

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Uso de Marcadores *matK* y *rbcL* Para Discriminar Cuatro Especies de *Agave* L.  
(Asparagaceae)

Presentado por:

**JESÚS SANTIAGO MÁRQUEZ SEGUNDO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Uso de Marcadores *matK* y *rbcL* Para Discriminar Cuatro Especies de *Agave* L.  
(Asparagaceae)

Por:

**JESÚS SANTIAGO MÁRQUEZ SEGUNDO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



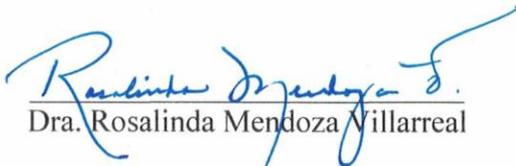
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei

Asesor Principal Externo



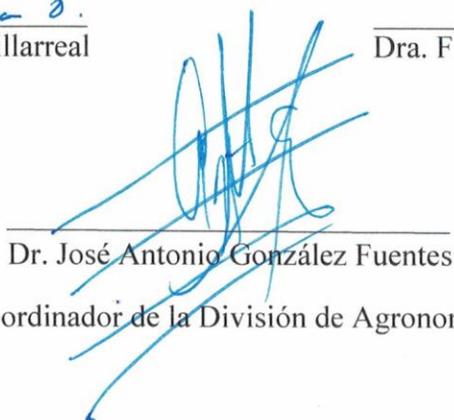
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Coasesor



Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes

Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes

Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Agosto, 2022



## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante



---

Jesús Santiago Márquez Segundo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por convertirse en mi Alma Mater; junto al aporte de sus docentes e instalaciones que permiten seguir generando profesionistas.

A Don **Antonio Narro Rodríguez** y su hermana **Trinidad Narro Rodríguez**, por contribuir y donar sus propiedades para la creación de tan prestigiosa universidad.

Al **programa de beca académica** por promedio de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y al programa de beca para el Bienestar Benito Juárez de Educación Superior (**Jóvenes Escribiendo el Futuro**) por el apoyo económico recibido.

Al **Laboratorio de Biología Molecular** porque fui de las primeras personas afortunadas en pertenecer a él y formar parte del equipo; por ser un espacio de confianza y aprendizaje, por ser un espacio adecuado para el trabajo y darme la oportunidad de apoyar en la construcción del mismo.

Al Dr. **Miguel Ángel Pérez Rodríguez** por la confianza depositada, por los conocimientos compartidos, por el apoyo motivacional, económico y las palabras de aliento recibidas, brindándome las herramientas y las facilidades, durante el desarrollo de este experimento y durante mi desarrollo como profesionista, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. **Lihua Wei** por el apoyo brindado para la realización de este proyecto, por los conocimientos compartidos y por la ayuda ofrecida.

A la Dra. **Flor Cristina Pacheco Reyes** por el apoyo recibido durante la realización de este proyecto, su participación fue imprescindible. Su enseñanza, paciencia y tolerancia fueron significativas, por la ayuda en el laboratorio y por su amistad.

A **Alexandra Elbakyan** por eliminar algunas barreras en el camino de la ciencia con el propósito de indagar y divulgar la información científica.

## DEDICATORIAS

A **mí** mismo; por ser perseverante, por el esfuerzo y por no rendirme. Por no retroceder en mi palabra, siguiendo mi propio camino, mi Nindō.

A mi madre **Georgina Segundo González**; quien me educó y me demostró una gran determinación, legándome una educación adecuada; mostrándome los valores de la mejor manera que pudo hacerlo. Trabajando día y noche para que alcanzara mis metas.

A mi padre **Santiago Márquez Tercero**; por enseñarme que los problemas tienen más de una solución, por mantenerse firme ante situaciones complicadas y por aceptar los cambios e intentarse a adaptar a ellos.

A mi hermana **Paola Márquez Segundo**; por ser mi ejemplo de superación personal, por todo el apoyo brindado, por enseñarme que la educación debe de ser divertida y creativa. Por cuidarme y ser mi centro de apoyo emocional.

A mi hermana **Cinthia Márquez Segundo**; por darme motivación, alegría y por darle un nuevo sentido a mi vida. Sé que aún no entiendes el porqué de mi ausencia, pero como una vez dijo Eckhart Tolle: el poder para crear un futuro mejor está contenido en el momento presente, creas un buen futuro creando un buen presente. Espero que entiendas que, para poder ayudarte, tuve que ayudarme primero.

A mi sobrino **Irving Santiago Cárdelas Márquez** y a mis Sobrinas: **Andrea Nicole Cárdelas Márquez** y **Samantha Cárdelas Márquez**; por darle alegría a quienes la necesitaban, por hacer sonreír a los rostros más serios, porque su llegada a mi vida me sirvió para entender que cuando creía que tenía todas las respuestas, de pronto, me cambiaron las preguntas. De esta manera me esforcé, no para ser un ejemplo a seguir, pues los niños nunca han sido muy buenos escuchando a sus mayores, pero nunca han fallado en imitarlos, confió en que ustedes encontrarán su propio camino.

A mi cuñado **Israel Cárdelas Barrios**; por darme tranquilidad y serenidad, eso me ayudo para enfocarme en mis estudios, sabiendo que mi hermana esta con alguien que la ama y la protege como yo lo haría. Por ser un buen ejemplo para mis sobrinos y por ayudar a mi familia, por traerme esa seguridad.

*A el Lic. **Arturo Cruz Anaya**; por todo el apoyo recibido durante mi estancia en mis prácticas profesionales, por su disponibilidad, las prestaciones de equipo, los conocimientos compartidos y por su amistad.*

*A la Dra. **Michelle Ivonne Ramos Robles**; por convertirse en la tutora que necesité durante mi desarrollo como profesionalista, por los consejos, la escucha, por el apoyo y por la amistad formada.*

*Al M.C. **Juan Manuel Cepeda Dovala**; por ser el primero en aconsejarme y darme motivación en mi llegada a mi Alma Mater, ser un consejero durante la carrera y ser una persona la cual estuvo presente en mi desarrollo como profesionalista.*

*Al Señor **Daniel Jaimez Sánchez**; por el apoyo económico y sustentar mis estudios, su apoyo a mí persona fue crucial e indispensable, pensar que una persona es tan generosa y por siempre estar al pendiente de mi familia.*

*Al señor **Miguel Ramos Palmas** y la señora **María Luisa Ramos Palmas**; por abrirme las puertas de su hogar, por apoyarme emocionalmente, moralmente y económicamente; gracias por la confianza depositada.*

*A **Guillermo Nava Vega**; quien es la persona responsable de que yo conociera la universidad, por el tiempo en el que me brindó su compañía, por las anécdotas, aventuras y por tu amistad. La decisión más rápida y sin pensar que tomamos es la que cambió nuestras vidas por completo.*

*A **Saúl Márquez Maldonado**; por ser una de las amistades presentes y que siempre me recibe a pesar de los años, quien me aconsejó y pese a que no nos frecuentamos seguido nunca se ha perdido esa conexión. Gracias por la motivación año tras año.*

*A **Sadot Adrián Ramos Nolasco**; quien me ha brindado su amistad, me recibe en su casa, me alienta a seguir adelante, por los consejos dados y por su amistad.*

*A **Uriel Estrada Serafín**; por su amistad incondicional, por los consejos, por estar presente en mi trayecto y formación como profesionalista. Por ser una de las personas que me inspiro a tener una realización personal.*

*A mis compañeros de generación, en especial a **Zulema Maciel** gracias por las vivencias, el cariño, las anécdotas y tu compañía. Recuerda “Avatar-libro 2, capítulo 8, min 8.88”; a **Raquel García** gracias por el tiempo compartido, por las risas, el abrirme las puertas de tu casa, la ayuda, los consejos, por tu amistad y el estar presente para mí; a **Mary Carmen Inadire, Paulina Lascare**s y **Alberto Ledezma** por su amistad y anécdotas compartidas, por los consejos dados, por el apoyo durante toda nuestra formación como profesionistas. Espero que sigamos frecuentándonos y recuerden que el orden de los factores no altera el cariño.*

*A mis Roomies **Diego Iván, Omar Garduño** y **Carlos Vásquez**; por su compañía, amistad, por las anécdotas, los consejos, la ayuda, por cuidarme y por aguantarme durante tantos años.*

*A mis compañeros de laboratorio y los superfarsantes gracias por estar en esta última etapa, me hubiera gustado conocerlos antes, pero las personas hacen acto de presencia en el momento adecuado; por las risas, el recibimiento, los conocimientos compartidos y demás. En especial a **Francisco H<sup>2</sup>, Diego Parra, Ulises Cacho, Araceli Rivera** y **Anel Lara**.*

*A todas las personas presentes y que tuve la fortuna de conocer, antes y después de este proceso académico solo me queda decirles gracias.*

