Cronquist 1997, Manos 1997; Yungbae 1993). En la mayoría de las células eucarióticas existen cientos de copias de las regiones ITS1 y 2 al igual que de los genes ribosomales, los que son necesarios para mantener la demanda de ribosomas durante las etapas tempranas de desarrollo embrionario. Otros genes con múltiples copias son también utilizados en taxonomía como los ARNr 5 S, ARNnp U1 y U2 o los que codifican para las histonas, y las diferentes categorías de ADN satélite (Alberts *et al.*, 1994).

6.9 Análisis de la secuencias nucleotídicas en *Agaves*

Bogler *et al.*, en 1995 y 1996 analizaron la asociación a nivel evolutivo entre el género *Yucca* y las palomillas que las polinizan, utilizando tres secuencias nucleotídicas: ADN del Cloroplasto (ADNcp) y las secuencias ITS1 y la ITS2. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron que era falsa una supuesta asociación de mutualismo obligado entre palomillas que las polinizan y especies de *Yucca*. Además, estos estudios filogenéticos indicaron que no todos los Géneros de la Familia proceden de un ancestro común por lo que son de origen polifilético. Estos mismos autores estudiaron la filogenia de las Agavaceas en base a la variación de las secuencias ITSs del ADNr, lo que mostró que varios géneros considerados dentro de la familia pueden ser separados en dos grupos: *Agave*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes*, *Beschorneira*, *Furcraea*, *Yucca* y *Hesperaloe* con *Hosta* en la base de la rama. El segundo grupo esta constituido por *Dracaena*, *Sansevieria*, *Maianthemum*, *Aspidistra*, *Convallaria*, *Nolina*, *Dasylyrion*, *Beaucarnea* y *Calibanus*.

En base a los antecedentes mencionados, elegimos las regiones ITS1 y 2 para analizar las secuencias nucleotídicas de los *Agaves* de la serie *Striatae* que permitieran determinar la existencia de marcadores útiles en la taxonomía del subgénero *Littaea*. Para esto, realizamos la amplificación mediante PCR de las regiones ITSs, la secuenciación y el análisis de las secuencias nucleotídicas de los *Agaves*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención del material biológico

La colecta de *Agaves* se realizó en los sitios descritos por Gentry 1982, según el mapa que se muestra en la Figura 5, con las excepciones de las localidades de la especie *A. tenuifolia* descrita por Zamudio y Sánchez en 1995.

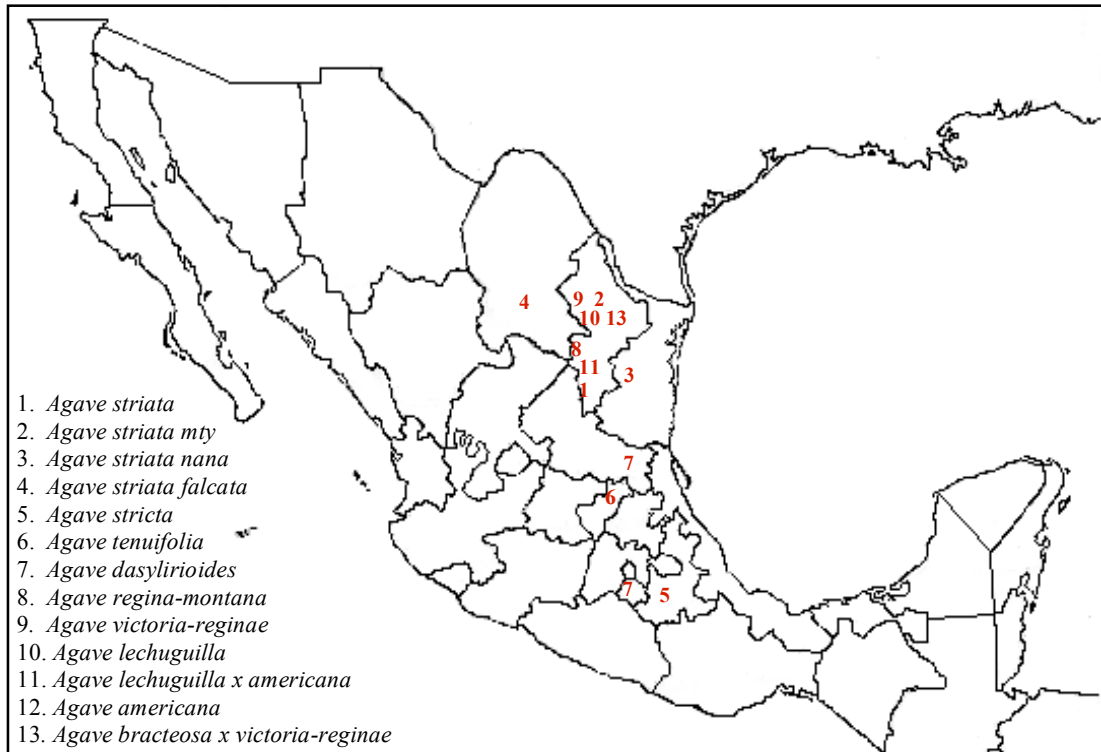


Figura 5. Áreas de colecta de Agaves. En el mapa se indican las localidades de colecta de las especies de la Serie Striatae, principalmente localizadas en el Noreste y Centro de México en los Estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro, Puebla y Morelos.

Los ejemplares de las especies a estudiar se mantuvieron vivos para tener material fresco de donde extraer ADN durante toda la realización de esta tesis. En la

Tabla III se enlistan las especies y los Estados de donde se colectaron las muestras de los diferentes *Agaves*.

TABLA III

Origen de las especies de *Agaves* utilizadas en la tesis

<i>Agave</i>	Municipio	Estado
<i>A. striata ssp striata</i>	Dr. Arroyo	Nuevo león
<i>A. striata</i>	Sta. Catarina (Huasteca)	Nuevo león
<i>A. striata var. nana</i>	Ocampo	Tamaulipas
<i>A. striata ssp falcata</i>	Paila	Coahuila
<i>A. stricta</i>	Atenayuca - Zapotitlán	Puebla
<i>A. tenuifolia</i>	Landa de Matamoros	Querétaro
<i>A. dasylirioides</i>	Tepoztlán	Morelos
<i>A. dasylirioides</i>	Xilitla	San Luis Potosí
<i>A. reginae-montana nv sp</i>	Galeana	Nuevo león
<i>A. victoriae-reginae</i>	Sta. Catarina (Huasteca)	Nuevo león
<i>A. lechuguilla</i>	Sta. Catarina (Huasteca)	Nuevo león
<i>A. lechuguilla x A. americana</i>	Aramberri	Nuevo león
<i>A. americana</i>	Galeana	Nuevo león
<i>A. bracteosa x victoriae-reginae</i>	Sta. Catarina (Huasteca)	Nuevo león

7.2. Extracción de los ADNs genómicos de los *Agaves*

La extracción del ADN genómico se realizó mediante la modificación de la técnica de Sullivan *et al.*, 2000 como se describe a continuación:

Esta técnica consistió en macerar el tejido en buffer A (Tris-HCl pH 7.5, EDTA, NaCl₂ y SDS) posteriormente la muestra se incubó a 65°C por 30 minutos y se le adicionó el buffer B (KOAc 5 M y LiCl₂ 6M) incubándose por 1 hora a 4°C. Este buffer actúa en la precipitación de proteínas así como en la del RNA. Terminado el tiempo de incubación se centrifugó a 14,000 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos para posteriormente transferir 1ml del sobrenadante en un tubo nuevo. Una vez realizada la transferencia del sobrenadante se adicionaron 500 µl de isopropanol y se centrifugó por 15 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, se descartó el sobrenadante y

se lavó la pastilla con 200 µl de etanol al 70 % centrifugándose nuevamente durante de 5 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó a 37°C por unos minutos y se resuspendió la pastilla en 25 µl de agua miliQ

7.3 Diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación de las regiones ITS1 y 2

Los oligonucleótidos específicos para los ITSs se diseñaron en base a las secuencias previamente descritas por Bogler *et al.*, en 1995. Las secuencias de oligonucleótidos específicos para los ITSs se describen en el Anexo I. A falta de una secuencia de referencia completa de la familia Agavaceae, el análisis virtual se efectuó empleando la secuencia de *Tasmania lanceolata* perteneciente a la familia Winteraceae, a partir de donde se diseñaron los oligonucleótidos que usamos para la amplificación (Anexos I y II , Bogler *et al.*, 1995).

Se utilizó el programa Amplify 1.2 para llevar a cabo una simulación virtual de la amplificación del ADN de los *Agaves*. El análisis mostró un 100% de complementariedad con la secuencia de referencia y además coincidió con el tamaño de los fragmentos que se esperaban amplificar de 411 y 372pb como se muestra en la Figura 6. Además, se analizaron los oligonucleótidos usando el programa OLIGO para verificar que no presentaran estructuras secundarias. y la aparición de horquillas.

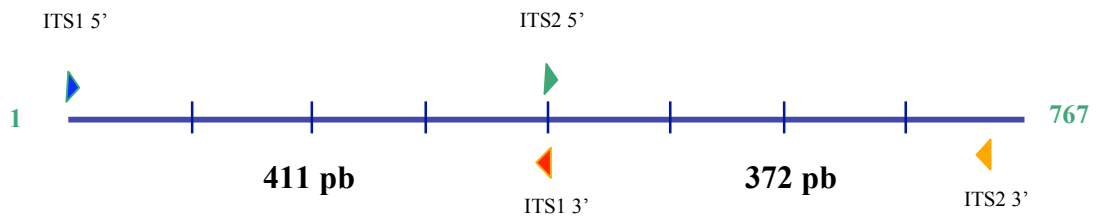


Figura. 6 PCR virtual de la regiones ITSs de *T. lanceolata*. Representación lineal de las regiones ITS1, 5.8S, y ITS2 de *T. lanceolata* para determinar el tamaño del segmento a amplificar.

7.4. Amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 y 2 de los *Agaves*

La amplificación mediante PCR (Mullis *et al.*, 1986) de las regiones ITS1 y 2 de *Agaves*, se realizó con un cocktail que contiene 2.5 µl amortiguador B 10X para la Taq polimerasa (200 mM Tris - HCl pH 8.4., KCl 500 mM; Invitrogen Life technologies), 1.50 µl MgCl₂ 25 mM., 0.25 µl dNTPs 25 mM., para ITS1 [0.3 µL, de Oligo N° 1, 5

μM , 0.6 μL de Oligo N° 2, 5 μM .] ó para ITS2 [0.25 μl , de Oligo N° 3, 16 μM , 0.5 μl , de Oligo N° 4, 16 μM .], 0.25 μl de Taq polimerasa con 5 U/ μL y 1.0 μl de ADN genómico de *Agave* 300 ng/ μl . Este cocktail corresponde a una reacción con un volumen final de 25 μl (Tabla IV). El cálculo de la temperatura de alineamiento de los oligos se analizó con el promedio de las temperaturas de fusión (T_m), obtenido en cada oligo sumando 2° C por cada Adenina y otros 2° C por cada Timina presente y 4° C por cada Guanina y Citocina y al valor de la suma de estas temperaturas se le restan 5° C (Barrera *et al.*, 1993). El programa a utilizar consistió de una temperatura inicial desnaturalizada de 94° C durante 5 minutos para separar la doble cadena del ADN genómico. En el caso de la amplificación de los ITS1 el ciclo de temperaturas consistió de un primer paso de 94° C / 1 min, el segundo paso fue de 58° C / 1 min para alinear los oligos y el tercer paso a 72° C / 1min para efectuar la extensión. En el caso de la amplificación de los ITS2 el ciclo de temperaturas consistió de un primer paso de 94° C / 1 min, el segundo paso fue de 51.4 ° C / 1 min para alinear los oligos y el tercer paso a 72° C / 1min para efectuar la extensión. En ambos casos este proceso se repitió 35 veces y se aplicó una temperatura de 72° C / 10min para finalizarlos (Tabla V). Una vez obtenidos los productos de PCR, se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

TABLA IV

Componentes de la mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las regiones ITSs de Agaves

REACTIVOS	ITS1	ITS2
Buffer 10X	2.5 μl	2.5 μl
MgCl ₂ 25mM	1.5 μl	1.5 μl
Oligo 5' ITS1 5 μM	0.3 μl	–
Oligo 3' ITS1 5 μM	0.6 μl	–
Oligo 5' ITS2 16 μM	–	0.25 μl
Oligo 3' ITS2 16 μM	–	0.5 μl
dNTPs 25 μM	0.25 μl	0.25 μl
Taq Polimerasa 5U/ μl	0.25 μl	0.25 μl
H ₂ O miliQ	18.6 μl	8.75 μl
ADN de <i>Agave</i> 150ng/ $\square\text{l}$	1.0 μl	1.0 μl
Volumen Final de reacción	25 μl	25 μl

TABLA V

Temperaturas durante el proceso de amplificación por PCR de las regiones ITSs de Agaves

Etapas	ITS1	ITS2
Inicio	94.0 ° C / 5 min	94.0 ° C / 5 min
Primer paso	94.0 ° C / 1 min	94.0 ° C / 1 min
Segundo Paso	58.0 ° C / 1 min	52.0 ° C / 1 min
Tercer Paso	72.0 ° C / 1 min	72.0 ° C / 1 min
Ciclos	35X	35X
Final	72.0 ^a C / 10min	72.0 ^a C / 10min

7.5. Análisis del ADN mediante electroforesis en gel de Agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en TBE (Tris Base , Ácido Bórico y EDTA) el cual se depositó en una cámara de electroforesis, cubriéndolo con TBE 1 X. La preparación de la muestra se realizó tomando 5 µl del DNA obtenido y se mezcló con 2 µl de jugo azul 6X (Azul de Bromofenol 0.25%, Xilen cianol 0.25% y Glicerol). Una vez listas las muestras, se colocaron en los carriles del gel y se llevó a cabo la electroforesis a 80V y después de 10 min. se incrementó a 100 V durante una hora dependiendo de cada muestra. Concluido el corrimiento, se tiñó el gel con una solución de Bromuro de etidio (2 µg/µL) por 10 min y se colocó en un transiluminador (Dinco & Rhenium Industries Ltd. Hi- Tech Technologies) de luz UV para observar el resultado obtenido (Sambrook, Maniatis F. 1989).