## ÍNDICE GENERAL

|  |    |
|--|----|
| AGRADECIMIENTOS .....  | 4  |
| DEDICATORIAS .....   | 5  |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | 10 |
| ÍNDICE DE TABLAS .....   | 11 |
| ABREVIATURAS.....  | 12 |
| RESUMEN .....  | 14 |
| ABSTRACT.....  | 15 |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| 2. JUSTIFICACIÓN .....   | 2  |
| 3. OBJETIVO GENERAL.....                                       | 3  |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                 | 3  |
| 5. ANTECEDENTES .....  | 4  |
| 5.1 Clasificación Taxonómica.....                              | 4  |
| 5.1.1 Familia Asparagaceae.....                                | 4  |
| 5.1.2 Género <i>Agave</i> .....                                | 4  |
| 5.2 Descripción botánica.....                                  | 5  |
| 5.2.1 Tallo.....   | 5  |
| 5.2.2 Hojas.....   | 5  |
| 5.2.3 Flores .....   | 6  |
| 5.2.4 Raíz.....  | 7  |
| 5.2.5 Metabolismo .....  | 8  |
| 5.3 Especies de consulta.....                                  | 8  |
| 5.3.1 <i>Agave gentryi</i> .....                               | 8  |
| 5.3.2 <i>Agave atrovirens</i> .....                            | 9  |
| 5.3.3 <i>Agave parrasana</i> .....                             | 10 |
| 5.3.4 <i>Agave montana</i> .....                               | 11 |
| 5.4 Distribución geográfica.....                               | 12 |
| 5.5 Importancia de los agaves .....                            | 14 |
| 5.6 Códigos de barras de ADN (importancia y aplicaciones)..... | 15 |
| 5.7 Marcadores moleculares <i>matK</i> y <i>rbcL</i> .....     | 19 |
| 5.7.1 <i>matK</i> : maturasa K.....                            | 19 |
| 5.7.2 <i>rbcL</i> : ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa.....   | 20 |
| 5.8 Análisis filogenético.....                                 | 21 |

|   |    |
|---|----|
| 5.9 Cálculo de distancias genéticas .....                             | 22 |
| 5.10 Taxonomía tradicional y códigos de barras de ADN .....           | 23 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 24 |
| 6.1 Colecta de material vegetal .....                                 | 24 |
| 6.2 Extracción de ADN genómico .....                                  | 24 |
| 6.3 Electroforesis en el gel de agarosa .....                         | 25 |
| 6.4 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ..... | 25 |
| 6.5 Secuenciación.....  | 26 |
| 6.6 Búsqueda, descarga y alineamiento de secuencias .....             | 26 |
| 6.7 Análisis de códigos de barras de ADN .....                        | 27 |
| 6.8 Análisis de la calidad de la secuencia .....                      | 27 |
| 6.9 Herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST).....   | 27 |
| 6.10 Distancia genética .....   | 27 |
| 6.11 Construcción de Dendrogramas .....                               | 28 |
| 6.12 Brecha de códigos de barra de ADN.....                           | 28 |
| 7. RESULTADOS .....   | 29 |
| 7.1 Colecta de material vegetal .....                                 | 29 |
| 7.2 Extracción de ADN genómico .....                                  | 31 |
| 7.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ..... | 31 |
| 7.4 Análisis de secuencias.....                                       | 32 |
| 7.5 Búsqueda, descarga y alineamiento de secuencias .....             | 33 |
| 7.6 Análisis de la calidad de secuencias.....                         | 35 |
| 7.7 Análisis de códigos de barras de ADN .....                        | 37 |
| 7.7.1 Alineamiento de secuencias .....                                | 37 |
| 7.7.2 Distancia genética.....   | 38 |
| 7.7.3 Construcción de Dendrogramas .....                              | 39 |
| 7.7.4 Brecha de códigos de barra de ADN .....                         | 40 |
| 8. DISCUSIÓN .....  | 41 |
| 9. CONCLUSIÓN.....  | 45 |
| 10. LITERATURA CITADA .....   | 46 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Morfología de un <i>Agave sp.</i> ....  | 6  |
| Figura 2. Partes de un <i>Agave sp.</i> (Romano-Grande E., 2017). ....  | 7  |
| Figura 3. Planta de <i>A. gentryi.</i> ....   | 9  |
| Figura 4. Planta de <i>A. atrovirens.</i> ....  | 10 |
| Figura 5. Planta de <i>A. parrasana.</i> ....   | 11 |
| Figura 6. Planta de <i>A. montana.</i> .....  | 12 |
| Figura 7. Distribución de agaves en México (Vázquez-Elorza, 2020). ....   | 13 |
| Figura 8. Partes de un dendrograma. ....  | 22 |
| Figura 9. Matriz de distancias y matriz del modelo Kimura <i>matK</i> y <i>rbcL.</i> ....   | 28 |
| Figura 10. Sitos de colecta de material vegetal en localidades de Coahuila e Hidalgo. ....  | 30 |
| Figura 11. Especies colectadas. ....  | 31 |
| Figura 12. Extracción de ADN genómico. ....   | 31 |
| Figura 13. Amplicones obtenidos a partir de la región plastídica del gen <i>matK.</i> ....  | 32 |
| Figura 14. Amplicones obtenidos a partir de la región plastídica del gen <i>rbcL.</i> ....  | 32 |
| Figura 15. Electroferograma de la especie <i>A. gentryi</i> (extremo 5' - 3'). ....   | 33 |
| Figura 16. (A) Análisis de secuencias consulta y referencia de agaves ....  | 34 |
| Figura 17. Alineamiento de secuencias consulta y secuencias referencia de agaves. ....  | 35 |
| Figura 18. Figura (A) sitios de conservación con marcador <i>matK</i> , (B) sitios variables con marcador <i>matK</i> y (C) sitios informativos o Indels con marcador <i>matK rbcL.</i> ..... | 37 |
| Figura 19. Análisis filogenético molecular <i>matK</i> K2P. ....  | 39 |
| Figura 20. Análisis filogenético molecular <i>rbcL</i> K2P. ....  | 39 |
| Figura 21. Brecha de código de barras de ADN con la región <i>rbcL.</i> .....   | 40 |
| Figura 22. Brecha de código de barras de ADN con la región <i>matK.</i> ....  | 41 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Taxonomía botánica del género <i>Agave</i> .....   | 5  |
| Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>A. gentryi</i> .....  | 9  |
| Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>A. atrovirens</i> .....   | 10 |
| Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>A. parrasana</i> .....  | 11 |
| Tabla 5. Clasificación taxonómica de <i>A. montana</i> .....  | 12 |
| Tabla 6. Tabla de volúmenes y concentraciones utilizados para la PCR. ....                              | 25 |
| Tabla 7. Cebadores y programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN. ....                     | 26 |
| Tabla 8. Especies y localización geográfica de muestras colectadas. ....                                | 29 |
| Tabla 9. Número de accesión de BOLD Systems de secuencias sometidas a comparaciones filogenéticas. .... | 35 |
| Tabla 10. Resumen de variabilidad.....  | 37 |
| Tabla 11. Resultados de identificación usando <i>rbcl</i> por el método de BLAST. ....                  | 37 |
| Tabla 12. Resultados de identificación usando <i>matK</i> por el método de BLAST. ....                  | 38 |
| Tabla 13. Identificación de especies mediante la distancia genética más cercana. ....                   | 38 |

## **ABREVIATURAS**

°C: Grados centígrados.

μl: Microlitro.

μM: Micrómetro.

A: Agave.

ADN: Ácido de desoxirribonucleico.

ANSM: Herbario Antonio Narro Unidad Saltillo México.

APG: Angiosperm Phylogeny Group/Grupo para la Filogenia de las Angiospermas.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool/Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

BOLD: Barcode of Life Data System/Sistema de datos de código de barras de vida.

C: Sitio Conservados.

CAM: Crassulacean Acidic Metabolism/Metabolismo ácido de crasuláceas.

CBOL: Consortium for the Barcode of Life/Consortio para el Código de Barras de la Vida.

CBV: Código de Barras de la Vida.

CIBNOR: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono.

COI: Citocromo c Oxidasa I.

CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

CONACYT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

cm: Centímetros.

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide/Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

ECOSUR: El Colegio de La Frontera Sur.

g: gramos.

ITS: Internal Transcribed Spacer/Espaciador interno transcrito.

K2P: 2 Parámetros de Kimura.

LANGEBIO: Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad.

m s. n. m. Metros Sobre el Nivel de Mar.

*matK*: Maturase K/ Madurasa K.

NCBI: National Center for Biotechnology Information/Centro Regional de Información Biotecnológica.

ng: Nanogramo.

NOM: Norma Oficial Mexicana.

pb: Pares de bases.

PCR: Polymerase Chain Reaction/Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Pi: Sitios Informativos o Indels.

*rbcL*: Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa.

rpm: Revoluciones Por Minuto.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

V: Sitios Variables.

## RESUMEN

Actualmente se vive en una crisis ambiental de biodiversidad, donde los recursos naturales son sobreexplotados y degradados a niveles extremos; mismos recursos que no se pueden recuperar, siendo afectado el acervo natural, este se ve abatido al punto de desaparecer. En México existe un género de plantas muy peculiar conocido como *Agave* y las especies de este género se les conocen comúnmente como “maguey”, mismas que pertenecen a la familia Asparagaceae; una familia que es considerada de difícil agrupación taxonómica de las especies que la conforman, por las notables características que la preceden y sus parámetros en vista de que presentan una morfología heterogénea y desde un punto de vista molecular aún no está bien caracterizada; la información taxonómica de este género aún es muy escasa, sumando a que solo los especialistas pueden determinar y diferenciar las especies de esta familia, se presentan diferentes obstáculos para su preservación y conocimiento. México al ser el centro de origen del *agave*, no solo cuenta con la mayor diversidad de este género, también se le han encontrado múltiples usos a tan emblemática planta, desde usos industriales, ornamentales, gastronómicos etc. El presente trabajo tuvo como objetivo la caracterización molecular de cuatro especies de agaves (*A. gentryi*, *A. parrasana*, *A. montana* y *A. atrovirens*) mediante la metodología de código de barras de ADN. El poder discriminatorio de dos regiones de ADN (*rbcL* y *matK*) se evaluó mediante cuatro análisis ampliamente utilizados en Códigos de Barras de ADN: BLAST, distancia genética, unión de vecinos cercanos y brecha de código de barras. Los diferentes métodos analíticos mostraron un poder discriminatorio diferente respecto a las especies en cuestión.

**Palabras clave:** *Agave*, ADN, discriminatorio, *matK*, *rbcL*.

## ABSTRACT

We are currently living in an environmental crisis of biodiversity, where natural resources are overexploited and degraded to extreme levels; the same resources that cannot be recovered, being affected the natural acquis, this is reduced to the point of disappearing. In Mexico there is a very peculiar genus of plants known as *agave* and the species of this genus are commonly known as "maguey", which belong to the family Asparagaceae; a family that is considered difficult taxonomic grouping of the species that make it up, for the remarkable characteristics that precede it and ITS parameters in view of the fact that it presents a heterogeneous morphology and from a molecular point of view is not yet well characterized; the taxonomic information of this genus is still very scarce, adding that only specialists can determine and differentiate the species of this family, there are different obstacles to ITS preservation and knowledge. Mexico, being the center of origin of *agave*, not only has the greatest diversity of this genus, but also multiple uses have been found to such an emblematic plant, from industrial, ornamental, gastronomic uses etc. The present work aimed at the molecular characterization of four species of agaves (*A. gentryi*, *A. parrasana*, *A. montana* and *A. atrovirens*) using the DNA barcode methodology. The discriminatory power of two REGIONS OF DNA (*rbcL* and *matK*) was assessed by four analyses widely used in DNA Barcodes: BLAST, genetic distance, close neighbor union, and barcode gap. Different analytical methods showed a different discriminatory power with respect to the species in question.

**Keywords:** *Agave*, DNA, discriminatory, *matK*, *rbcL*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El agave es una planta muy peculiar especialmente para México, es concomitante de historia, tradición, cultura y misticismo; la versatilidad que tiende a ofrecer a diferentes áreas como lo son las culturales, sociales, económicas, ambientales, étnicas y productivas le ha permitido destacar y sobresalir, aunado a que posee características únicas que le permiten sobrevivir dentro de los ecosistemas áridos y semiáridos donde las condiciones son remotas, proveyendo refugio y alimento para una amplia gama de especies desde insectos hasta mamíferos, además sirve como apoyo en la reducción de la erosión. México es considerado como centro de origen por la gran diversidad de especies descritas, con un registro total hasta la fecha del 76% de las especies a nivel mundial (Espinoza-Barrera Laura Angelica, 2015); los agaves tienen diferentes usos, entre los que destacan son: la producción de alimentos, fibras, forraje, medicinales, elaboración de bebidas fermentadas (Rosales *et al.*, 2008); sin embargo, las poblaciones naturales de agaves están sufriendo una fuerte presión por el incremento en la demanda de productos derivados y/o por actividades antropogénicas, lo cual provoca una alta vulnerabilidad, por ello es importante generar estrategias eficaces de conservación para dichas especies (Ortiz *et al.*, 2009).

De acuerdo con la taxonomía clásica en la familia Asparagaceae existen problemas con la nomenclatura y estructura de varios taxones del género *Agave*, esto, debido a la continua descripción de nuevas especies que han hecho crecer los grupos, sin embargo, la delimitación de los mismos sigue siendo controversial (García-Mendoza Abisaí J., 2007). Por lo anterior se ha optado por generar un conocimiento más detallado, en donde participan diferentes disciplinas como la Taxonomía, Etnobotánica, Bioquímica y Biología Molecular; esta última juega un papel importante pues se le considera como una herramienta que permite visualizar de una manera más precisa la clasificación de los organismos y, en el caso de los agaves, se han iniciado estudios que permitirán tener una mejor comprensión en la delimitación de especies (González-Álvarez Marcela, 2005).

Una aplicación importante de la genética molecular es la identificación de material biológico, ya que muchas veces resulta difícil identificar a un organismo sin la ayuda de un especialista (M. Rocha & Gasca, 2007).

Ante esta problemática, surge en el año 2003 el concepto denominado “Código de Barras de la Vida” (CBV), el cual se basa en el empleo de la variabilidad nucleotídica existente en regiones cortas y estandarizadas del genoma que sirve como auxiliar en la identificación y descubrimiento de especies biológicas en grandes grupos taxonómicos de manera rápida y eficaz (D. Gernandt *et al.*, 2009). Las regiones de ADN en plantas terrestres de acuerdo con el CBOL son las regiones del cloroplasto *matK* y *rbcL* (Fazekas *et al.*, 2012). La región *matK* está involucrada en la codificación de los plastos lo que significa que evoluciona rápidamente y consistentemente ha demostrado altos niveles de discriminación entre especies de plantas terrestres y tiene un alto grado de variabilidad (Hollingsworth, 2011). La región *rbcL* es el gen mejor caracterizado y es adecuado para la recuperación de secuencias de alta calidad, pero no es la región más variable, por lo que se utiliza como un componente en las combinaciones multilocus (D. S. Gernandt *et al.*, 2007). Dichos genes fueron seleccionados por su alta universalidad y por su capacidad de discriminación (Salazar-Chávez Gerardo, 2009).

Los esfuerzos para la caracterización molecular, uso sustentable y conservación de los recursos genéticos de las agaváceas mexicanas, aun son escasos; por lo anterior mencionado el objetivo de este trabajo fue probar el poder de identificación de dos regiones del código de barras de ADN (*rbcL* y *matK*) en especies de *A. gentryi*, *A. parrasana*, *A. montana* y *A. atrovirens*.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La importancia de esclarecer el taxón de determinadas especies de flora o fauna permitirá aprovechar y conservar el acervo que se está perdiendo debido a la degradación ambiental y la sobreexplotación de recursos naturales; los Códigos de Barras de la Vida representan una nueva vía para preservar la biodiversidad biológica e impulsar el libre acceso a la información de diferentes especies, misma que es confiable y que impulsará nuevos proyectos; así mismo se podrán hacer identificaciones rápidas y precisas para nuevos estudios de conservación y el aprovechamiento de estos mismos recursos.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar molecularmente cuatro especies del género *Agave* L. mediante dos regiones de código de barras de ADN (*rbcL* y *matK*) para evaluar su poder discriminatorio.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar las secuencias obtenidas de cada una de las especies de agaves colectados.
2. Determinar el grado de parentesco de las especies analizadas por medio de dendrogramas.
3. Generar códigos de barras de ADN para contribuir con las bases de datos de NCBI y BOLD SYSTEMS.

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 Clasificación Taxonómica

#### 5.1.1 Familia Asparagaceae

La familia fue descrita por Antoine Laurent de Jussieu y publicado en *Genera Plantarum* 40 en 1789. Es una familia de plantas monocotiledóneas perteneciente al orden Asparagales; la familia es reconocida por sistemas de clasificación modernos (Mark W. Chase & James L. Reveal, 2009) por sus siglas en inglés (Angiosperm Phylogeny Group), dentro de la familia podemos encontrar alrededor de 150 géneros divididos en 7 subfamilias: Agavoideae, Aphyllanthoideae, Asparagoideae, Brodiaeoideae, Lomandroideae, Nolinoideae y Scilloideae, sin embargo los límites infrafamiliares en Asparagaceae no están bien definidos dado que los criterios para delimitar las subfamilias son arbitrarios (García-Mendoza *et al.*, 2019). Actualmente diversos autores opinan que la ubicación taxonómica de la familia aún es controversial pues Asparagaceae presenta una morfología heterogénea y desde un punto de vista molecular aún no está bien caracterizada (APG IV., 2016).

#### 5.1.2 Género *Agave*

La delimitación genérica y el número de especies que lo componen ha variado a lo largo del tiempo, los agaves son un género de plantas generalmente suculentas, pertenecientes a la antigua familia Agavaceae a la cual deben su nombre; este género es originario de América, y la mayor concentración de especies se encuentra en México donde son conocidas como magueyes o mezcales; el género fue dado a conocer científicamente en Europa, en 1753; por el naturalista sueco Carlos Linneo, quien lo tomó del griego *Agavos* que significa “noble o admirable”, fue ubicado en la Clase VI, Hexandria Monogynia. Posteriormente, fue incluido en diferentes familias, como Amaryllidaceae, Agavaceae y en años recientes, con base en evidencias morfológicas y moleculares en Asparagaceae, subfamilia Agavoideae (Tabla 1); se calcula que el género surgió hace apenas 12 millones de años (APG IV., 2016; García-Mendoza A., 2002; Mark W. Chase & James L. Reveal, 2009).

**Tabla 1.** Taxonomía botánica del género *Agave*.

| <b>Taxonomía</b>  |               |
|-------------------|---------------|
| <b>Reino</b>      | Plantae       |
| <b>División</b>   | Magnoliophyta |
| <b>Clase</b>      | Liliopsida    |
| <b>Subclase</b>   | Liliidae      |
| <b>Orden</b>      | Asparagales   |
| <b>Familia</b>    | Asparagaceae  |
| <b>Subfamilia</b> | Agavoideae    |
| <b>Género</b>     | <i>Agave</i>  |

## 5.2 Descripción botánica

Los agaves son plantas xerófitas y perennes que presentan modificaciones o especializaciones morfológicas como una estrategia para sobrevivir en ambientes desérticos, tienen una forma característica de roseta y poseen raíces ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos y metabolismo fotosintético tipo CAM (Figura 1) (Andrade, 2007).