7.6 Clonación de los fragmentos amplificados ITS1 y 2 en el vector pCR 2.1

Se realizó la ligación en un tubo eppendorf colocando 4 µl del producto de PCR (aproximadamente 50 ng/µl), 1µl de solución salina (NaCl 1.2 M, MgCl₂ 0.06 M), 1 µl del vector pCR 2.1 como lo provee la compañía (Invitrogen). Se mezcló cuidadosamente y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez concluido el tiempo de incubación se colocó el tubo a 4° C y se realizó el proceso de transformación, descongelando cuidadosamente en hielo una alícuota de 50µl de bacterias *Escherichia coli* calcio competentes, conseguido esto se le agregó 2µl de la mezcla de ligación y se

incubó en hielo por 30 minutos. Siguiendo al tiempo de incubación, se dio un choque térmico a las células por 30 segundos en un baño maría con agua a 42° C e inmediatamente se colocó de nuevo en hielo, prosiguiendo con un período de recuperación el cual consistió en agregar al tubo 250µl de medio SOC (1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl y 20 mM de glucosa) a temperatura ambiente y se incubó por 1 hora en el agitador a 37° C y 200 rpm. Después de la incubación, se dispersaron 50µl de medio con las células transformadas en cajas de petri con LB (1 %, triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl, 1.5% Agar, ampicilina 50 µg/ml), mismas que previamente se les distribuyó uniformemente 40 µl de X Gal 40 mg/ml para incubar a 37° C durante toda la noche. En aquellas clonas en donde se insertó el producto de amplificación como fue previsto, se interrumpió la secuencia del gene beta galactosidasa (β -Gal) lo que no permitió la expresión de éste último, por lo que las clonas portadoras del inserto fueron de color blanco; a diferencia de las clonas sin inserto, en donde la expresión de β -Gal, permitió la reacción colorimétrica mostrando el color indicativo azul en las colonias. Posterior a esta incubación se aislaron nueve clonas por espécimen para formar una colección con la cual disponer de material para permitir la recuperación del ADN plasmídico y recuperar el inserto. En este proceso se escogieron solo colonias blancas perfectamente aisladas y se sembró cada una en 3 ml de medio LB adicionado con ampicilina 50 µg/µl, se incubaron toda la noche en agitación a 37° C / 250 rpm. Al día siguiente, se tomaron 1.5 ml de las células cultivadas y fueron centrifugadas en un tubo eppendorf a 14,000 rpm para descartar el sobrenadante y recuperar la pastilla con células. Enseguida, se procedió a la obtención de ADN plasmídico mediante la lisis alcalina según Birnboim y Dolly en 1979, para lo cual se resuspendió la pastilla con células en 150 µl de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8,0), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, al final de lo cual se agregaron 150 µl de solución II (NaOH 0.2 N, SDS1%) mezclando por inversión y posteriormente se adicionaron 150 µl de solución III (Acetato de Potasio 3M, Ácido Acético Glacial 2 M) mezclando por inversión y se incubó 5 min a -20° C. Después de realizar lo anterior se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 5 min, se transfirieron los sobrenadantes individualmente a otros tubos estériles, se les agregó 500 µl de isopropanol al 100% frío y se mezcló e incubó a -20° C por espacio de 10 min. A continuación, se centrifugó en los mismos tubos a 14,000 rpm por 5 min. Acto seguido se descartaron los sobrenadantes, se lavaron las pastillas que contenían el ADN utilizando 400 µl de etanol al 70 % agitando en vortex y finalmente se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 5 min para luego decantar el etanol remanente y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente por unos 2 o 3 minutos a 37° C para enseguida resuspender las muestras en 20 µl de agua miliQ con ribonucleasa (10 µg/ml). Las muestras de ADN fueron digeridas con la enzima de restricción *Eco* R1 para liberar el inserto clonado, se tomaron 3 µl de cada muestra de ADN 100 ng/µl y a cada una se les agregaron 7 µl de una mezcla de digestión, 1 µl de amortiguador 1X (New England BioLabs Inc.; 50mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100 pH 7.5), 0.3µl de enzima *Eco* R1 20 U/µl y 5.7 µl de agua miliQ. La reacción se incubó por 4 h a 37° C al término y para analizar la reacción, se le agregaron 2 µl de jugo azul 6X [6% glicerol, 0.1 m Na₂ EDTA pH 8, 1.0% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) 0.25% Azul de Bromofenol, 0.25% Xylene Cyanol]. Concluido esto, se analizaron en geles de

agarosa al 2 % los productos de la digestión comparándolos con marcadores de peso molecular específicos, corridos junto con las muestras.

7.7 Análisis de las secuencias nucleotídicas de los *Agaves*

Para obtener las secuencias nucleotídicas de las clonas aisladas, se prepararon aproximadamente 2 µg del ADN mediante la técnica de mini-preparación con lisis alcalina previamente descrita. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos (Reverse 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3' y Forward 5' G TAA AAC GAC GGC CAG 3') derivados del fago M13 marcados con un cromóforo IR-800 que es detectado por luz infrarroja utilizando la técnica descrita por Sanger *et al.*, en 1977. Se utilizó el secuenciador "DNA Sequencer Long reader 4200 LI-COR IR2 semiautomático". Se realizó un análisis visual para confirmar la correspondencia de las imágenes del registro directo obtenido del secuenciador con cada secuencia. Después, se efectuaron los alineamientos múltiples y la comparación de las secuencias usando el programa Lasergene (DNASTAR INC., Madison Wis. 2001) para alineamientos múltiples, MegAlign, Clustal y Jotun Hein Method 1990, con el cual se obtuvieron los porcentajes de identidad y los grados de divergencia.

8. RESULTADOS

8.1 Colecta de *Agaves*

Los *Agaves* fueron colectados en las áreas indicadas en el mapa de la Figura 5, los municipios de origen de las diferentes especies utilizadas en esta tesis están descritos en la Tabla III. Las características morfológicas más sobresalientes de todas las especies de *Agaves* e híbridos colectados, se muestran en las Figuras 7 a 19 como se describe a continuación:

Figura 7. *Agave striatae*: La colecta de *A. striata* se realizó en el municipio de Dr. Arroyo NL A) La planta presenta múltiples hojas en forma de aguja B) Vástago floral típico del subgénero *Littaea*, C) Flores con pedúnculo floral muy corto. Generalmente después de florecer, la planta no muere y se ramifica formando agregados.

Figura 8. *Agave striata*: La colecta de éstos ejemplares de *A. striata* se realizó en paredes de roca del área de la Huasteca, de la Sierra Madre Oriental en NL. Estos *Agaves* son un poco más pequeños que los ejemplares del sur del estado y presentan menor número de hojas.

Figura 9. *Agave striata* var. *nana*: La colecta de *A. striata nana* se realizó en el estado de Tamaulipas. Esta variedad de la Serie *Striatae* corresponde a plantas muy pequeñas, con hojas muy cortas, en menor número y en forma de aguja.

Figura 10. *Agave striata falcata*: La colecta de *A. striata falcata* se realizó en el municipio de Paila Coahuila. A) Esta planta presenta aspecto ramificado, hojas más gruesas en forma de aguja y en menor número. B) Vástago floral típico del subgénero *Littaea* que posee flores de color rojizo (generalmente después de florecer, este *Agave* tampoco muere y se ramifica formando agregados.

Figura 11. *Agave stricta*: La colecta de *A. stricta* se realizó en el municipio de Atenayuca Puebla. Este *Agave* presenta múltiples hojas en forma de aguja, formando grupos y al igual que *Agave striata* después de florecer, la planta no muere y se ramifica formando agregados.

Figura 12. *Agave tenuifolia*: La colecta del *A. tenuifolia* se realizó en el municipio de Landa de Matamoros, Querétaro. Este *Agave* presenta un menor número de hojas en forma de aguja que *A. striata* pero más delgadas y más largas en donde resalta el vástago floral con pocas cápsulas. Después de florecer las plantas de ésta especie tampoco mueren y se ramifican formando agregados.

Figura 13. *Agave dasyliroides*: La colecta de *Agave dasyliroides* se realizó en los municipios de Tepoztlán del Estado de Morelos y Xilitla del Estado de San Luis Potosí. A) Hojas delgadas, aplanadas y anchas a diferencia del resto de

especies de la Serie Striatae. Crece en acantilados de montaña alta en los municipios de Tepoztlán del Estado de Morelos. B) Este *Agave* también se le localiza en el municipio de Xilitla en San Luis Potosí y en áreas colindantes en la Sierra Gorda del Estado de Querétaro, C) después de florecer las plantas de ésta especie tampoco mueren y se ramifican formando agregados.

Figura 14. *Agave reginae-montana*: Este *Agave* es una nueva especie de la Serie Striatae muy semejante a *A. striatae*, presenta hojas cortas en forma de aguja terminando en una espina semioculta y un penacho de fibras delgadas. Al igual que las otras especies de esta Serie, después de florecer las plantas tampoco mueren y se ramifican formando agregados.

Figura 15. *Agave victoriae-reginae*: El sitio de colecta de *A. victoriae-reginae* fue en la Huasteca en el Municipio de Santa Catarina en Nuevo León. Este *Agave* (planta de la izquierda) tiene hojas cortas en forma de pluma sin espinas laterales y en el extremo terminal de cada una tienen una espina compuesta por varias puntas en donde la central es más larga que puede ser ondulada. El *Agave* de la derecha corresponde a *A. bracteosa* que posee hojas muy flexibles y sin espinas.

Figura 16. *Agave lechuguilla*: El sitio de colecta de *A. lechuguilla* fue en la huasteca Municipio de Santa Catarina Nuevo León. Esta especie posee hojas lanceoladas con numerosas espinas pequeñas laterales dirigidas hacia abajo, todas unidas por un margen leñoso que se puede desprender de la hoja fácilmente y que se une por su extremo distal con una espina más larga algo acanalada.

Figura 17. *Agave lechuguilla* x *A. Americana*: Planta originaria del Municipio de Aramberri del estado de Nuevo León. Este tipo de cruce en estado natural es algo frecuente, presenta hojas anchas, algo carnosas y rígidas, lanceoladas con una región central clara, espinas laterales de color crema unidas entre sí por su base, con frecuencia tienen más de dos cúspides y vástago floral con pedúnculos florales cortos.

Figura 18. *Agave americana*: El sitio de colecta de *A. americana* fue en el Municipio de Galeana en el estado de Nuevo León. Esta especie es representativa de la Serie Americanae del Subgénero *Agave* posee hojas convexas dorsoventralmente, lanceoladas con numerosas espinas laterales de un solo tipo y no unidas entre sí. Las hojas en su extremo distal presentan una espina larga.

Figura 19. *Agave bracteosa* x *victoriae-reginae*: El sitio de colecta fue en el Municipio de Santa Catarina Nuevo León, (planta de la izquierda) posee hojas triangulares ligeramente curvadas, convexas dorsoventralmente en los márgenes tiene dientes pequeños y presentan una espina pequeña única en su extremo. El *Agave* de la derecha corresponde a *A. bracteosa* que posee hojas muy flexibles y sin espinas y un color verde pálido.

La mayoría de éstos *Agaves* se conservaron vivos para la toma de muestras de tejidos que permitió obtener la mejor calidad en los aislamientos de los ADN genómicos de las diferentes especies.

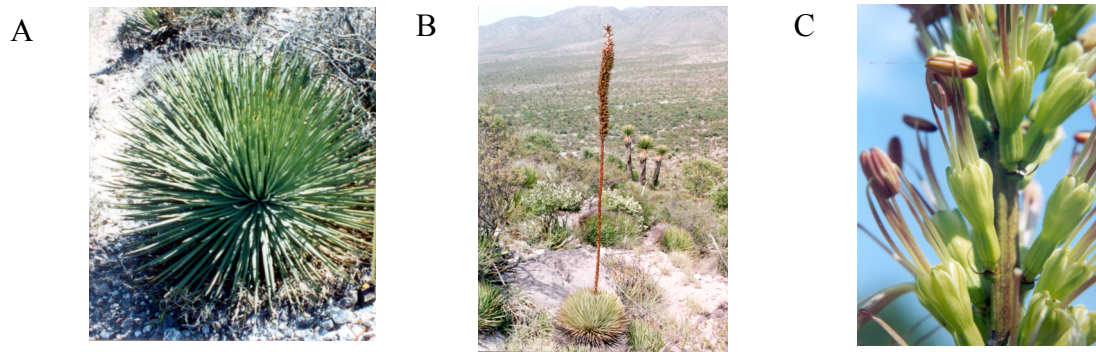


Figura 7. *Agave striata* (a)



Figura 8. *Agave striata* (b)



Figura 9. *Agave striata* var. *nana*



Figura 10. *Agave striata* *falcata*



Figura 11. *Agave stricta*



Figura 12. *Agave tenuifolia*

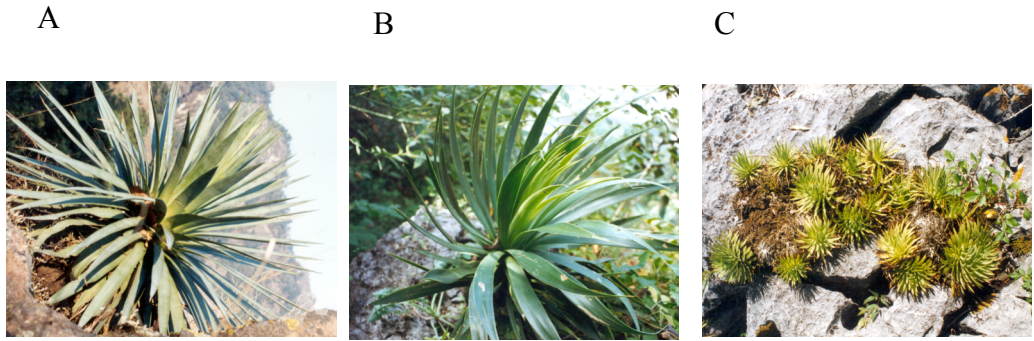


Figura 13. *Agave dasylirioides*



Figura 14. *Agave reginae-montana*.



Figura 15. *Agave victoriae-reginae* (izquierda)



Figura 16. *Agave lechuguilla*



Figura 17. Híbrido *Agave lechuguilla* x *A. americana*



Figura 18. *Agave americana*



**Figura 19. Híbrido *Agave bracteosa* x *A. victoriae-reginae*
(planta de la izquierda)**

8.2 Extracción de los ADNs genómicos de las plantas de *Agave*

El uso de diferentes técnicas para la extracción de los ADNs genómicos de *Agaves* mostró los mejores resultados con el método de precipitación con cloruro de litio, el cual fue adaptado en el laboratorio como se describió previamente en Materiales y Métodos.

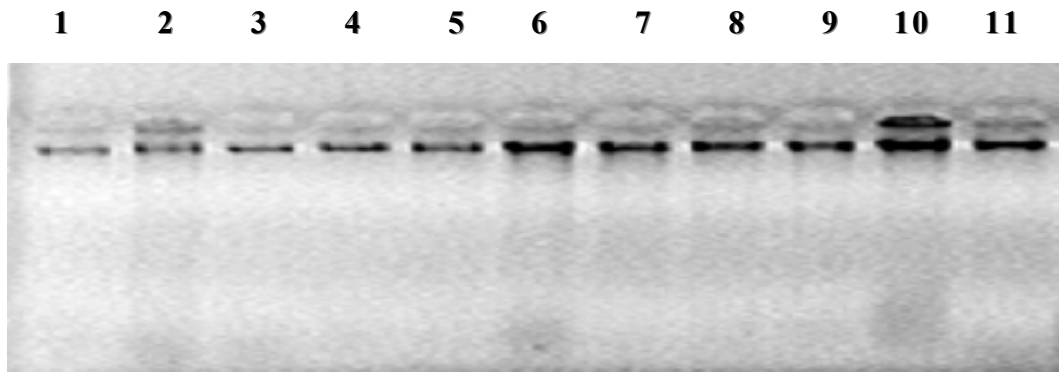


Figura 20. Extracción de ADN genómico de los Agaves de la Serie Sriatae. El ADN de las especies de *Agaves* fue obtenido, usando una modificación a la técnica de precipitación con LiCl_2 . Los ADNs genómicos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % : carril 1) *A. striata*, 2) *A. striata* sp *falcata*, 3) *A stricta*, 4) *A. tenuifolia*, 5) *A dasyliroides*, 6) *A. reginae-montana*, 7) *A. striata* var. *nana*. 8) *A. victoriae-reginae*, 9) *A. lechuguilla*, 10) *A. lechuguilla* x *americana*, 11) *A. americana*.

La Figura 20 muestra la integridad de los ADNs genómicos de las diferentes especies analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, en donde se observa una banda intensa, bien definida y sin degradación aparente. La alta estabilidad y la baja degradación de los ADNs genómicos obtenidos mostró además rangos de absorbancia 260/280 que variaron de 1.75 a 2.0, lo que muestra la buena calidad de los ADNs obtenidos.

8.3 Amplificación de las secuencias ITS1 mediante PCR

El ADN genómico de los *Agaves* fue amplificado mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicamente diseñados con anterioridad para amplificar la región ITS1 (Anexo I). El esquema en la Figura 21A representa la secuencia nucleotídica ITS1 flanqueada por los oligonucleótidos ITS1 5' y 3' utilizados para la amplificación. Los productos ITS1 de PCR analizados en geles de agarosa al 2%, muestran una banda única de amplificación que correspondió a aproximadamente 411 pb como se esperaba (Figura 21B).

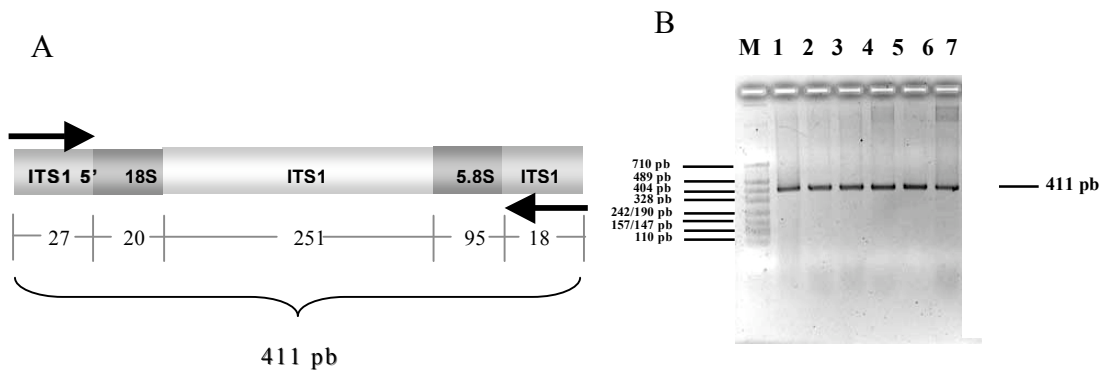


Figura 21. Amplificación mediante PCR de las regiones ITS1 de los *Agaves*. El diagrama en A) muestra la región ITS1 amplificada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos ITS1 5' y 3'. B) Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% muestran la banda de amplificación que correspondió como se esperaba a 411 pb. Carril 1) *A. striata*, 2) *A. striata* sp *falcata*, 3) *A. stricta*, 4) *A. tenuifolia*, 5) *A. dasylirioides*, 6) *A. reginae-montana*, 7) *A. striata* sp *nana*. M) contiene el marcador pBS+*MspI* de peso molecular.

8.4 Amplificación de las secuencias ITS2 mediante PCR

Los productos ITS2 amplificados utilizando los oligonucleótidos ITS2 5' y 3' (Figura 22A) fueron analizados en geles de agarosa en donde se muestra una banda única que correspondió a aproximadamente 372pb como se esperaba (Figura 22B).

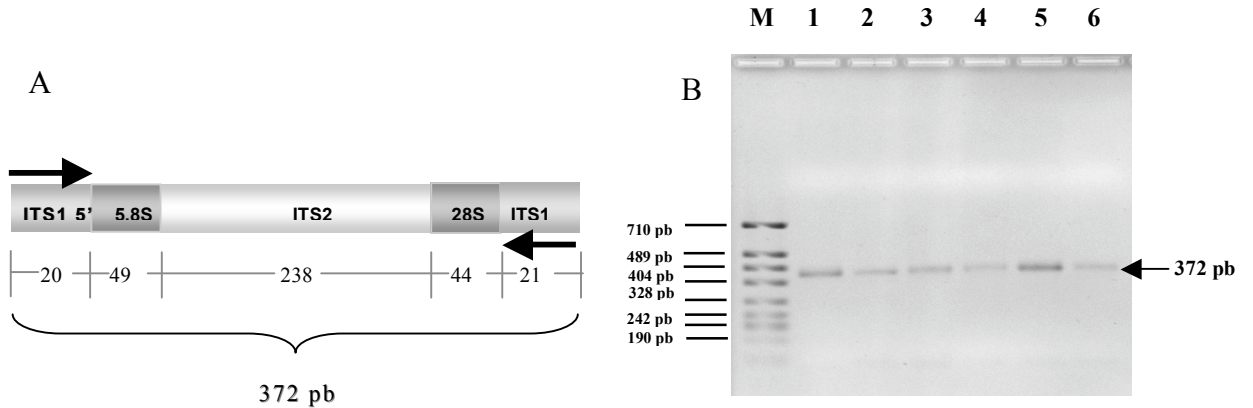


Figura 22. Amplificación mediante PCR de las regiones ITS2 de los ADN. El diagrama en A) muestra la región ITS2 amplificada utilizando los oligonucleótidos ITS2 5' y 3'. B) Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. La banda de amplificación correspondió 372 pb a como se esperaba: carril 1) *A. striata*, 2) *A. striata* sp *falcata*, 3) *A. stricta*, 4) *A. tenuifolia*, 5) *A. dasylirioides*, 6) *A. reginae-montana* y M) pBS+*MspI* es el marcador de peso molecular.

8.5 Clonación de las regiones ITSs en el plásmido PCR 2.1-TOPO

Los productos de la amplificación ITS1 y 2 se ligaron en el vector pCR TOPO 2.1 (Invitrogen) como se muestra en el esquema de la Figura 23A. Posteriormente, la transformación del inserto ligado con el plásmido pCR-2.1-TOPO, mostró en *E. coli* colonias blancas que son positivas y azules que no contienen el inserto Figura 23B. De estas colonias se cultivaron nueve clonas blancas por cada especie de *Agave* analizada. La Figura 23C muestra el ADN plasmídico extraído de las clonas positivas y analizado en gel de agarosa al 0.8 % en donde se puede apreciar que la banda del ADN plasmídico pCR TOPO 2.1 de referencia (carril 1) es como se esperaría ligeramente menor en peso molecular que las bandas de los plásmidos resultantes recombinantes con el inserto ITS1 (carriles 2 al 6) y con el inserto ITS2 (carriles 7 al 11).

8.6 Caracterización de las clonas recombinantes con Eco R1

Los plásmidos recombinantes pCR2.1-TOPO/ITS1 y 2 fueron sometidos a digestión con la enzima EcoR1 para liberar los insertos de ITS1 y 2 como se muestra en el esquema de las Figuras 24A y 25A. Los fragmentos liberados y analizados en

electroforesis en gel de agarosa al 2%, mostraron que las bandas correspondieron a los valores esperados liberando fragmentos de 428 y 389 pb respectivamente como se muestra en las Figuras 24B (carriles 3 al 12) y 25B (carriles 2 al 8).

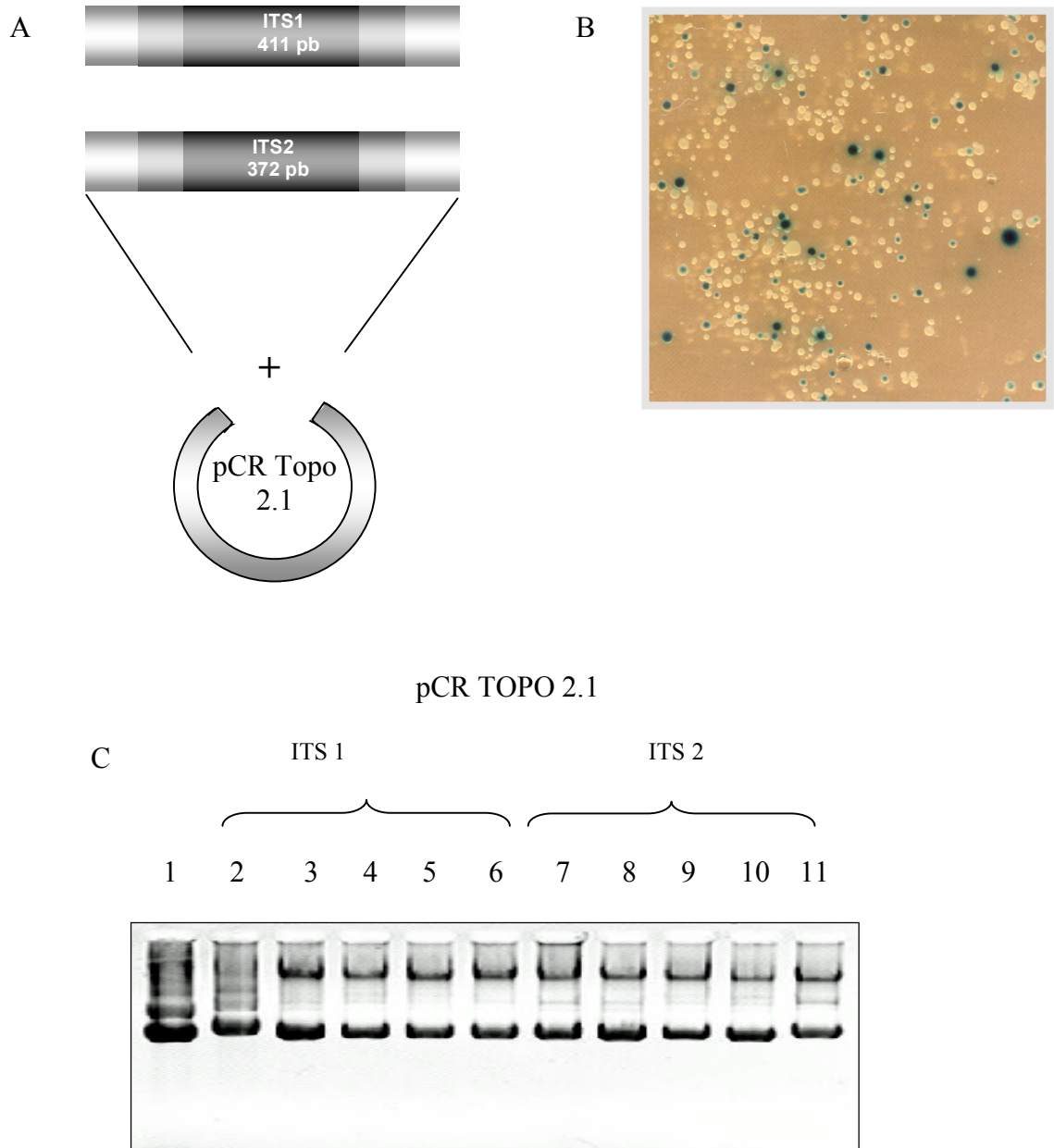


Figura 23. Clonación de las regiones ITS1 y 2 en el plásmido pCR TOPO 2.1. A) Representación esquemática de la ligación de los productos de amplificación ITS1 y 2 en el vector de pCR TOPO 2.1. B) La transformación de esta ligación mostró las colonias de *E. coli* transformantes blancas que son positivas y las azules que no contienen el inserto. C) El DNA plasmídico extraído fue analizado en gel de agarosa al 0.8%. DNA plasmídico pCR TOPO 2.1 (carril 1), pCR TOPO 2.1 ITS1 (carriles 2 al 6) y pCR TOPO 2.1 ITS2 (carriles 7 al 11).