### 5.2.1 Tallo

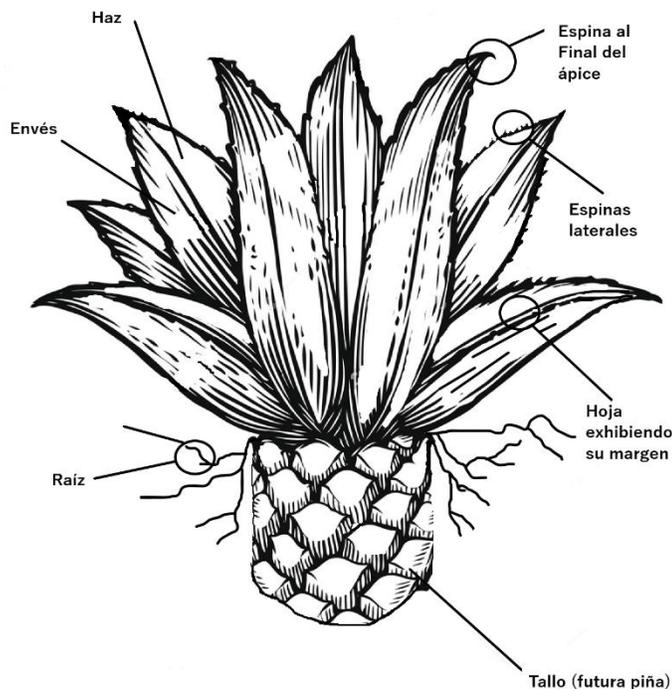
Comprenden plantas acaulescentes (sin tallo aparente); de porte pequeño hasta plantas arbóreas, con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, el cual puede ser corto y apenas sobrepasar unos centímetros del suelo, o bien, ser largo y erecto, el tallo es el principal órgano de almacenamiento de agua y carbohidratos de reserva; en varias especies el tallo se dobla hasta el sustrato, esta estructura permite que el agua en forma de lluvia o de rocío sea capturada y dirigida hacia el suelo y las raíces (Troiani, 2017).

### 5.2.2 Hojas

El desarrollo de succulencia en las hojas es una de sus adaptaciones más conspicuas, las hojas le permiten el almacenamiento de agua, por lo general son suculentas, fibrosas y carnosas, esto permite que las plantas sobrevivan durante algún tiempo en ausencia de suministro de agua exterior, su forma varía de linear a lanceolada u ovalada con la base dilatada y carnosa;

y los márgenes exhiben una gran diversidad morfológica, pero casi siempre tienen una espina al final del ápice que puede medir desde algunos milímetros hasta cinco centímetros (García-Mendoza Abisaí J., 2007).

El envés muestra la huella de los dientes de la hoja que le antecedió, lo que es muy notorio en las especies con hojas suculentas; el color de las mismas se representa en tonos de verde y glauco o amarillos, rojizos o violetas; el bandeo de las hojas con segmentos alternantes claros y oscuros se debe a las variaciones en el grosor de la cutícula y aparentemente, se origina por condiciones irregulares de crecimiento, que dependen de las condiciones climáticas (González-Medrano Francisco, 2012).



**Figura 1.** Morfología de un *Agave sp.*

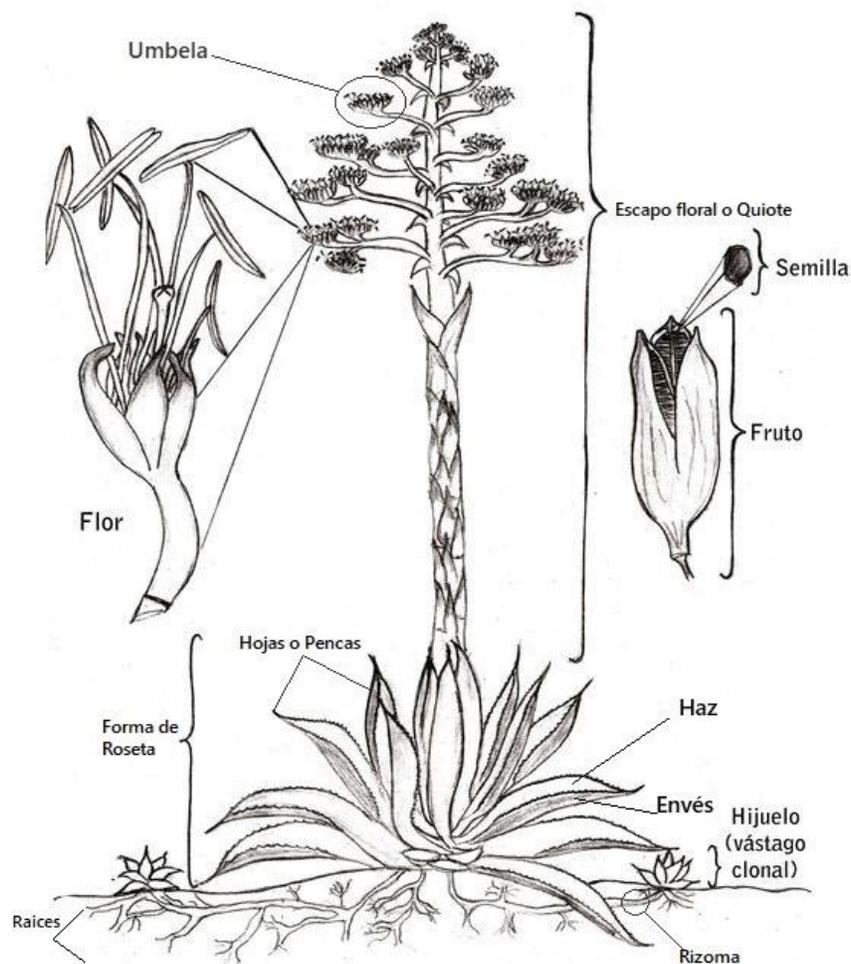
### 5.2.3 Flores

Las flores aparecen desde el centro de la roseta de hojas en un tallo denominado escapo floral que es semileñoso, conocido comúnmente como quiote; el fruto puede ser una cápsula o baya (García-Mendoza Abisaí J., 2007). La inflorescencia que surge del meristemo apical del maguey suele ser desproporcionada en relación con el tamaño de la planta (Figura 2). Las flores son hermafroditas, actinomorfas, trímeras, solitarias o agrupadas en inflorescencias paniculadas, el pedúnculo floral tiene brácteas que se reducen en tamaño desde la base hasta

el ápice; son bisexuales, tubulares, con ovario ínfero y poseen seis tépalos secos (Troiani, 2017).

#### 5.2.4 Raíz

Las raíces pueden ser fibrosas, ramificadas y profundas, parten de un tallo subterráneo denominado rizoma, el sistema de raíz de los agaves también puede ser superficial, lo cual facilita la absorción de agua de lluvia, generalmente escasa, que permiten la captación eficiente de pequeñas cantidades de agua.



**Figura 2.** Partes de un *Agave sp.* (Romano-Grande E., 2017).

### 5.2.5 Metabolismo

El metabolismo ácido crasuláceo (CAM), típico de algunos géneros y familias de los agaves que crecen en zonas con altas temperaturas; las plantas con metabolismo CAM tienen transpiración nocturna, constituyen una especialización fisiológica en los agaves, abren sus estomas en la noche, fijan el carbono en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, que se acumulan en vacuolas; durante el día el ácido málico es descarboxilado y se obtiene carbono (CO<sub>2</sub>) el cual se almacena en forma de ácidos orgánicos en la vacuola y éste se incorpora a la fotosíntesis el cual es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos; por lo tanto, la transpiración es menor y da como resultado ganancias en carbono perdiendo lo mínimo en agua, de tal manera que la probabilidad de supervivencia de una roseta en sequías prolongadas depende del volumen de agua y de los carbohidratos almacenados durante la época favorable; así mismo, en época seca el agua almacenada ayuda a mantener las reacciones bioquímicas y la apertura de estomas para la asimilación de CO<sub>2</sub> en condiciones prolongadas de sequía, por lo menos diecisiete taxa de agaves tienen este tipo de metabolismo; mientras que otras son hasta cierto punto “facultativas”, ya que en condiciones de riego frecuente o en laboratorio los estomas abren de día, absorben CO<sub>2</sub> siguiendo probablemente la ruta fotosintética denominada C3 (García-Mendoza Abisaí J., 2007).

## 5.3 Especies de consulta

### 5.3.1 *Agave gentryi*

Conocido también como maguey verde; se observa un tallo corto por lo que se consideran subacaulescentes, las hojas son lisas, suculentas, planas dorsiventralmente y pueden ser rígidas de 45 a 80 cm de largo por 17 a 25 cm de ancho, de color verde claro a verde oscuro; la forma de la hoja es lanceolado triangular, con márgenes parcial o totalmente córneos, de 0.1 a 0.3 cm; el ápice de las hojas es largamente acuminado, las hojas forman una roseta, donde en el centro sale un cono central llamado cogollo, las hojas al madurar se van separando de esta estructura dejando una impresión de su margen en el envés de la siguiente hoja; los dientes están separados entre sí a una distancia de 2.1 a 5.5 cm, el color de los dientes es de tono café oscuro, color negro opaco, café grisáceo o café rojizo, deltoides, de 0.8 a 1.2 (1.5) cm, la forma del contorno de la inflorescencia es aovada, el tamaño de las

flores se de 4.8 a 8 cm de longitud, en el androceo se tienen 6 estambres, los filamentos son exertos, filiformes y planos dorsiventralmente, están insertos en la mitad del tubo, las anteras son introrsas; el fruto es una cápsula de forma oblonga de 6 a 7.5 cm de largo por 2 a 2.7 cm de ancho.