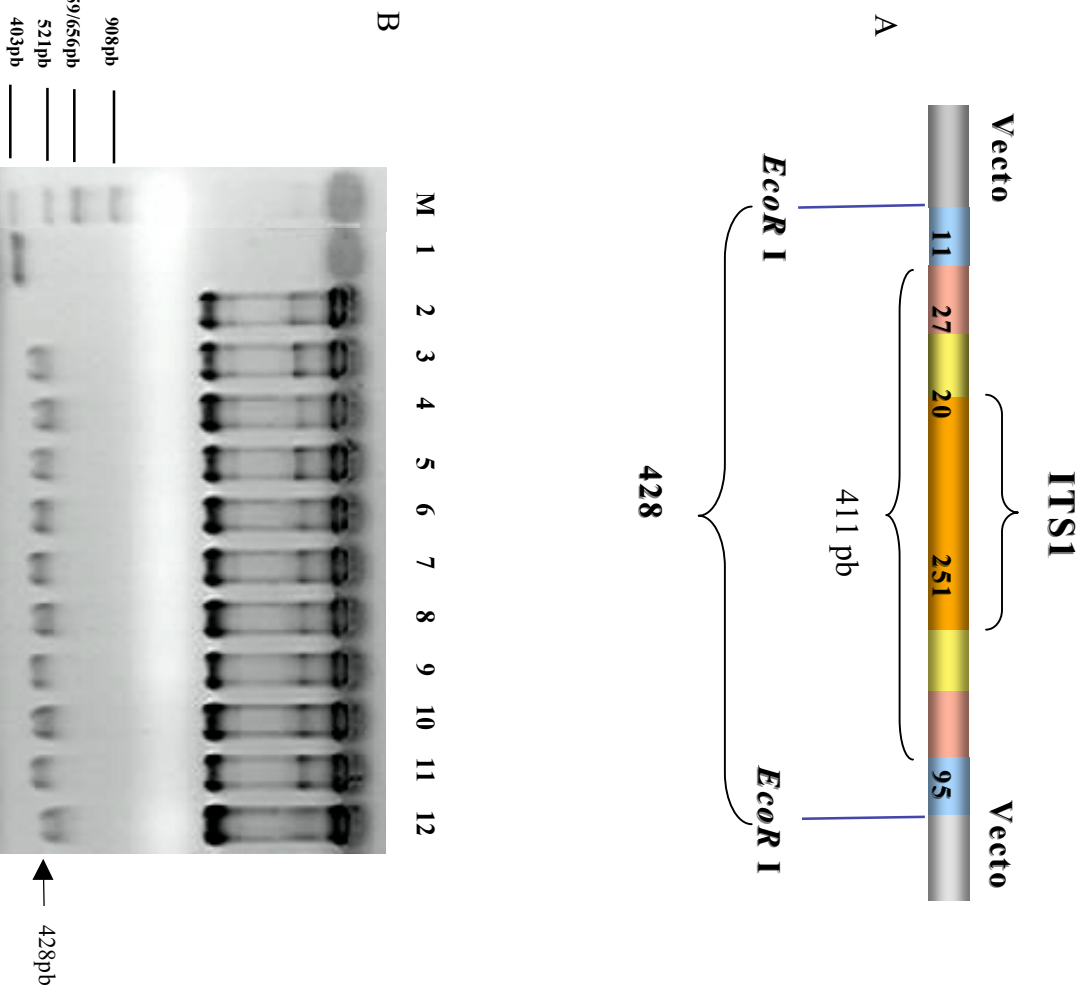


Figura 24. Caracterización de las clonas recombinantes PCR TOPO/ITS1 con la enzima de restricción *Eco* R1. A) Esquema que representa la estructura del inserto ITS1 en el vector PCR TOPO 2.1; se muestran los sitios *Eco*R 1 que flanquean al inserto de 428pb. B) Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de la digestión con *Eco*R 1 el carril 1 muestra el producto amplificado ITS1 de 411pb el carril 2 muestra el plásmido sin digerir, los carriles 3 al 12 las digestiones de los plásmidos recombinantes en los cuales se observa la liberación del inserto de 428pb. El carril M muestra el marcador de peso molecular pBR+*A*/l.

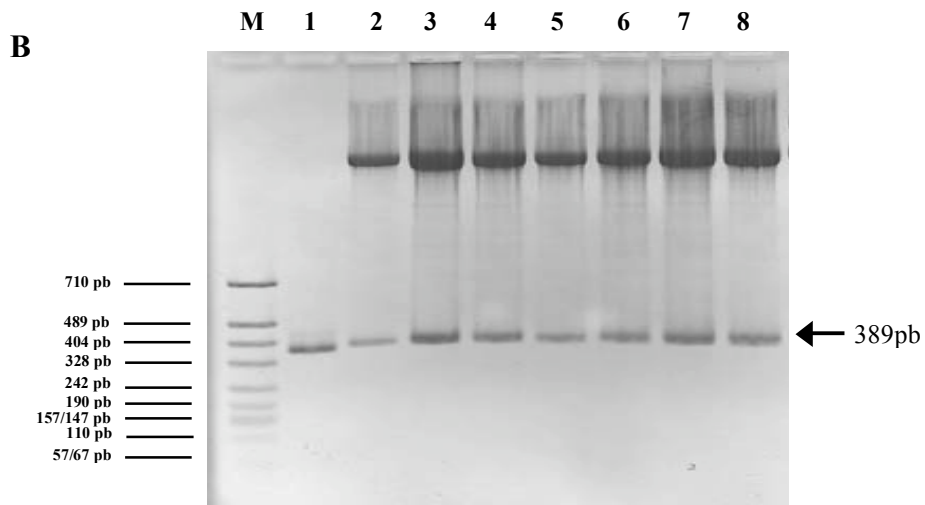
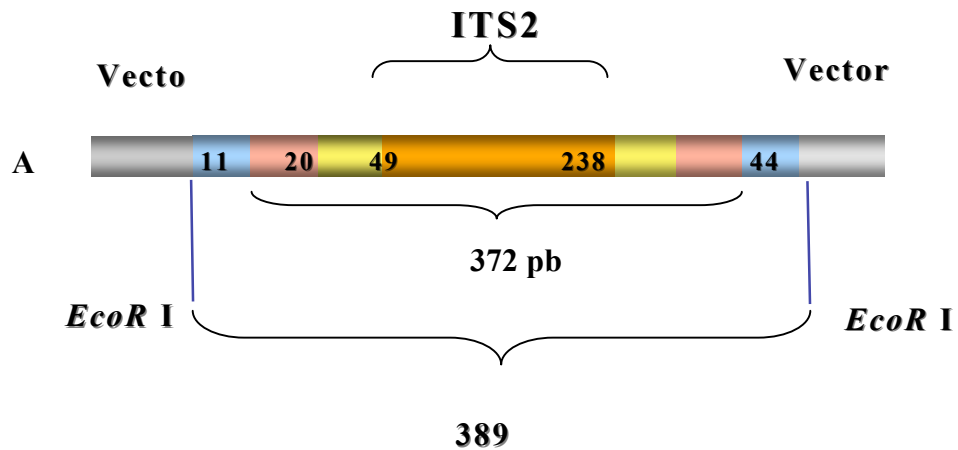


Figura 25. Caracterización de las clonas recombinantes pCR2.1 TOPO/ITS2 con la enzima de restricción *EcoR I*. A) Esquema que representa la estructura del inserto ITS2 en el vector pCR TOPO 2.1, con los sitios *EcoR I* que flanquean al inserto de 389pb, B) Gel de agarosa al 2% que muestra los productos de digestión con *EcoR I*. El carril 1) muestra el producto amplificado ITS2 de 372pb, los carriles 2 al 8 las digestiones con *EcoR I* de los plásmidos recombinantes en los cuales se observa la liberación del inserto de 389pb. El carril M muestra el marcador de peso molecular pBS+*MspI*.

8.7 Análisis de las regiones ITSs mediante secuenciación

De las clonas positivas se seleccionaron al azar al menos tres como mínimo por cada especie de *Agave* para obtener las secuencias nucleotídicas de los ITSs. El análisis de las diferentes secuencias nucleotídicas de los *Agaves* mostró la presencia de variantes

de secuencias no esperadas, dando un total de 25 secuencias nucleotídicas diferentes para los ITS1 y 24 secuencias para los ITS2 como se muestra en la Tabla VI.

TABLA VI
Secuencias nucleotídicas ITSs variantes

<i>Agave</i> Estado	Municipio	Nº de Agaves colectados	ITS1 Serie A (clave*)	ITS2 Serie B (clave*)
<i>A. striata ssp striata</i> Nuevo León	Dr. Arroyo	3	A2-2	B2-2 B2-4
<i>A. striata</i> Nuevo León	Sta. Catarina (Huasteca)	2	A5-3 A5-9	B5-3 B5-6
<i>A. striata var. Nana</i> Tamaulipas	Ocampo	4	A8-1	B8-2 B8-5
<i>A. striata ssp falcata</i> Coahuila	Paila	3	A3-2 A3-4	B3-5 B3-6
<i>A. stricta</i> Puebla	Atenayuca y Zapotitlán	3	A1-1	B1-2 B1-4
<i>A. tenuifolia</i> Querétaro	Landa de Matamoros	5	A4-1 A4-4	B4-1 B4-2 B4-4
<i>A. dasyliroides</i> Morelos	Tepoztlán	3	A24-6 A24-7	B24-1
<i>A. dasyliroides</i> San Luis Potosí	Xilitla	3	A22-7 A22-9 A23-5 A23-6	B22-6
<i>A. reginae-montana nv sp</i> Nuevo León	Galeana	15	A6-2	B6-3 B 6-9
<i>A. victoriae-reginae</i> Nuevo León	Sta. Catarina (Huasteca)	5	A12-7	B12-3 B12-6
<i>A. lechuguilla</i> Nuevo León	Sta. Catarina (Huasteca)	3	A13-2	B13-0
<i>A. lechuguilla x. americana</i> Nuevo León	Galeana	1	A15-1	B15-3 B15-10
<i>A. americana</i> Nuevo León	Galeana	1	A17-d2, A17-d1, A17-d3, A17-d4	B17-0
<i>A. bracteosa x victoriae-reginae</i> Nuevo León	Sta. Catarina (Huasteca)	3	31-1 31-3	B31-4
<i>Total</i>		54	25	24

*Las claves identifican a las clonas de las regiones ITS1 y 2 registradas como SerieA y B respectivamente

8.8 Alineamiento múltiple de las secuencias ITS1

El alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas ITS1 realizado con el programa Jotun Hein mostró que las secuencias nucleotídicas correspondieron a aproximadamente 251n como se esperaba (Tabla VII). La mayoría de las secuencias ITS1 analizadas presentaron sustituciones, microdeleciones y/o inserciones de 1 ó 2 nucleótidos como se muestra en Anexo III, con las excepciones de *A. dasyliroides* A23,5 , A22,7 y A22,9 y *A. victoriae-reginae* que presentaron una deleción de tres nucleótidos consecutivos en la misma región, que no se presentó en ninguna otra

secuencia estudiada, incluyendo las secuencias de *A. dasylirioides* del estado de Morelos (A24,6 y A24,7).

TABLA VII
No. de nucleótidos totales y clave de secuencias ITS1
utilizadas en el alineamiento múltiple

<i>Agave</i>	N° de nucleótidos totales (n)	Clave de identificación por clona ITS1
<i>A. striata striata</i>	250	A2,2
<i>A. striata striata</i>	249	A5,9
<i>A. striata striata</i>	249	A5,3
<i>A. striata var.</i>	251	A8,1
<i>A. striata falcata</i>	251	A3,2
<i>A. striata falcata</i>	250	A3,4
<i>A. stricta</i>	250	A1,1
<i>A. tenuifolia</i>	250	A4,1
<i>A. tenuifolia</i>	250	A4,4
<i>A. dasylirioides</i>	250	A24,6
<i>A. dasylirioides</i>	250	A24,7
<i>A. dasylirioides</i>	246	A23,5
<i>A. dasylirioides</i>	248	A23,6
<i>A. dasylirioides</i>	246	A22,7
<i>A. dasylirioides</i>	246	A22,9
<i>A. reginae-montana</i>	249	A6,2
<i>A. victoriae-reginae</i>	245	A12,7
<i>A. lechuguilla</i>	250	A13,2
<i>A. lechuguilla x americana</i>	250	A15,1
<i>A. americana</i>	251	A17,d1
<i>A. americana</i>	251	A17,d2
<i>A. americana</i>	251	A17,d3
<i>A. americana</i>	252	A17,d4
<i>A. bracteosa x A. victoriae-reginae</i>	250	A31,3
<i>A. bracteosa x A. victoriae-reginae</i>	251	A31,1
<i>Aspidistra elatior</i>	244	U24003
<i>Polygonatum biflorum</i>	246	U23988
<i>Maianthemum racemosum</i>	243	U23982

8.9 Árbol de las secuencias nucleotídicas ITS1 de los *Agaves*

La Figura 26 muestra el árbol fenético (Fenograma) de las secuencias nucleotídicas ITS1 analizadas utilizando el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star. El árbol consta de cuatro grupos de secuencias con diferente longitud y una escala inferior de 220.0 unidades que representa el número de sustituciones entre las secuencias nucleotídicas

analizadas. Las especies integrantes de la rama superior presentan las menores distancias filogenéticas, reconocibles por lo corto de las líneas que las unen y que en este caso, son las de menor extensión del árbol.

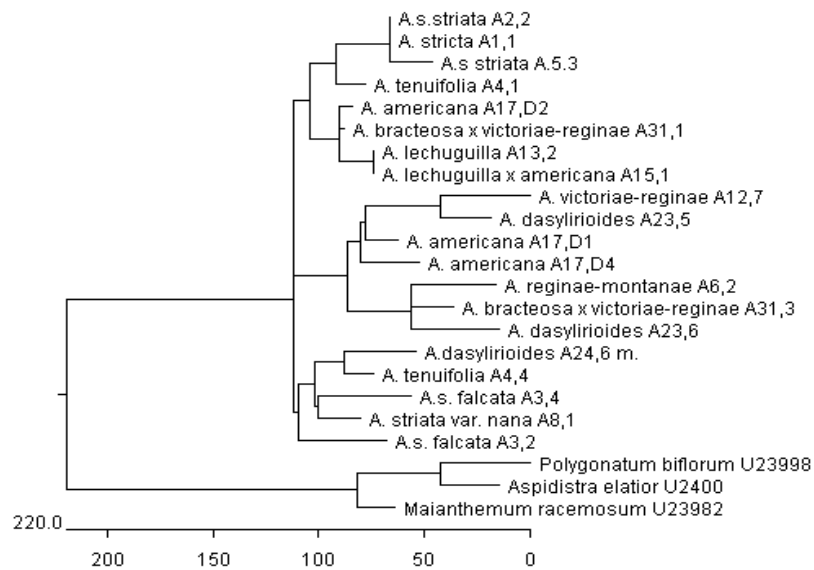


Figura 26. Fenograma de las secuencias ITS1 de los Agaves. El árbol fenético de las secuencias nucleotídicas de los Agaves se realizó utilizando el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star. Los números en la escala inferior indican el número de sustituciones entre las secuencias, se indican los nombres de las especies de Agave con su número de registro y se incluyeron las secuencias nucleotídicas del grupo externo de referencia *M. racemosum*, *A. elatior*, *P. biflorum* obtenidas del Banco de Secuencias Nucleotídicas (NCBI).

Esto último indica, el bajo número de sustituciones nucleotídicas entre las secuencias, indicadas con las unidades en la base del árbol. Las secuencias más cercanas entre sí son las de *A. striata* y *A. stricta*, *A. americana*, el híbrido *A. bracteosa* x *A. victoriae-reginae* y por último *A. lechuguilla* y el híbrido *A. lechuguillas* x *A. americana*. Entre estas especies se registraron porcentajes de identidad de 100% los más altos del árbol, como se observa en la Tabla VIII. La segunda rama en orden descendente presenta las especies de *Agaves* con las ramas más largas y con porcentajes de identidad en el rango de 93 al 95 % entre sus secuencias. La tercera rama de la figura 26 siguiendo el mismo orden presenta brazos con longitud intermedia comparada con las dos anteriores, con porcentajes de identidad entre sus secuencias nucleotídicas en el rango de 90%. Las especies más distantes entre la segunda y la tercera rama presentaron los porcentajes de identidad más bajos del árbol, es decir, los índices de divergencia más altos (84.4%) en *A. s falcata* y *A. reginae-montana* como se muestra en la Tabla VIII. La rama inferior corresponde a las secuencias de las especies de referencia.

TABLA VIII
Porcentajes de identidad e índice de divergencia de las secuencias
ITS1 de los *Agaves*

		Porcentaje de identidad																							
Índice de divergencia		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
		1	98.8	91.6	89.6	91.6	100.0	98.8	92.0	93.6	90.2	87.5	87.1	89.0	94.8	94.8	86.4	94.8	94.4	90.4	90.8	75.2	75.2	76.1	1
	1.2		90.4	90.0	90.4	98.8	97.6	90.8	92.3	89.0	86.2	85.9	87.7	94.4	94.4	85.9	94.4	94.0	89.2	89.6	74.7	74.7	75.5	2	A.s. striata A,5,3
	9.0	10.4		90.1	92.4	91.6	92.4	94.0	95.6	88.3	88.4	88.0	87.8	91.2	91.2	87.3	90.9	90.9	88.9	88.1	71.5	71.1	73.2	3	A. striata var. nana A8,1
	11.3	10.9	10.8		89.2	89.6	90.0	89.6	90.8	87.9	85.9	84.4	86.2	91.2	91.2	86.1	90.9	90.5	87.3	87.3	69.0	68.6	70.3	4	A.s. falcata A3,2
	9.0	10.4	8.0	11.8		91.6	92.0	92.4	94.4	87.8	87.9	86.7	86.5	91.6	91.6	86.0	91.2	91.2	88.4	87.6	70.3	69.9	72.0	5	A.s. falcata A3,4
	0.0	1.2	9.0	11.3	9.0		98.8	92.0	93.6	90.2	87.5	87.1	89.0	94.8	94.8	86.4	94.8	94.4	90.4	90.8	75.2	75.2	76.1	6	A. stricta A1,1
	1.2	2.5	8.1	11.0	8.6	1.2		93.2	94.4	90.7	87.9	87.6	89.4	95.2	95.2	86.8	95.2	94.8	90.8	91.6	74.8	74.8	75.6	7	A. tenuifolia A4,1
	8.6	10.1	6.3	11.4	8.1	8.6	7.3		96.4	88.2	88.3	88.0	87.8	92.4	92.4	87.2	92.0	92.4	89.6	88.8	72.3	71.8	73.9	8	A. tenuifolia A4,4
	6.8	8.2	4.6	10.0	5.9	6.8	5.9	3.7		90.2	90.7	89.9	89.8	94.4	94.4	89.2	94.0	93.6	91.6	90.0	73.4	73.0	75.1	9	A. dasyliroides A24,6 m.
	10.6	12.1	13.0	13.5	13.5	10.6	10.2	13.2	10.7		92.2	91.0	95.5	89.8	89.8	91.5	89.5	89.1	95.1	96.4	70.1	69.2	70.9	10	A. dasyliroides A23,5
	13.8	15.5	12.8	15.8	13.3	13.8	13.4	13.0	10.0	8.3		94.4	91.8	88.7	88.7	94.0	88.4	88.0	93.2	92.4	69.9	68.6	70.3	11	A. dasyliroides A23,6
	14.2	15.8	13.2	17.7	14.7	14.2	13.7	13.3	10.9	9.6	5.9		90.6	88.0	88.0	93.2	87.6	87.2	92.4	90.8	70.5	70.0	70.9	12	A. reginae-montanae A6,2
	12.1	13.7	13.6	15.7	15.1	12.1	11.7	13.7	11.2	4.7	8.8	10.1		88.6	88.6	91.0	88.2	87.8	95.1	94.3	69.1	68.2	70.0	13	A. victoriae-reginae A12,7
	5.4	5.9	9.5	9.5	9.0	5.4	5.0	8.2	5.9	11.1	12.4	13.2	12.6		100.0	87.6	100.0	98.8	90.4	90.4	74.4	73.1	74.4	14	A. lechuguilla A13,2
	5.4	5.9	9.5	9.5	9.0	5.4	5.0	8.2	5.9	11.1	12.4	13.2	12.6	0.0		87.6	100.0	98.8	90.4	90.4	74.4	73.1	74.4	15	A. lechuguilla x americana A15,1
	15.2	15.8	14.2	15.7	15.8	15.2	14.9	14.4	11.9	9.2	6.4	7.2	9.7	13.7	13.7		87.3	86.9	92.0	91.2	69.3	68.1	69.7	16	A. bracteosa x victoriae-reginae A31,3
	5.4	5.8	9.9	9.9	9.4	5.4	5.0	8.6	6.3	11.5	12.8	13.6	13.1	0.0	0.0	14.2		98.8	90.1	90.1	74.5	73.2	74.5	17	A. bracteosa x victoriae-reginae A31,1
	5.8	6.3	9.9	10.3	9.4	5.8	5.4	8.1	6.8	12.0	13.3	14.1	13.6	1.2	1.2	14.7	1.2		89.7	88.9	74.1	72.8	74.1	18	A. americana A17,D2
	10.3	11.8	12.2	14.2	12.7	10.3	9.9	11.3	9.0	5.1	7.2	8.0	5.1	10.3	10.3	8.5	10.8	11.2		94.8	71.1	69.5	71.5	19	A. americana A17,D1
	9.9	11.4	13.2	14.3	13.7	9.9	9.0	12.4	10.9	3.8	8.2	9.9	6.0	10.4	10.4	9.5	10.8	12.2	5.4		69.9	68.6	71.1	20	A. americana A17,D4
	30.8	31.6	36.5	41.3	38.8	30.8	31.3	35.4	33.3	39.3	39.2	38.2	41.0	31.8	31.8	40.3	31.6	32.2	37.4	39.8		93.9	91.0	21	Aspidistra elatior U2400
	30.8	31.7	37.4	42.2	39.5	30.8	31.4	36.3	34.1	40.8	41.5	38.9	42.6	34.0	34.0	42.7	33.8	34.4	40.2	42.1	6.4		91.8	22	Polygonatum biflorum U23998
	29.7	30.6	34.0	39.3	36.0	29.7	30.2	32.9	30.8	37.9	38.6	37.6	39.6	32.1	32.1	39.7	31.9	32.5	36.6	37.6	9.6	8.7		23	Maianthemum racemosum U23982
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		

Los números identifican la secuencia nucleotídica ITS1 analizada y a la derecha se indica la especie o híbrido con su respectivo código de identificación de la clona. Las secuencias del grupo externo de referencia *M. racemosum*, *A. elatior*, *P. biflorum* fueron obtenidas del banco de secuencias Nucleotídicas (NCBI) y se indica la clave de registro.

8.10 Alineamiento múltiple de las secuencias ITS2

El alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas ITS2 mostró que correspondieron a aproximadamente a 238n como se esperaba (Tabla IX). La mayoría de las secuencias analizadas también presentaron sustituciones, microdelecciones y/o inserciones de 1 ó 2 nucleótidos como se muestra en el Anexo IV. Las excepciones fueron *A. stricta* B1-2 que presentó una delección de 12n, *A. striata falcata* B3-6, *A. tenuifolia* B4-1, *A. reginae-montana* B6-3, *A. lechuguilla* B13-0, *A. lechuguilla x A. americana* B15-10 y *A. americana* B17-0 que presentaron una sustitución de tres nucleótidos consecutivos en la misma región; la que no se presentó en ninguna otra secuencia nucleotídica estudiada.

TABLA IX

Nº de nucleótidos totales y clave de secuencias ITS2 utilizadas en el alineamiento múltiple de los diferentes Agaves

<i>Agave</i>	Nº de nucleótidos totales (n)	Clave de identificación de clonas ITS2
<i>A. striata striata</i>	237	B2,2
<i>A. striata striata</i>	238	B2,4
<i>A. striata striata</i>	238	B5,3
<i>A. striata striata</i>	238	B5,9
<i>A. striata striata</i>	238	B8,2
<i>A. striata striata</i>	238	B8,5
<i>A. striata falcata</i>	237	B3,5
<i>A. striata falcata</i>	238	B3,6
<i>A. stricta</i>	226	B1,2
<i>A. stricta</i>	238	B1,4
<i>A. tenuifolia</i>	237	B4,1
<i>A. tenuifolia</i>	238	B4,4
<i>A. dasylirioides</i>	238	B22,6
<i>A. dasylirioides</i>	238	B24,1
<i>A. reginae-montana</i>	238	B6,3
<i>A. victoriae-reginae</i>	237	B12,3
<i>A. victoriae-reginae</i>	237	B12,6
<i>A. lechuguilla</i>	237	B13,0
<i>A. lechuguilla x A. americana</i>	238	B15,3
<i>A. lechuguilla x A. americana</i>	238	B15,10
<i>A. americana</i>	236	B17,0
<i>A. bracteosa x A. v-reginae</i>	237	B31,4
<i>Aspidistra elatior</i>	224	U24041
<i>Polygoantum biflorum</i>	223	U24023
<i>Maianthemum racemosum</i>	226	U24046

8.11 Fenograma de las secuencias ITS2 de los *Agaves*

La Figura 27 muestra el árbol filogenético de las secuencias ITS2 analizadas utilizando el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star. El árbol consta de cuatro ramas bien definidas y un grupo disperso. Además, muestra en la escala inferior de 209.0 unidades, que representa el número de sustituciones entre las secuencias nucleotídicas analizadas. En la parte superior la primera rama de aspecto poco compacto, presenta longitudes terminales de rama muy diferentes, en la parte superior forma un grupo compacto de tres secuencias con porcentajes de identidad entre 98.3 y 99.2% *A. americana*, *A. lechuguilla x A. americana* y *A. lechuguilla* (Tabla X). En la parte inferior de la misma rama también hay tres secuencias que son ramas terminales,

más cortas con porcentajes de identidad en el rango del 99%. La segunda rama se caracteriza por que presenta los extremos terminales más largos del árbol con los menores porcentajes de identidad con un rango de 92 % a 97 % entre las cinco especies que la integran. La tercera rama en orden descendente es compacta y muy pequeña, presenta una de las mayores longitudes entre las porciones intermedias de árbol, con los porcentajes de identidad mas elevados entre todas las ramas, con valores de 98.7 % y 100% entre las tres especies que la integran, *A. tenuifolia*, *A. s striata* y *A. s falcata*. Finalmente, el árbol presenta una serie de ramas cortas espaciadas con porcentajes de identidad de 95% y 99.6% y la rama del grupo externo de referencia.