La distribución abarca los estados de Nuevo León y Coahuila, principalmente en la Sierra Madre Oriental (González-Álvarez Marcela, 2005).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *A. gentryi*.

| Taxonomía         |                |
|-------------------|----------------|
| <b>Reino</b>      | Plantae        |
| <b>División</b>   | Magnoliophyta  |
| <b>Clase</b>      | Liliopsida     |
| <b>Orden</b>      | Asparagales    |
| <b>Familia</b>    | Asparagaceae   |
| <b>Subfamilia</b> | Agavoideae     |
| <b>Género</b>     | <i>Agave</i>   |
| <b>Especie</b>    | <i>gentryi</i> |



**Figura 3.** Planta de *A. gentryi*.

### 5.3.2 *Agave atrovirens*

Conocido comúnmente como maguey pulquero; posee un tamaño máximo de 2 a 4 metros de altura, siendo la especie más alta del género *Agave*, posee hojas lanceoladas, de color verde oscuro, de unos 30 a 40 cm de ancho, de hasta 150 cm de longitud que se disponen en forma de roseta desde el centro, de color verde claro a glaucas, pruinosas, margen recto a ligeramente ondulado, cada hoja termina en una espina alargada de 10 a 12 cm de longitud de color negro o grisáceo y 3 a 4 mm de anchura, las hojas son perennes, es decir no se renuevan durante la estación fría; espinas laterales de 5 mm de longitud sobre una base ensanchada; inflorescencia paniculada, contorno general oblongo, flores 8 a 9.5 cm de largo, robustas de color verde amarillentas con ápice rojizo, tépalos 3 a 4 cm largo, 4 a 9 mm ancho, triangulares u oblongos, erectos, gruesos, los externos ligeramente más largos que los internos, el tallo porta la inflorescencia que forma un racimo. Su distribución abarca los estados de Morelos, Hidalgo, Puebla, Estado de México y Oaxaca (Martínez-Agustino Antonio *et al.*, 1995).

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *A. atrovirens*.

| <b>Taxonomía</b>  |                   |
|-------------------|-------------------|
| <b>Reino</b>      | Plantae           |
| <b>División</b>   | Magnoliophyta     |
| <b>Clase</b>      | Liliopsida        |
| <b>Orden</b>      | Asparagales       |
| <b>Familia</b>    | Asparagaceae      |
| <b>Subfamilia</b> | Agavoideae        |
| <b>Género</b>     | <i>Agave</i>      |
| <b>Especie</b>    | <i>atrovirens</i> |



**Figura 4.** Planta de *A. atrovirens*.

### 5.3.3 *Agave parrasana*

Conocido comúnmente como maguey de parras; la roseta alcanza solamente 40 a 60 cm, se distingue por sus rosetas pequeñas, globosas, compactas y solitarias, frecuentemente de color gris claro a glauco azulado o verde pálido, sus hojas son oblongas, densamente imbricadas, planas a cóncavas arriba, gruesas, rígidas, la variación en las dimensiones de la hoja mide de 14.5 a 22.5 cm, con respecto al ancho de la hoja, se observó que las medidas varían de 10 a 11.5 cm, las hojas son de color gris azulado y de textura cerosa; presentan agudas espinas de color rojizo, la longitud, forma y engrosamiento de la espina es de 1.1 a 4.5 cm de longitud por 0.2 a 0.7 de ancho en la base, disminuyendo en tamaño hacia la base, separados entre sí por 1 a 2.5 cm, con inflorescencia paniculada elíptica, umbelas compactas, bracteoladas, brácteas del escapo grandes, suculentas, rojizas a púrpuras; flores 50 a 60 mm de longitud, color rojo intenso a purpúreas, amarillas al abrirse, tépalos 15 x 5 a 6 mm, lanceolados, casi iguales, más bien gruesos, de color amarillo pálido; fruto capsular de 5.3 x 1.7 mm, florecen a inicios de verano pero sólo lo hacen una vez al cabo de varias décadas y mueren habiendo desarrollado hijuelos en la base, su fruto es de tipo capsular. Se reporta como endémica para Coahuila (García-Mendoza A., 2002).

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica de *A. parrasana*.

| Taxonomía         |                  |
|-------------------|------------------|
| <b>Reino</b>      | Plantae          |
| <b>División</b>   | Magnoliophyta    |
| <b>Clase</b>      | Liliopsida       |
| <b>Orden</b>      | Asparagales      |
| <b>Familia</b>    | Asparagaceae     |
| <b>Subfamilia</b> | Agavoideae       |
| <b>Género</b>     | <i>Agave</i>     |
| <b>Especie</b>    | <i>parrasana</i> |



**Figura 5.** Planta de *A. parrasana*.

#### 5.3.4 *Agave montana*

Conocido también como maguey de montaña; son plantas multianuales, no rizomatosas; de rosetas hemisféricas, compactas, 1.40 a 1.65 m de diámetro, 90 a 1.25 m de alto; la variación en las dimensiones de la hoja mide de 45 a 48 cm de longitud y las de mayores dimensiones, de 230 a 300 cm de largo, cortamente elípticas, ligeramente cóncavas a casi planas, 30 a 40 cm de largo, 15 a 17 cm de ancho, de color verde amarillento, base ensanchada, ápice acuminado con borde de color café púrpura, espina de 3 a 5 cm de largo, margen recto con 16 a 18 dientes grisáceos antrorsos y retrorsos por lado, separados 2.5 a 3.5 cm con inflorescencia de 3.5 a 4.5 m de alto, ovoide, con dientes marginales y espina terminal, cóncavas, succulentas, café rojizas, cubriendo completamente el tallo floral; tallo floral 12 a 16 cm de diámetro; flores 6 a 7 cm de largo, tubo del perianto 2 cm de largo, 12 a 14 mm ancho, tépalos lanceolados, 2 cm de largo, 3 a 4 mm de ancho, filamentos 5 a 6 cm de largo y 3 mm de ancho, aplanados, insertos en la base de los tépalos, anteras de 19 a 20 mm de largo y 2 mm de ancho, amarillas; cápsulas oblongas, de 5 a 6 cm de largo y 1.5 a 2 cm de ancho, de color café oscuro; semillas lacrimiformes, 5 a 6 mm largo, 3 a 4 mm ancho, de color negro brillante. Se considera como endémica para el área limítrofe de Nuevo León y Coahuila (Villarreal Q, 1996).

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica de *A. montana*.

| Taxonomía         |                |
|-------------------|----------------|
| <b>Reino</b>      | Plantae        |
| <b>División</b>   | Magnoliophyta  |
| <b>Clase</b>      | Liliopsida     |
| <b>Orden</b>      | Asparagales    |
| <b>Familia</b>    | Asparagaceae   |
| <b>Subfamilia</b> | Agavoideae     |
| <b>Género</b>     | <i>Agave</i>   |
| <b>Especie</b>    | <i>montana</i> |

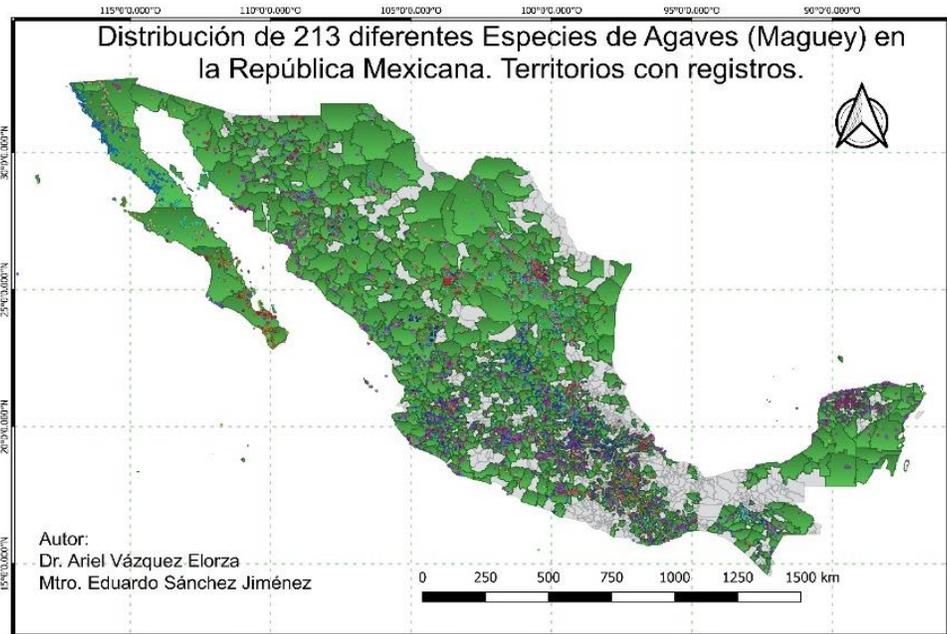


**Figura 6.** Planta de *A. montana*.

#### 5.4 Distribución geográfica

Es un género con amplia repartición, donde factores como altitud, clima, vegetación y fisiografía tienen una gran relevancia para la distribución de cada especie; es endémico de América, se distribuye desde el sur de Canadá (límites de la provincia de Alberta con Dakota del Norte, Estados Unidos) hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe, desde las Bahamas hasta Aruba y Trinidad y Tobago; los países con el mayor número de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala; los demás tienen menos de ocho especies, cifra que representa menos del 3% del total de especies registradas (García-Mendoza A., 2002). En México son abundantes, su hábitat abarca desde el nivel de mar, hasta los 3400 m s. n. m. Se asocian con matorral xerófilo, selvas secas y húmedas, bosque espinoso, bosque tropical caducifolio y en bosques de pino-encino, en las sierras meridionales del centro, Sierra Madre Occidental, Altiplano mexicano (de Chihuahua a Coahuila, Guanajuato y Querétaro), Península de Baja California y Sierra Madre Oriental; también en la Sierra Madre del Sur, Cuenca del río Balsas y la Planicie Tamaulipeca (Vázquez-Elorza Ariel & Rivera-Ramírez Javier, 2020). Los agaves pueden desarrollarse en distintos paisajes del territorio nacional, de acuerdo con la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) hay una presencia de aproximadamente 213 diferentes especies “silvestres” las cuales se encuentran localizadas en 2,286 municipios (Figura 7), principalmente en zonas áridas y semiáridas, pero su número disminuye drásticamente hacia las provincias húmedas y cálidas del sur, por lo que su ausencia es notoria en estados como Tabasco, Campeche y Quintana Roo (Iglesias-Mancera Emma, 2020). Son abundantes en las provincias florísticas de las Serranías Meridionales del centro de México, Sierra Madre Occidental, Altiplano

mexicano, península de Baja California, y Sierra Madre Oriental. Pero al subdividir a México en cuadrantes de un grado de longitud por un grado de latitud, el área de mayor riqueza corresponde a un cuadrante ubicado en la provincia del valle de Tehuacán-Cuicatlán con quince especies, siendo el área con mayor diversidad en México, pues no solo conserva una gran riqueza de grupos taxonómicos, sino también filogenéticos (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2019).