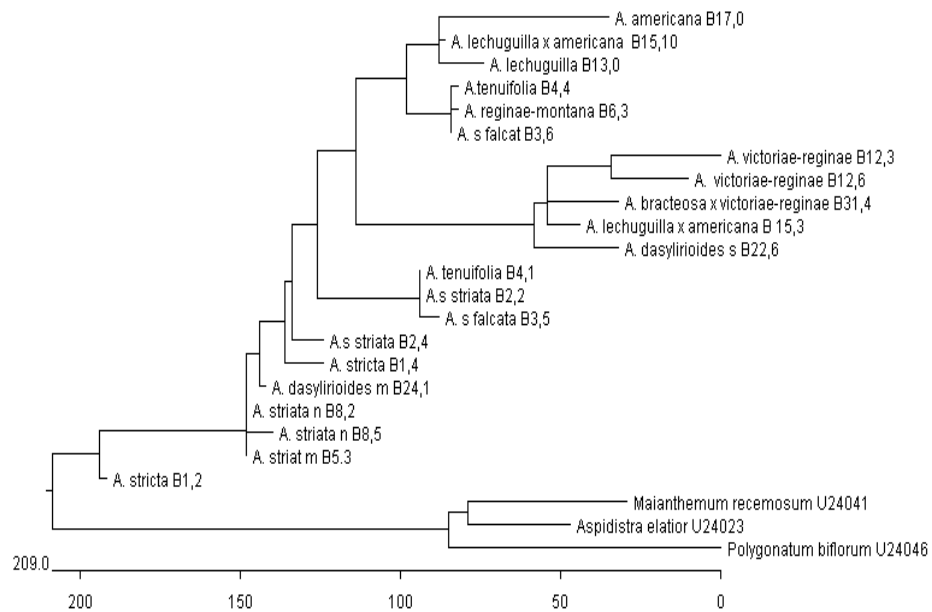


Figura 27. Fenograma de las secuencias ITS2 de los *Agaves*. El análisis fenético de las secuencias nucleotídicas de los *Agaves* se realizó utilizando el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star. Los números en la escala inferior indican los nombres de las especies de *Agave* con su clave de registro, y con las claves de registro de las secuencias nucleotídicas del grupo externo de referencia *M. racemosum*, *A. elatior*, *P. biflorum* obtenidas del Banco de secuencias Nucleotídicas (NCBI).

TABLA X
Porcentajes de identidad e índice de divergencia de las secuencias
ITS2 de los *Agaves*

Porcentajes de identidad

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
Divergencia	93.3	94.1	94.1	92.4	98.7	90.3	93.4	92.4	100.0	89.9	94.1	86.5	89.9	86.0	86.0	91.1	87.3	90.3	89.4	87.7	77.1	78.8	78.0	1	A. s striata B2,2
	█	95.8	95.8	94.1	92.9	91.6	96.0	95.0	93.3	91.2	95.8	85.7	91.2	85.7	86.1	92.4	88.2	91.6	91.9	88.2	79.0	79.8	78.6	2	A. s striata B2,4
	4.3	█	100.0	98.3	92.9	92.9	99.6	95.8	94.1	92.5	99.2	87.0	92.5	86.5	86.9	92.9	88.2	92.1	92.4	88.2	79.9	81.2	80.4	3	A. striat m B5,3
	4.3	0.0	█	98.3	92.9	92.9	99.6	95.8	94.1	92.5	99.2	87.0	92.5	86.5	86.9	92.9	88.2	92.1	92.4	88.2	79.9	81.2	80.4	4	A. striata n B8,2
	6.2	1.7	1.7	█	91.2	91.2	97.8	94.1	92.4	90.8	97.5	86.1	91.2	87.4	90.4	90.7	87.3	78.1	79.4	78.6	5	A. striata n B8,5			
	7.6	7.6	7.6	9.6	█	89.1	92.5	92.0	98.7	88.7	92.9	95.2	88.7	84.7	84.7	89.9	86.1	89.1	88.1	86.4	76.2	77.9	77.1	6	A. s falcata B3,5
	9.0	7.5	7.5	9.4	12.0	█	93.0	91.2	90.3	99.6	92.9	86.1	99.6	85.2	85.7	97.1	87.8	96.2	95.3	87.8	78.6	81.2	79.5	7	A. s falcata B3,6
	4.1	0.4	0.4	2.3	8.0	7.4	█	95.2	93.4	92.5	98.7	86.3	92.5	86.2	86.2	92.5	87.6	92.1	92.4	87.6	79.5	80.7	79.9	8	A. stricta B1,2
	5.3	4.3	4.3	6.2	8.6	9.5	5.1	█	92.4	90.8	95.8	84.9	90.8	84.8	85.2	92.0	87.4	91.2	91.1	87.3	77.7	79.4	78.1	9	A. stricta B1,4
	7.2	6.2	6.2	8.1	1.3	10.5	7.0	8.1	█	89.9	94.1	86.5	89.9	86.0	86.0	91.1	87.3	90.3	89.4	87.7	77.1	78.8	78.0	10	A. tenuifolia B4,1
	9.5	8.0	8.0	9.9	12.5	0.4	7.9	10.0	11.0	█	92.5	86.6	99.2	84.8	85.2	96.6	87.4	95.8	94.9	87.3	78.1	80.7	79.0	11	A. tenuifolia B4,4
	4.4	0.8	0.8	2.6	7.6	7.5	1.3	4.4	6.2	8.0	█	87.0	92.5	86.5	86.9	92.9	88.2	92.1	92.4	88.2	79.9	81.2	80.4	12	A. dasylirioides m B24,1
	16.4	14.7	14.7	15.8	16.9	15.7	15.6	17.5	15.2	15.1	14.8	█	85.7	90.3	91.2	88.2	94.1	87.4	86.8	94.1	73.1	73.9	73.1	13	A. dasylirioides s B22,6
	9.5	8.0	8.0	9.9	12.5	0.4	7.9	10.0	11.0	0.8	8.0	16.2	█	84.8	85.2	96.6	87.4	95.8	95.8	87.3	78.1	81.2	79.0	14	A. reginae-montana B6,3
	16.3	15.1	15.1	16.2	17.5	16.7	15.5	17.5	15.8	17.3	15.2	10.4	17.3	█	95.8	87.3	93.3	86.5	85.5	92.8	73.9	75.1	73.9	15	A. victoriae-reginae B12,3
	16.0	14.7	14.7	15.8	17.6	16.3	15.7	17.1	15.9	16.9	14.8	9.5	16.9	4.3	█	87.7	93.7	86.9	85.9	93.7	73.0	74.2	73.0	16	A. victoriae-reginae B12,6
	8.1	7.5	7.5	9.5	11.0	3.0	8.0	8.5	9.5	3.4	7.6	13.0	3.4	14.2	13.7	█	89.9	99.2	98.3	89.8	78.9	81.1	79.4	17	A. lechuguilla B13,0
	13.2	13.1	13.1	14.2	15.9	13.6	13.9	14.3	14.2	14.1	13.1	6.1	14.1	7.1	6.6	11.0	█	89.1	88.1	97.5	74.4	76.1	74.4	18	A. lechuguilla x americana B 15,3
	9.0	8.5	8.5	10.4	12.0	3.9	8.4	9.5	10.5	4.3	8.5	14.0	4.3	15.2	14.7	0.8	12.0	█	98.3	89.0	79.5	80.7	79.0	19	A. lechuguilla x americana B15,10
	8.6	8.1	8.1	10.1	13.2	4.8	8.0	9.6	11.6	5.3	8.1	14.8	4.4	16.5	16.0	1.7	13.2	1.7	█	88.0	78.3	80.0	78.3	20	A. americana B17,0
	13.3	13.2	13.2	14.3	15.6	13.7	14.0	14.4	13.9	14.2	13.2	6.2	14.2	7.6	6.7	11.1	2.6	12.1	13.3	█	73.9	75.1	73.4	21	A. bracteosa x victoriae-reginae B31,4
	24.7	23.5	23.5	26.0	28.8	25.3	24.1	26.7	27.4	26.0	23.5	33.7	26.0	32.5	33.9	24.8	31.7	24.0	25.7	32.5	█	91.5	89.7	22	Aspidistra elatior U24023
	23.7	21.8	21.8	24.3	26.4	21.8	22.4	24.4	25.1	22.4	21.8	32.6	21.8	30.8	32.2	21.8	29.2	22.3	23.3	30.8	9.0	█	90.6	23	Polygonatum biflorum U24046
	25.3	22.8	22.8	25.3	27.4	24.0	23.4	26.0	26.1	24.6	22.8	33.7	24.6	32.4	33.9	24.1	31.6	24.6	25.7	33.2	11.1	10.1	█	24	Maianthemum racemosum U24041

Los números identifican la secuencia nucleotídica ITS2 analizada y a la derecha se indica la especie o híbrido con su respectiva clave de identificación de la clona. Las secuencias del grupo externo de referencia *M. racemosum*, *A. elatior*, *P. biflorum* fueron obtenidas del Banco de secuencias Nucleotídicas (NCBI) y se indica la clave de registro.

8.12 Alineamiento múltiple de las secuencias ITS1 Y 2

La Tabla XI muestra la lista de secuencias de *Agaves* analizadas y la suma total de nucleótidos de las secuencias 1 Y 2 concatenadas ITSs. Estas secuencias en conjunto sumaron aproximadamente 487n como se muestra con el número total de nucleótidos.

El Anexo V muestra el alineamiento de las secuencias ITS1 y 2 concatenadas y analizadas con el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star, en el que se resalta en azul las posiciones nucleotídicas que son compartidas por la mayoría de las secuencias y en color amarillo las sustituciones nucleotídicas que difieren. Este análisis muestra que existen caracteres tanto de las secuencias ITS1 como ITS2, 11 en total, que son distintivos de las secuencias de *Agaves* de la Serie Striatae al compararlos con los *Agaves* restantes en el estudio que no son pertenecientes a ésta Serie. Específicamente, la Serie Striatae muestra que las posiciones nucleotídicas 53, 56, 57, 130, 290, 319-321, 446, 470 y 477-479 presentaron sitios únicos conservados. Especialmente son comunes

los sitios 294, 344, 456, 403, 404, 407, 430, 467 y 483 (nueve en total) solo en las plantas de *A. tenuifolia*, *A. s falcata* y *A. striata* del sur de Nuevo León. De la misma manera también hubo otros nucleótidos 14 en total, que se encontraron presentes solo en *Agaves* afines a la rama en que se encuentra *A. americana* y *A. victoriae-reginae* con *A. bracteosa* x *victoriae-reginae*, sus posiciones son: 52, 53, 56, 57, 77, 83, 84, 110, 294, 317, 448, 470, 477 y 479.

TABLA XI

Nº de nucleótidos totales y clave de secuencias ITS1 y 2 utilizadas en el alineamiento múltiple

<i>Agave</i>	Nº de total de nucleótidos (n) por clona	Claves de identificación de las clonas	
		ITS1	ITS2
<i>A. stricta</i>	488	A1,1	B1,4
<i>A. striata</i>	487	A2,2	B2,2
<i>A. s. falcata</i>	488	A3,2	B3,5
<i>A. tenuifolia</i>	487	A4,1	B4,2
<i>A. striata</i>	487	A5,9	B5,6
<i>A. reginae-montana</i>	487	A6,2	B6,3
<i>A. victoriae-reginae</i>	482	A12,7	B12,3
<i>A. bracteosa</i> x <i>victoriae-reginae</i>	487	A31,3	B31,4
<i>A. striata nana</i>	489	A8,1	B8,2
<i>A. dasylirioides</i>	488	A24,6	B24,1
<i>A. lechuguilla</i> x <i>americana</i>	488	A15,1	B15,10
<i>A. americana</i>	487	A17,9	B17,0
<i>A. lechuguilla</i>	487	A13,2	B13,0
<i>A. attenuata</i>	488	U23998	U24018
<i>Aspidistra eliator</i>	472	U24003	U24023
<i>Polygonatum biflorum</i>	467	U23988	U24046
<i>Maianthemum racemosum</i>	467	U23982	U24041

8.13 Árbol filogenético de las secuencias ITS1 y 2

La Figura 28 muestra el Fenograma de las secuencias ITS1 y 2 obtenidas con el programa Jotun Hein. El árbol presenta dos ramas bien definidas: la rama superior contiene todas las especies de la Serie Striatae con las secuencias de *A. striata*, *A. tenuifolia*, *A. dasilyroides*, *A. striata nana*, *A. stricta* y *A. falcata*. En la segunda rama contiene dos grupos: el grupo superior que contiene las secuencias de *A. lechuguilla*, *A. americana*, *A. attenuata* y el híbrido *A. lechuguilla* x *americana*. El grupo inferior contiene *A. victoriae-reginae*, a *A. reginae-montana* y al híbrido *A. bracteosa* x *A. v-*

reginae. Es decir, el fenograma de las secuencias ITSs concatenadas fue capaz de diferenciar al grupo de la Serie Striatae de las otras especies pertenecientes a otras Series y Subgéneros. Además, este análisis molecular permitió establecer la posición precisa de los diferentes híbridos específicamente entre las especies paternas.