**Figura 7.** Distribución de agaves en México (Vázquez-Elorza, 2020).

El alto grado de endemismo de especies que existe en nuestro país se debe a la heterogeneidad del territorio y a las propiedades intrínsecas de cada taxón, tales como su plasticidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión y germinación de sus semillas, así como a sus interacciones bióticas con otros organismos, como los polinizadores, y a factores como los eventos históricos que han tenido lugar en Norteamérica, los cuales han influenciado la distribución actual de las especies (Eguiarte Luis; Souza Valeria & Silva-Montellano Arturo, 2000). En el matorral xerófilo pueden llegar a ser dominantes o codominantes, de tal manera que las comunidades vegetales reciben nombres que aluden a sus formas de vida, como lo es el matorral rosetófilo. También prosperan en tipos de vegetación templado, preferentemente en el bosque de encino (*Quercus*) y, en menor proporción, en el de coníferas y el mesófilo de montaña. Los tipos de suelo favorecen el crecimiento de los agaves, son diversos y pueden

ser tanto de origen ígneo como sedimentario, principalmente calizas. Esta diversidad de ambientes es uno de los factores que ha favorecido el gran número de taxones en México.

### **5.5 Importancia de los agaves**

El género *Agave* es uno de los géneros más característicos de México; su importancia va desde su valor social, económico, ecológico y cultural (Rosales *et al.*, 2008), de cuyo uso se tienen registros en México que datan de más de 10 mil años, nuestro país alberga aproximadamente un 76% de especies a nivel mundial, con ello se logró la domesticación mediante la selección humana, pues se les escogían por sus fibras, o por las altas cantidades de azúcares que les proporcionaban, diversificando la morfología y filogenética a nivel global de esta especie (Espinoza-Barrera Laura Angelica, 2015). En la Mesoamérica prehispánica, se elaboraban alimentos y bebidas fermentadas procedentes de los agaves, los cuales contaban con una alta relevancia cultural y social. En la actualidad, es de gran importancia para muchos pueblos indígenas y mestizos que lo han aprovechado como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, ornato, fibras duras extraídas, abono, construcción de viviendas, elaboración de implementos agrícolas entre otros usos. Los agaves son de las plantas más comerciales por los diferentes usos económicos de los cuales se les puede hacer provecho, teniendo como ejemplo la industria tequilera, de fibras naturales, mezcalera y gastronómica.

Los agaves se han utilizado como fuente de alimento, cabe destacar que son muy útiles en la culinaria tradicional: sus pencas se usan para envolver la barbacoa, sus flores llamadas gualumbos se guisan, también la cutícula o membrana de la penca se utiliza para envolver la carne de los mixiotes, como bebida con el aguamiel también pueden elaborarse productos como el pan de pulque, y como se mencionó anteriormente el tequila y los mezcales; como medicinal: los agaves contienen importantes fitoquímicos como vitaminas y saponinas, que ejercen beneficios para la salud, que en algunos casos pueden disminuir o perderse durante el proceso de fabricación de algunos productos como en la cocción de la piña de los agaves, en el procesamiento para hacer tequila (Santos-Zea *et al.*, 2012) y como material: para la elaboración de casas y fibras (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO, 2021).

## 5.6 Códigos de barras de ADN (importancia y aplicaciones)

Actualmente se ha observado una rápida y creciente tasa de extinción de especies, es entre cien y mil veces superior a las tasas observadas durante los cinco episodios de extinción masiva que precedieron la aparición del ser humano, se ha afirmado que la sexta extinción masiva puede estar en marcha, esta vez causada en su totalidad por humanos y sus actividades antropogénicas (Cowie *et al.*, 2022). Aunque la considerable evidencia indica que existe una crisis de biodiversidad, poco se ha hecho caso omiso a tales advertencias, es por ello que ante la acelerada pérdida de biodiversidad en todo el mundo debido al inadecuado uso de la tierra, la deforestación, el cambio climático, las especies invasoras y los patógenos emergentes, entre otras causas; las medidas de gestión de los recursos naturales se han enfocado en acelerar el inventario de la diversidad biológica, de comprender su funcionamiento e integrar su uso en el desarrollo sostenible de la sociedad humana (Barnosky *et al.*, 2011; Paz Andrea *et al.*, 2011).

Debido a esto, una estrategia para la conservación de este inventario puede ser la reserva genética ADN (ácido desoxirribonucleico); esta reserva es necesaria para la subsistencia de las plantas y animales pues en ella se encuentra la información para el desarrollo de los ya mencionados, la morfología, el apoyo para combatir enfermedades o plagas, el ciclo de vida y las futuras adaptaciones a condiciones climáticas distintas, además de que es posible estudiar su capacidad evolutiva (Espinoza-Barrera Laura Angelica, 2015). Por ello el código de barras de ADN fue presentado a la comunidad científica en el año 2003 por un grupo de investigación dirigido por el doctor Paul Hebert quien propuso un nuevo sistema de identificación y descubrimiento de especies; el cual se basa en “el empleo de la variabilidad nucleotídica existente en regiones cortas y estandarizadas del genoma, como auxiliar en la identificación y descubrimiento de especies biológicas en los grandes grupos taxonómicos de organismos” (D. Gernandt *et al.*, 2009), la cual sirve como una etiqueta para la identificación rápida y precisa de especies; el propósito de este sistema es de realizar una identificación más eficaz, de este modo facilitar la conservación, el conocimiento y el uso sustentable de la biodiversidad.

Para que una región del genoma pueda ser utilizada como código de barras de ADN es necesario que esta permita distinguir entre variación interespecífica (entre especies

cercanamente relacionadas) y variación intraespecífica (dentro de la misma especie). De lo anterior, se genera el concepto de “barcoding gap”, que es la diferencia que existe entre la variación interespecífica e intraespecífica; cuanto mayor sea la diferencia entre estas la discriminación específica será más acertada (Meyer & Paulay, 2005). Se propuso inicialmente para identificar animales a partir de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), de aproximadamente 648 pares de bases (pb), el cual en numerosos estudios ha mostrado que para varios grupos de aves, peces, mamíferos, lepidópteros y otros insectos este fragmento COI presenta una variación interespecífica suficientemente amplia, permitiendo buena correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Bergmann *et al.*, 2013).

La ventaja de usar COI es que es lo suficientemente corto para ser secuenciado de forma rápida y barata, pero al mismo tiempo lo suficientemente larga para identificar variaciones entre especies (Čandek & Kuntner, 2015). Sin embargo, el código de barras COI no es efectivo para la identificación de plantas porque evoluciona muy lentamente, pero dos regiones de genes en el cloroplasto, *matK* y *rbcL*, han sido aprobadas como las regiones de código de barras para plantas terrestres (Fazekas *et al.*, 2012). Pero algunos autores han sugerido que el solapamiento entre variación intraespecífica e interespecífica aumenta cuando se realizan muestreos con un mayor número de taxa emparentados, disminuyendo la fiabilidad del código de barras de ADN y algunos estudios han mostrado que estos marcadores, aun combinados, no presentan una variación suficiente para diferenciar especies cercanas en algunas familias de Angiospermas; para ello se optó la utilización de otros marcadores como la región transgénica *psbA-trnH*, el intrón *trnL* y la región nuclear ITS (Cowan *et al.*, 2006). Otras aplicaciones para el código de barras de ADN son en campos como ecología, genética de poblaciones, evolución y economía, los cuales se benefician actualmente de la disponibilidad de los datos moleculares (Paz Andrea *et al.*, 2011). En ecología, una de las aplicaciones más interesantes es la posibilidad de analizar la dieta de diferentes animales a partir de su contenido estomacal o de sus heces; ya que abre la posibilidad para entender el funcionamiento de los ecosistemas y el papel que juegan las especies en las redes tróficas y evaluar la estructura filogenética de las especies en coexistencia (Valentini *et al.*, 2009).

En el bosque tropical en particular, la colecta de datos de códigos de barras a nivel de comunidades permitirá homogenizar las identificaciones y cuantificar con mayor precisión los cambios en la estructura y diversidad de las mismas; a partir de secuencias de códigos de barras será posible establecer la filogenia de una comunidad (Erickson *et al.*, 2008). Por ejemplo, los códigos de barras pueden ser útiles para comprender el cambio en la composición de las comunidades debido a fenómenos como el cambio climático, asimismo los códigos de barras han permitido también cuantificar el efecto de una epidemia que ha causado una mortalidad masiva en anfibios, a pesar de que la taxonomía de los miembros de la comunidad estaba incompleta (Crawford *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista económico, una de las aplicaciones más importantes de los códigos de barras de ADN se presenta en el manejo de pestes, especies invasoras y en el control del tráfico ilegal de especies; podemos observar en el estudio de “Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama” (Crawford *et al.*, 2010), se usaron códigos de barras para identificar una nueva rana invasora en la Ciudad de Panamá.

De esta forma, el código de barras de ADN se convierte en una herramienta con aplicaciones legales y utilidad directa para los agentes que regulan el comercio de especies o de partes de ellas (Peral-García; Giovambattista, 2015).