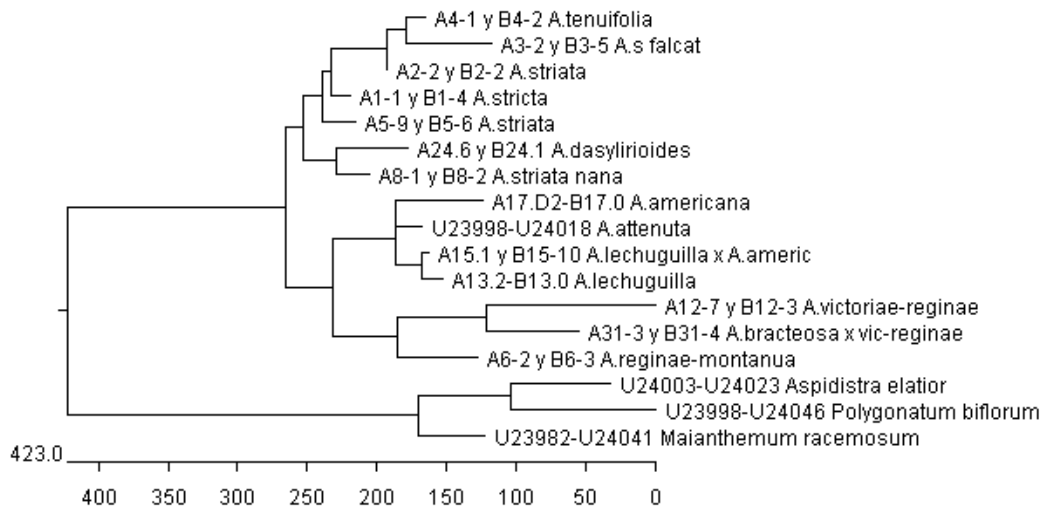


Figura 28 Fenograma de las secuencias nucleotídicas ITS1 y 2 de los Agaves. El análisis fenético de las secuencias nucleotídicas de los *Agaves* se realizó utilizando el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star. Los números en la escala inferior indican el número de sustituciones entre las secuencias. Se indican los nombres de las especies de *Agave* con su número de registro, así como las secuencias nucleotídicas del grupo externo de referencia *M. racemosum*, *A. elatior*, *P. biflorum* obtenidas del Banco de Secuencias Nucleotídicas (NCBI).

8.14 Análisis de las secuencias ITS1 de *A. dasylirioides* de dos localidades

El Anexo VI muestra el alineamiento múltiple realizado con el programa Jotun Hein correspondiente a seis secuencias nucleotídicas ITS1 de *A. dasylirioides*, dos procedentes del Estado de Morelos y las otras cuatro del Estado de San Luis Potosí. Las dos secuencias del Estado de Morelos presentaron 250n, en cambio las secuencias procedentes del Estado de San Luis Potosí presentaron 246n y 248n respectivamente con dos y seis nucleótidos faltantes de los 250n reportados en la literatura para esta especie (Bogler *et al.*, 1995). Las muestras de *A. dasylirioides* de Morelos mostraron 13 sitios nucleotídicos únicos conservados para esta población, de los cuales 12 sitios contenían una sustitución de un nucleótido y el otro sitio presentó una inserción de dos nucleótidos consecutivos. Las cuatro secuencias de Estado de SLP mostraron 14 sitios característicos de esa localidad: 13 fueron sustituciones de un solo nucleótido y una inserción-delección (*indel*) de un par de nucleótidos. Además, se detectaron varios sitios

de uno, dos y tres nucleótidos variantes en tres de las cuatro secuencias procedentes de SLP. Estos resultados muestran claramente la separación las secuencias nucleotídicas ITS1 de las dos poblaciones de *A. dasylirioides* estudiadas en esta tesis.

8.15 Fenograma de las secuencias ITS1 de *A. dasylirioides*

En la Figura 29 se muestra el árbol fenético de las seis secuencias nucleotídicas, de *A. dasylirioides* y en la escala inferior de 77.0 unidades se indican el número de sustituciones entre las secuencias. El árbol separa claramente dos ramas principales cada una subdividida también en dos ramas secundarias, en donde se dividen los dos tipos de secuencias de *A. dasylirioides* del estado de SLP de las dos del Estado de Morelos.

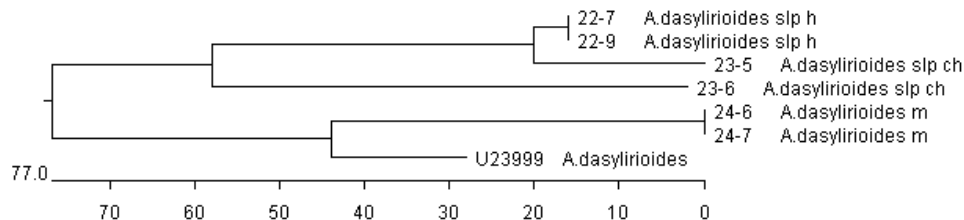


Figura 29. Fenograma de la secuencias ITS1 de *A. dasylirioides* pertenecientes a dos poblaciones. El análisis fenético de las secuencias nucleotídicas ITS1 de *A. dasylirioides* de San Luis Potosí y Morelos se realizó utilizando el programa Jotun Hein de MegAlign DNA Star. Los números en la escala inferior indican el número de sustituciones entre las secuencias y a la derecha se indican las claves de identificación de los Agaves. La secuencia de *A. dasylirioides* de referencia se incluyó del Banco de Genes NCBI (U23999).

Las secuencias *A. dasylirioides* también presentaron sustituciones, micro-delecciones y/o inserciones de 1 ó 2 nucleótidos y además mostraron grupos y/o nucleótidos individuales propios de las dos regiones geográficas que permitieron diferenciar claramente las secuencias del estado de Morelos de las secuencias de SLP. La confirmación de estos resultados fue mostrada con los porcentajes de identidad mostrados en la Tabla XII que permitieron separar los dos grupos poblacionales. Al hacer comparaciones con la secuencias del NCBI, el grupo de Morelos mostró mayor porcentaje de identidad (99.2%) y la población de San Luis Potosí resultó con menor porcentaje de identidad (90.2 a 91.1 %). Los valores de divergencia también reflejaron el grado de variabilidad, ya que las plantas de Morelos difiere con respecto la secuencia de referencia en tan solo 0.8 unidades a diferencia de los valores para la plantas de San Luis Potosí que fue de 10.6 unidades. Estos resultados muestran claramente la separación de las poblaciones de *A. dasylirioides* de las dos localidades.

TABLA XII

Porcentajes de identidad e índice de divergencia de las secuencias de los ITS1 de *A. dasylirioides* en dos poblaciones

Porcentaje de Identidad

D i v e r g e n c i a	Porcentaje de Identidad										
	1	2	3	4	5	6	7				
1	■	99.2	99.2	90.2	90.3	91.1	91.1	1	U23999	A.dasylirioides	} Morelos
2	0.8	■	100.0	90.2	89.9	91.0	91.0	2	24-6	A.dasylirioides m	
3	0.8	0.0	■	90.2	89.9	91.0	91.0	3	24-7	A.dasylirioides m	
4	10.6	10.6	10.6	■	92.2	97.6	97.6	4	23-5	A.dasylirioides slp ch	} S. L. P
5	10.4	11.0	11.0	8.2	■	92.2	92.2	5	23-6	A.dasylirioides slp ch	
6	9.6	9.6	9.6	2.5	8.2	■	100.0	6	22-7	A.dasylirioides slp h	
7	9.6	9.6	9.6	2.5	8.2	0.0	■	7	22-9	A.dasylirioides slp h	
	1	2	3	4	5	6	7				

Debido a la importancia de la identificación molecular de plantas de *Agave* empleadas en la industria tequilera, procedimos a analizar las secuencias ITS1 de cinco clonas seleccionadas al azar, procedentes de un solo ejemplar de *Agave tequilana*, especie que pertenece a la Serie Rigidae para determinar el grado de variabilidad nucleotídica entre sus secuencias.

El Anexo VII, muestra el alineamiento múltiple realizado con el programa Jotun Hein de cinco secuencias nucleotídicas ITS1 de *A. tequilana* seleccionadas al azar, comparadas con la secuencia nucleotídicas de *A. striatae* del banco de genes (NCIB). Los resultados mostraron que las secuencias ITS1 son aproximadamente del mismo tamaño que los *Agaves* de la serie Striatae con 251n. Estas secuencias también presentaron sustituciones, microdelecciones y/o inserciones de 1 a 3 nucleótidos.

La Tabla XIII muestra la comparación de las secuencias de *A. tequilana*, con *A. striata* (NCBI) con porcentajes de identidad que van de 72.6 a 94.0 % y con valores de divergencia de 6.2 a 34.2. Por otro lado, en la comparación de la secuencia de *A. tequilana* 29.1 con las otras cuatro secuencias mostraron porcentajes de identidad que variaron de 75.0 a 89.9 % y valores de divergencia de 10.9 a 30.5. Esto resultados en las secuencias de *A. tequilana* confirmaron el grado de heterogeneidad y confirman la variabilidad de diferentes secuencias de un mismo individuo de *A. tequilana* que permiten diferenciar plantas de una misma especie ya sea en una misma o en localidades distintas como lo indican los análisis de estas dos últimas especies de las Series Striatae y Rigidae de la familia Agavaceae.

TABLA XIII

Porcentajes de identidad e índice de divergencia de las secuencias de los ITS1 de *A. tequilana* de un mismo individuo

Porcentajes de identidad

		1	2	3	4	5	6		
Divergencia	1	█	91.2	83.9	85.4	68.8	69.2	1	striata U24001
	2	6.7	█	81.5	83.0	74.1	74.5	2	29.1 R.SEQ
	3	9.2	11.0	█	95.1	66.9	67.3	3	29.2 R.SEQ
	4	10.1	12.5	2.9	█	65.6	66.0	4	29.3 R.SEQ
	5	31.4	28.2	34.9	36.5	█	99.2	5	29.5 R.SEQ
	6	32.0	27.6	35.6	37.2	0.8	█	6	29.6 R.SEQ
		1	2	3	4	5	6		

Los resultados anteriormente descritos dieron origen a la posibilidad de utilizar estos polimorfismos como marcadores únicos para la tipificación molecular de los *Agaves*. Debido a la importancia de la identificación molecular de plantas de *Agave* de valor comercial, se sometió el registro de la patente con el título de: “Método de genotipificación molecular de *Agaves* utilizando las secuencias nucleotídicas ITSs de los ADNs ribosomales” que fue registrado con el expediente NL/ a/ 2005/000075, con fecha de 12 / Sep / 2005 y con el número de folio NL/E/2005/000675, por esta razón, se omitieron todas las secuencias nucleotídicas incluyendo las de *A. tequilana* que pudieran invalidar el proceso de acreditación de la patente en trámite como lo estipulan los procedimientos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial y el Departamento jurídico representado por el Abogado General de la Universidad Autónoma de Nuevo León el Lic. Jaime Javier Gutiérrez Argüelles.

9. DISCUSIÓN

En la presente tesis se amplificaron mediante PCR las regiones intergénicas ITS1 y 2 de los ADNs genómicos obtenidos de *Agaves* de la Serie *Striatae*. La comparación de las secuencias nucleotídicas de estas especies de *Agaves* permitieron detectar la presencia de marcadores moleculares específicos con los que se diferenció a los *Agaves* de la Serie *Striatae* e híbridos de otras Series. Además, se documentó la presencia de diferentes copias polimórficas de las secuencias ITSs en una misma especie, entre diferentes localidades y en un mismo individuo. Esta variabilidad inesperada, es una característica que permitió la genotipificación molecular de los *Agaves*, que se puede utilizar con diferentes fines taxonómicos a niveles poblacional, de variedad, y/o de plantas individuales.

9.1 Extracción de ADN genómico de las plantas de *Agave*

Las extracciones de los ADNs genómicos se realizaron inicialmente utilizando diferentes métodos convencionales que contienen CTAB en el proceso: los ADNs obtenidos mostraron apariencia y cantidad satisfactoria pero inexplicablemente se precipitaban al almacenarlos a 4° C y a -20° C. Esta aparente inestabilidad en la concentración de los ADNs motivó a la utilización del método de Sullivan *et al.*, 2000 que emplea cloruro de litio en su formulación a diferencia de los métodos anteriormente usados. Con algunas modificaciones, este método permitió obtener en forma reproducible y estable los ADNs genómicos de los *Agaves*, que fueron mantenidos sin degradación y de buena calidad por más de 2 años. La mínima cantidad de tejido óptima necesaria para la extracción de los ADNs, fue de 0.03 g y si se excedía esta cantidad de tejido, en algunos casos conducían a una inhibición de la reacción de amplificación mediante PCR. Las modificaciones al procedimiento de extracción de ADN, consistieron básicamente en el calentamiento previo del mortero seguido de una homogenización rápida. Este proceso fue ajustado a volúmenes pequeños para los tubos eppendorf, permitiendo la obtención de los ADNs genómicos en rangos de 200.0 ng / mg de tejido con degradación nula y en cantidades suficientes para realizar las reacciones de amplificación. Este método de obtención de ADN genómico de los *Agaves* presenta ventajas en comparación con otro método recientemente descrito por Kellanes *et al.*, en 2002 donde utilizan CTAB en la extracción puesto que este compuesto puede interferir con el proceso de amplificación y además de realizarse el proceso con una mayor facilidad.

9.2 Amplificación de las secuencias ITSs

Durante el desarrollo de la amplificación de las secuencias ITS1 no se presentaron dificultades particulares y en general se pudieron amplificar todas las muestras con los ADNs genómicos extraídos sin mayores problemas, con la excepción de *A. bracteosa* especie de la cual no se pudieron realizar las amplificaciones mediante PCR hasta después de varios intentos. Lo anterior, probablemente se debió a la presencia de mayores cantidades de fructanos y/o inhibidores presentes en las preparaciones de ADN que en experimentos preliminares realizados con este ADN inhibieron otras reacciones de amplificación (Resultados no mostrados).

Durante la amplificación de las secuencias ITS2 se presentaron problemas frecuentes para su amplificación mediante PCR que finalmente fueron interpretados como variabilidad en las condiciones de la reacción del alineamiento de los oligonucleótidos al ADN.

9.3 Análisis de las secuencias ITSs

Una de las características más sobresalientes del análisis de las secuencias ITSs fue la existencia de copias de distintas ITS1 y 2 en todos los *Agaves* estudiados. Debido a que durante esa etapa de la tesis no teníamos información alguna de la existencia de éste fenómeno, decidimos clonar y secuenciar mayor número de muestras de diferentes especies de *Agaves* para verificar la existencia de las copias múltiples variantes. Los polimorfismos encontrados estuvieron presentes en todas las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies analizadas, así como en individuos de la misma y diferentes localidades.

Esta inesperada variabilidad proporcionó la oportunidad única de utilizar esta metodología en la genotipificación molecular de *Agaves* de interés comercial, basado en la variabilidad de secuencias ITSs de los *Agaves* de la Serie *Striatae*, realizado durante el desarrollo de esta tesis con individuos de la Serie *Striatae*. Debido a la importancia de la identificación molecular de plantas de *Agaves* de valor comercial, se sometió el registro de la patente: “Método de genotipificación molecular de *Agaves* utilizando las secuencias nucleotídicas ITSs de los ADNs ribosomales” registrada con el expediente No. NL/a/2005/000075, Folio NL/E/2005/000675 el 12 Septiembre del 2005. Las secuencias nucleotídicas de *A. tequilana* utilizadas en la patente se omitieron en esta tesis para evitar problemas posteriores que pudieran invalidar el proceso de acreditación de la patente en trámite como lo estipulan los procedimientos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial y el Departamento jurídico de la UANL.

Por otro lado, las secuencias ITSs multicopia variantes (polimórficas) plantearon la situación de seleccionar una de las secuencias para realizar el alineamiento múltiple entre todas las especies. Usando el mismo programa Jotun Hein del MegAlign de DNA Star, se construyeron los fenogramas con una de las secuencias variantes para cada especie por lo que seleccionamos la secuencia más común de cada árbol fenético dentro del grupo (resultados no mostrados). En los casos en que solo se contó con dos copias

de una especie, se eligió a la secuencia más similar a *A. striatae* del Banco de Genes NCBI bajo el mismo criterio de análisis antes mencionado. Las secuencias resultantes de la selección anterior fueron utilizadas para un alineamiento múltiple con todas las secuencias de la Serie Striatae. En este análisis, además se incluyeron las secuencias de las dos plantas híbridas estudiadas: *A. lechuguilla* x *A. americana*, *A. bracteosa* x *A. victoriae-reginae* así como las secuencias ITSs de una nueva especie no descrita (*A. reginae-montana*) así como de las especies (parentales) que dieron origen a los híbridos como elementos de control en el análisis.

Los fenogramas resultantes con las secuencias ITS 1 y 2 de forma separada, desafortunadamente solo agruparon con claridad a algunas de las especies de la Serie Striatae, por esta razón se decidió combinar a los dos tipos de secuencias ITS1 y 2 en forma concatenada para su análisis con el programa Jotun Hein. El resultado fue una clara separación de todas las especies de la Serie Striatae distinguiéndolas de las de otras Series e incluso de diferentes Series de otro subgénero. Así mismo, la posición del híbrido de *A. lechuguilla* con *A. americana* resultó estar en estrecha relación con las especies de *A. americana* y *A. lechuguilla* en el fenograma. Lo mismo sucedió con el híbrido de *A. bracteosa* x *victoriae-reginae* que presenta la misma asociación evidente en una posición intermedia entre las especies parentales en el fenograma.

Por otro lado, las secuencias de *A. striata* subespecie *falcata* con *A. dasyliroioides* de Morelos y *A. striata nana* de Tamaulipas, presentan la característica de contener las ramas terminales más largas de ese grupo en el dendrograma. Esta característica permite sugerir que las subespecies de *A. striata falcata* y *A. striata nana* pudieran ser consideradas en una posición taxonómica de especie en lugar de subespecie como se conoce a la fecha. Lo contrario se encontró, en las especies con ramas terminales más cortas y cercanas como *A. tenuifolia* de Querétaro, *A. striata striata* de San Luis Potosí *A. stricta*, de Puebla y *A. striata striata* de SLP, que nos permite sugerir que podrían pertenecer a una misma especie en lugar de especies separadas como se documenta actualmente.

10. CONCLUSIONES

Los resultados del análisis de las secuencias nucleotídicas ITSs de los *Agaves* de la Serie *Striatae* en esta tesis nos permiten postular que estas regiones:

1. Presentan polimorfismos en las copias múltiples que se consideran un fenómeno generalizado en todos los *Agaves*
2. Contienen marcadores moleculares útiles para identificar *Agaves* de la Serie *Striatae* y del grupo de *A. americana*
3. Contienen marcadores moleculares que permiten identificar poblaciones de zonas geográficas distantes de una misma especie de *Agave*
4. Identifican filogenéticamente híbridos producto de cruzas de distintas especies
5. Fundamentan nuevas posiciones taxonómicas para *A. striata falcata* y *A. striata nana*, así como para las especies de *A. stricta*, *A. tenuifolia*, *A. striata striata*.
6. Constituyen un método para la genotipificación molecular de *Agaves*

La metodología desarrollada en esta la tesis para la taxonomía y genotipificación molecular de *Agaves* puede también ser utilizada para programas de protección de germoplasma, fitomejoramiento genético, protección de especies en peligro de extinción, así como estudios de biogeografía y evolución vegetal.

11. LITERATURA CITADA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson JD. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition Garland Publishing Inc.: New York & London pp.1-1294.
- Arnheim N., White T., and Rainey WE. (1990). Application of PCR: Organismal and Population Biology; Polymerase Chain reaction can produce large quantities of specific DNA from small, degraded, and impure samples. *BioScience* (40):174-182.
- Bogler D.J. and Simpson BB. (1995). A Chloroplast DNA Study of the Agavaceae. *Systematic Botany* (20):191-205.
- Bogler DJ, Neff JL, and Simpson BB. (1995). Multiple origins of the yucca-yuccamoth association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (92):6864-6867.
- Bogler D.J. and Simpson BB. (1996). Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence Variation. *American Journal of Botany* (83):1225-1235.
- Cano y Cano, O. y Marroquín de la F J. (1994). *Taxonomía de Plantas Superiores*. Ed. Trillas México O. F. Mx. 359.
- Cronquist A. (1977). *Introducción a la Botánica*. Harper d Row, Publishers, Inc. (1): 84.
- Davis JL. (1996). Phylogenetics, Molecular Variation, and Species Concepts. *Bioscience*: (46): 502-511.
- García-Mendoza A. (1995). Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques. Linares, E., P.
- García Mendoza (2002). Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal* (74): 177-187.
- Gentry H S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Library of Congress Catalog in Publication Data The University of Arizona Press. Tucson Arizona (1): 667.
- Granados Sánchez D. (1993). *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. (1): 252.
- Kelly LM. (1998). Phylogenetic Relationships in *Asarum* (Aristolochiaceae) based on morphology and ITS sequences. *American Journal of Botany* (85):1454-1467.
- Keb-Ilanes et.al, Gonzalo ,G., Chi-Manzanero, B, Infante D. (2002). A Rapid and Simple Method for Small-Scale DNA Extraction in Agavaceae and other Tropical Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* (20): 299a- 299e.

- Koch MA, Dobes Ch, and Mitchell-Olds T. (2003). Multiple Hybrid Formation in Natural Populations: Concerted Evolution of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divariarpa* (Brassicaceae). *Molecular Biology and Evolution* (20):338-350.
- Kornkeven AB, Watson LE and Estes JR. (1998). Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences form the Internal Transcribed
- Kusoff RK, Sweere JA, Soltis DE, Soltis PS and Zimmer EA. (1998). The Phylogenetic Potencial of Entire 26S rDNA Sequences in Plants. *Molecular Biology and Evolution*. (15):251-263.
- Livingston DP. and Henson CA. (1998). Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan Exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant Physiol* (116): 403–408.
- Maldonado-Cantú, C. (1996). Miel de *Agave*, alimento saludable. El surco Edición Mexicana. (101):8.
- Maiti R. (1995). Fibras vegetales en el mundo: aspectos botánicos: calidad y utilidad . Trillas: México. Pp. 1-300.
- Manos PS. (1997). Systematics of Nothofagus (Nothofacaceae) Based on rDNA Spacer Sequences (Its): Taxonomic Congruence With Morfology And Plastid Sequences *American Journal of Botany* (84):1137-1155.
- Moller M. and Cronquist, QCB. (1997). Origin and Relationships or *Saintpaulia* (Gesneraceae) based or Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Sequences. *American Journal of Botany* (84): 956-965.
- Mullis K. Faloon, T, Scharf, S. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polimerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* (51): 263-273.
- Praznik W, Cieslik E, and Lopez M.G. (2002). Composition of nutritional components in *Agave* tequila Weber var. Azul. Abstracts 9th Seminar on Inulin, Budapest/Hungary, 18-19.
- Ramírez J. (1995). Los Magueyes Plantas de Infinitos Usos. *Biodiversitas Boletín Bimestral de la Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. México D.F. 1–7.
- Rzedowski J. y Huerta M L. (1981). *Vegetación de México* Limusa Noriega Editores México. (1): 432 .
- Sambrook, J. Maniatis. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Edition, Clod Spring Harbor Laboratory Press, United States of America E. (5): 11-28.

- Sanger F, Nicklen S, y Coulson A. (1977). DNA Sequencing with chain terminating inhibitor, Proceedings of the National Academy of Science: EUA. (74): 5463-5467.
- Sealey, P G. and Southern, E M. (1982). Electrophoresis of ONA, in Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach (Rickwood, O. and Hames B. O., eds.) IRL Oxford, UK, pp 39-76.
- SECOFI (1993). Norma en la que se establecen las especificaciones para la bebida alcohólica elaborada con *Agaves* de la especie tequilana weber . variedad azul. NOM-V-7-1978. Diario Oficial 13 de Octubre 2003.
- SECOFI (1994). Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-070.SCFI-1994, Bebidas alcohólicas Mezcal Especificaciones. Diario Oficial, 17 de Agosto 2004.
- SECOFI (1994). Extracto de la solicitud de declaración de protección de la denominación de origen Mezcal. Diario Oficial, 5 de Septiembre 1994.
- Se'venier, van der Meer I M, Bino R, and Koops A J. (2002). Increased Production of Nutriment by Genetically Engineered Crops. Journal of the American College of Nutrition (21):199S–204S.
- Starr JR, Harris SA, and Simpson DA. (2003). Potential of the 5' and 3' ends of the intergenic spacer (IGS) of rDNA in the Cyperaceae: New sequences for lower-level phylogenies in sedges with an example form *Uncinia* pers. International Journal of Plant Science (164): 213-227.
- Strand,AE, Leebens-Mack J, and Milligan BG. (1997). Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. Molecular Ecology. (6): 113-118.
- Stefanovic S, Jager M, Deutsch J, Broutin J and Masselot, M. (1998). Phylogenetic relationships of conifer inferred from partial 28S rRNA gene sequences. American Journal of Botany. (85): 688-697.
- Sullivan W, Ashburner M, R & Hawley S. (2000). *Drosophila* Protocols. Cold Spring Harbor Laboratory Prebs., NY, pp. 431.
- Tuttle, M., Moreno, A. (2004). Murciélagos Cavernícolas del Norte de México, Su importancia y problemas de conservación. Bat Conservation Internacional. pp. 1-48.
- Velasco Molina H A. (1991). Las Zonas Áridas y Semiáridas Sus características y manejo Noriega Editores Editorial Limusa: Mexico DF. (1): 725.
- Valenzuela A.G. (2003). El *Agave* Tequilero, Cultivo e Industria de México. Mundi Prensa Mex: 1-215.

- Yungbae S, Tjien LB, Reev HE, and Zimmer EA. (1993). Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *American Journal of Botany* (80):1042-1055.
- Zamudio-Ruiz S. y Sánchez-Martínez E. (1995). Una Nueva Especie de *Agave* del Subgénero *Littaea* (Agavaceae) de la Sierra Madre Oriental, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*. (32): 47-52