En la actualidad esta tecnología está permitiendo reconocer a las especies y saber cómo se relacionan con las que están presentes en otros sitios, si a esto sumamos los avances actuales en una nueva rama de la ciencia, denominada metagenómica, podremos darnos cuenta de posibles alteraciones en el medio ambiente casi de forma inmediata y sin errores, con lo que se ha denominado códigos de barras ambientales; toda la información obtenida hasta ahora está disponible en una gran biblioteca de códigos de barras, la cual se puede visitar en el sitio [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org) el cual alberga actualmente los datos de más de medio millón de especies de todo el mundo y forma parte del megaproyecto internacional llamado Barcode of Life, en el cual participan casi 100 naciones (CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), 2022).

México ha sido participe en este proyecto, desde sus inicios y por primera vez en su historia científica, ocupa un lugar destacado en la generación de resultados en un proyecto de gran

alcance internacional, donde han participado más de 20 instituciones nacionales. Todas ellas han conformado la red temática de Códigos de Barras de la Vida en México, apoyada por el CONACYT; en particular ECOSUR se ha constituido como un líder, junto con el Instituto de Biología de la UNAM y CIBNOR.

Los Códigos de Barras de ADN representan una brillante y eficaz alternativa para darle un gran impulso al reconocimiento de la diversidad biológica, lo cual permitirá postular nuevas teorías sobre la evolución y distribución actual de los seres vivos, y permitirán plantear nuevas alternativas para el desarrollo sustentable de nuestro país (Elías-Gutiérrez Manuel & Moreno-Valdéz Martha, 2015).

Específicamente los agaves se caracterizan por su difícil determinación taxonómica (Quiroz *et al.*, 2007); desde una perspectiva histórica, el taxón *Agave* L. se ha ubicado en diferentes familias botánicas, ya que existen autores que no reconocen al género dentro de la familia Agavaceae, sino lo incluyen dentro de la familia Amaryllidaceae o la familia Liliaceae (Dueñas, 2016). Por otro lado, la propuesta por Dahlgren es la más aceptada pues ha sido basada un sistema de clasificación tomando en cuenta numerosos caracteres (cariotípicos, anatómicos, químicos, biogeográficos, etc.); estas variantes se han debido principalmente a la falta de entendimiento en la evolución de la morfología, en casos como hábito, crecimiento secundario y posición del ovario en las flores (Hernández-Sandoval, 1995).

Actualmente la identificación de las especies, su conservación y posible aprovechamiento, está restringida a un selecto grupo de especialistas, “los taxónomos”, en este contexto la biología molecular es una herramienta que permite visualizar de otra manera la clasificación de los organismos; y en el caso de agaves se han iniciado estudios que permitirían tener una mejor comprensión, no sólo a nivel de género, sino también intergenérico, ya que su delimitación con respecto a los géneros herbáceos cercanos, como *manfreda* y *polianthes* aún no ha sido resuelta. Todo esto nos permite seguir adentrándonos en el conocimiento de estas plantas emblemáticas de nuestro país.

En México el Instituto de Biología, además de mantener y desarrollar la Colección Nacional, tiene la responsabilidad de contribuir al inventario y la identificación (“certificación taxonómica”) de todas las especies y cultivares de agaves. Una herramienta particularmente útil es la producción de un código de barras genético para las agaváceas, especialmente para

las que están incluidas en la NOM-059-ECOL-2001, apoyaría de manera fundamental la consecución de los fines de la Red, teniendo aplicaciones directas tanto en la conservación como en aspectos productivos, como la certificación y el fitomejoramiento de los agaves.

Diferentes trabajos de investigación por parte de distintas instituciones, están realizando la identificación de especies de agaves por medio de códigos de barra de ADN. Hasta la fecha de realización de este documento en BOLD systems existe un total de 125 registros de especímenes de agaves, de las cuales 114 muestras cuentan con una secuencia de ADN y 88 muestras cuentan con códigos de barras de ADN (Centre for Biodiversity Genomics, 2021).

### **5.7 Marcadores moleculares *matK* y *rbcL***

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que se han consolidado como herramientas valiosas para la detección y el uso de la diversidad genética, con su consecuente aplicación en programas de selección genética de plantas, animales y microorganismos (P. J. Rocha, 2003). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Rentarúa, 2010).

En el caso de plantas y de hongos el fragmento COI no es utilizable como código de barras de ADN, lo que ha llevado a buscar secuencias alternativas; en plantas la tasa de sustitución en la región COI es muy baja a diferencia de animales, lo cual, se traduce en la ausencia de variación a nivel de la secuencia entre especies del mismo género (Cowan *et al.*, 2006). La búsqueda de un código de barras para plantas se enfocó en el genoma nuclear y plastídico y se concluyó que un método multilocus sería necesario en este grupo de organismos. En el 2009, después de un largo debate, el CBOL por sus siglas en inglés (Consortium for the Barcode of Life, Plant Working Group), aprobó a las regiones plastídicas *matK* y *rbcL* como regiones barcode para las plantas (Kim, 2015).

#### **5.7.1 *matK*: maturasa K**

El gen *matK* es una maturasa involucrada en el procesamiento (splicing) de intrones grupo II que codifican para tARN<sup>Lys</sup>. Es una de las regiones codificantes de los plastos que más rápidamente evoluciona y consistentemente ha demostrado altos niveles de discriminación

entre especies, sin embargo, se requiere todavía un mayor trabajo para que los resultados de la amplificación sean óptimos.

El grupo de trabajo CBOL ha recomendado el gen de la maturasa K (Hilu & Liang, 1997) que evoluciona rápidamente y es altamente variable (Hollingsworth, 2011), pero la amplificación y secuenciación de la región del código de barras *matK* es difícil debido a la alta variabilidad de secuencia en los sitios de unión del cebador (Hollingsworth, 2011). Actualmente, hay tres pares de cebadores *matK* populares disponibles para amplificar aproximadamente la misma región del gen: 390F y 1326R (Cuenoud *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2001), XF y 5R (Ford *et al.*, 2009) y 1R\_KIM y 3F\_KIM (Hollingsworth, 2011; Jeanson *et al.*, 2011). Utilizaron estos tres pares de cebadores para amplificar códigos de barras de ADN de 296 especies de arbustos y árboles (Kress *et al.*, 2009). Estas combinaciones de cebadores mostraron un éxito de amplificación en el 85 % y un éxito de secuenciación en el 69 % de las especies, lo que demuestra que es posible una amplificación fiable en una variedad de plantas, utilizando varias combinaciones de cebadores. Sin embargo, el uso de más de un par de cebadores puede llevar mucho tiempo y ser costoso y, a menudo, es complejo para proyectos a gran escala (Heckenhauer *et al.*, 2016).

#### 5.7.2 *rbcL*: ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa

El gen *rbcL* participa en el proceso de fotosíntesis y fijación de carbono de la atmósfera para generar azúcar, es el proceso bioquímico más importante en el planeta que sostiene todas las cadenas tróficas; es el gen mejor caracterizado y gracias a las mejoras en los diseños de los cebadores; es el que mejor se ha recuperado en plantas terrestres y es adecuado para la recuperación de secuencias bidireccionales de alta calidad, pero no es la región más variable, por lo que se utilizaría solamente como un componente en las combinaciones multilocus (D. S. Gernandt *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que estos marcadores, aun combinados, no presentan una variación suficiente para diferenciar especies cercanas en algunas familias de Angiospermas por lo cual se ha propuesto la utilización de otros marcadores como la región transgénica *psbA-trnH*, el intrón *trnL* y la región nuclear ITS para estos casos (Group *et al.*, 2009).

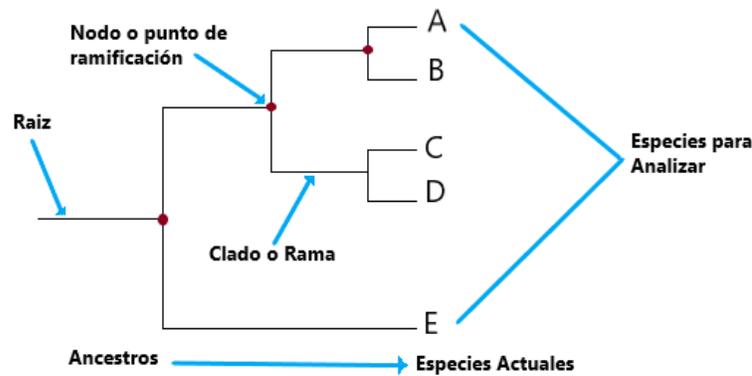
Todas las plantas terrestres tienen ambos genes. El *rbcL* es el más fácil de recuperar y trabajar técnicamente, uno de los más conocidos bioquímicamente y molecularmente, pero no es el mejor en cuanto a discriminar especies cercanas. En cambio, *matK* es uno de los genes con más capacidad de distinción entre especies; por eso se complementan.

Ambos fueron los más eficientes para las tres características básicas que requiere el código de barras: universalidad, es decir, que esté presente en todas las plantas terrestres; facilidad técnica, para obtener la secuencia, incluso de fragmentos de semillas, alimentos o muestras forenses, y capacidad de discriminación, que varíe lo suficiente para distinguir a individuos de especies distintas (Salazar-Chávez Gerardo, 2009).

### **5.8 Análisis filogenético**

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas; un análisis filogenético no sólo nos indica las relaciones evolutivas entre las secuencias o especies las cuales descienden de ancestros comunes, también puede indicarnos cuáles son las distancias entre ellas. Los métodos de reconstrucción filogenética más habituales asumen que todas las secuencias o especies provienen a partir de un ancestro común mediante bifurcaciones (Bioinformatics & Genomics group, 2022).

Los métodos filogenéticos reconstruyen árboles (dendrogramas) en los que las ramas y los nodos unen diferentes taxones, estos taxones pueden ser especies, individuos, genes, etcétera (Figura 8), al recorrer las ramas desde los nodos terminales hacia el nodo original recorreremos la historia evolutiva de ese gen u organismo; cada punto de ramificación (también llamado nodo interno) representa un evento de divergencia o separación de un grupo en dos grupos descendientes (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011).



**Figura 8.** Partes de un dendrograma.

En un árbol filogenético, la relación entre dos especies tiene un significado muy específico; dos especies están más relacionadas si tienen un ancestro común más reciente y menos relacionadas si tienen un ancestro común menos reciente.

También se puede dar el caso de politomía, lo que significa que un punto de ramificación tiene tres o más especies diferentes que surgen de él, en general, una politomía nos muestra dónde no tenemos suficiente información para determinar el orden de las ramas.

### 5.9 Cálculo de distancias genéticas

Existen varias propuestas metodológicas para analizar los datos provenientes de un proyecto de códigos de barras de ADN.

Una primera aproximación es la identificación basada en distancia o divergencia genética, la cual está determinada por el porcentaje de sitios nucleotídicos que varían entre una secuencia desconocida y las secuencias que se encuentran en la base de datos de referencia, corregida con el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980).

Diversos trabajos han encontrado valores umbrales de las distancias genéticas en diferentes taxa, para sugerir que la secuencia nueva proviene de una especie distinta.

La segunda aproximación posible es la identificación por medio de árboles filogenéticos en este caso la identificación es dada por la posición de la secuencia desconocida en una filogenia, basado en su cercanía evolutiva con las otras secuencias de ese grupo monofilético (Cuenoud *et al.*, 2002).

La última aproximación frecuentemente usada consiste en identificar uno o más caracteres moleculares cuyo estado sea de sinapomorfía (carácter nuevo compartido por dos o más individuos), permitiendo un diagnóstico de especies por estados derivados de nucleótidos (D. S. Gernandt *et al.*, 2007). Una ventaja de este método es que estos caracteres usados en la identificación podrían formar también una parte de la descripción primaria de especies nuevas (Ford *et al.*, 2009).

### **5.10 Taxonomía tradicional y códigos de barras de ADN**

Aunque la propuesta de utilizar códigos de barras de ADN como herramienta de identificación generó, desde sus inicios, gran controversia en la comunidad científica, en la actualidad la taxonomía afronta varios desafíos, entre ellos el reducido número de especialistas capaces de identificar y nombrar a las distintas especies, pero sin duda es la altísima tasa de destrucción de los ecosistemas, y la consecuente extinción de miles de especies, lo que representa el mayor problema, añadiendo la lentitud del proceso de descripción de especies, y del aún más lento proceso de difusión de la información, el cual es muy tardío en cuestión de examinación de información.

Los taxónomos consientes de estas problemáticas han creado un concepto de aceptación hacia los códigos de barras de ADN (y tal vez el concepto más aceptado actualmente), “el desarrollo de códigos de barra de ADN no excluye a la taxonomía tradicional (que se basa en caracteres morfológicos), por el contrario, se presenta como una herramienta complementaria basada en técnicas de biología molecular para la correcta identificación de las especies” (Jeanson *et al.*, 2011).

El sistema de códigos de barras del ADN promete revolucionar las tareas de identificación taxonómica proveyendo un sistema confiable, rápido y barato, para esto es necesario construir una gran base de datos de los códigos de barras de las especies, mediante la mayor participación de especialistas. Es posible que en un futuro próximo ya no se tenga que depender del taxónomo de forma presencial (salvo en casos muy excepcionales), se podrá contar con un aparato que lea códigos de barras genéticos; en éste podrá introducir un pequeño trozo del organismo en cuestión y en unos minutos tener la identificación en su pantalla (Oceguera-Figueroa Alejandro & León-Régagnon Virginia, 2009).

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Colecta de material vegetal**

La colecta de material biológico se realizó en poblaciones naturales de la región sureste del estado de Coahuila y en la región noroeste del estado de Hidalgo. El muestreo de cada ejemplar consistió en cortar 5 g (aproximadamente) de partes vegetativas jóvenes y visiblemente sanas, las cuales fueron puestas en alcohol de 96°. Además, durante la colecta se tomaron los datos de etiquetado, ubicación geográfica, fotografías y al mismo tiempo se colectaron partes vegetativas que sirvieron como muestras “respaldo” las cuales se depositaron en el ANSM (Herbario Antonio Narro Unidad Saltillo México); ubicado en el Departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México.

### **6.2 Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN genómico de cada muestra se realizó siguiendo el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) “modificado” (Sharma *et al.*, 2003), el cual se describe a continuación.

Se precalentaron 700 µl de solución CTAB de la marca BIOSCIENCES (G-Biosciences) a 60 °C, se molió 1 g de tejido vegetal, hasta obtener un polvo fino; el cual se colocó en el tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía el CTAB (previamente calentado), se incubó la mezcla durante 30 minutos a 60 °C en el ThermoMixer (Select BioProducts, México). En seguida, se agregaron 0.6 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se procedió a mezclar por inversión (15 minutos), posteriormente la mezcla se centrifugó a 15,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos en una microcentrífuga (Labnet International, USA). Con el objetivo de precipitar el ADN, se transfirieron 300 µl de la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 2 volúmenes de alcohol absoluto, nuevamente la mezcla se centrifugó a 15,000 rpm por 5 minutos para formar la pastilla que contenía el ADN, a la cual se realizaron dos lavados con 400 µl y 300 µl de etanol al 70% (respectivamente) y se centrifugo a 15,000 rpm por 5 minutos entre cada lavado. Finalmente, la pastilla se dejó secar durante toda la noche, pasado este tiempo se resuspendió agregando 70 µl de agua libre de nucleasas y se dejó incubar a una temperatura de 50 °C por 30 minutos a 50 rpm en un

ThermoMixer (Select BioProducts, México). Las muestras de ADN se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### 6.3 Electroforesis en el gel de agarosa

La concentración y cantidad del ADN extraído se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 75 voltios durante 1:45 h, utilizando marcador de peso molecular (1Kb, Axygen, USA). La carga de muestras consistió en una mezcla de  $5\text{ }\mu\text{l}$  de ADN genómico de las especies colectadas más  $3\text{ }\mu\text{l}$  de buffer de carga molecular (5X Green Go Taq® Reaction Buffer, PROMEGA, USA). La visualización del gel se realizó mediante el Sistema de Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA).

### 6.4 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el ADN genómico se llevó a cabo la amplificación de los códigos de barras de ADN. La PCR se realizó utilizando la mezcla comercial GoTaq® Green Master Mix, 2X™ (Promega, USA), según las especificaciones del fabricante (Tabla 6), con cebadores y programas de PCR establecidos en la literatura (Tabla 7). La mezcla resultante se llevó a un Termociclador (Axygen MaxyGene II™, USA); los productos de PCR amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y nuevamente la visualización del gel se realizó mediante el Sistema de Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA). El ADN se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior.

**Tabla 6.** Tabla de volúmenes y concentraciones utilizados para la PCR.

| Componente                            | Volumen              | Concentración final   |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| GoTaq® Green Master Mix, 2 X™         | 10 $\mu\text{l}$     | 1 X                   |
| Cebador F (inicial) 10 $\mu\text{M}$  | 0.25-2 $\mu\text{l}$ | 0.1-1.0 $\mu\text{M}$ |
| Cebador R (inverso), 10 $\mu\text{M}$ | 0.25-2 $\mu\text{l}$ | 0.1-1.0 $\mu\text{M}$ |
| ADN Molde                             | 1 $\mu\text{l}$      | <250 ng               |
| Agua libre de nucleasas               | 5 $\mu\text{l}$      | N.A.                  |

**Tabla 7.** Cebadores y programas de PCR utilizados para la amplificación de ADN.

| <b>Fragmento</b> | <b>Cebadores (5'-3')</b>                      | <b>Programa de PCR</b>                              | <b>Referencia</b>               |
|------------------|---|---|---------------------------------|
| <i>rbcL</i>      | <i>rbcLa-F:</i><br>ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC | 94 °C, 5 min; 35 × (94 °C, 30 s;                    | (Kress <i>et al.</i> ,<br>2009) |
|                  | <i>rbcLa-R:</i><br>GTAAAATCAAGTCCACCRCG       | 50 °C, 40 s; 72 °C, 40 s); 72 °C, 10<br>min; ∞4 °C. |                                 |
| <i>matK</i>      | <i>MagF:</i><br>AGATGTTCTTTTTTGCATTCATTG      | 94 °C, 5 min; 35 × (94 °C, 15 s; 56<br>°C, 20 s;    | Diseñados<br>en este<br>estudio |
|                  | <i>MagR:</i><br>ACACGAAAGTCGAAGTATATAC        | 2 °C, 50 s); 72 °C, 10 min; ∞4 °C.                  |                                 |

### 6.5 Secuenciación

Se enviaron 300 ng de producto de PCR de cada muestra al servicio de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato (CINVESTAV), León Guanajuato, México.

### 6.6 Búsqueda, descarga y alineamiento de secuencias

La búsqueda y descarga de secuencias de especies del género *Agave* correspondientes a dos códigos de barras de ADN (*rbcL* y *matK*) se realizó en la base de datos del BOLD Systems (Barcode of Life Data System) y NCBI (National Center for Biotechnology Information), (Centre for Biodiversity Genomics, 2021; National Library of Medicine (US), 2021).

Se filtraron secuencias de acuerdo con el rango de nucleótidos documentada para cada marcador y, sin bases ambiguas (N).

El alineamiento de las secuencias de referencia y las generadas en el laboratorio (secuencias de consulta) se llevó a cabo de manera independiente para cada marcador y se ajustaron de forma manual con la herramienta de ClustalW (Thompson *et al.*, 2003), implementado en el programa MEGA X versión 10.2.6 build 10210527 (Tamura *et al.*, 2011).

### **6.7 Análisis de códigos de barras de ADN**

La efectividad del poder discriminatorio de las regiones de ADN utilizados en este estudio, se evaluó mediante cuatro métodos analíticos ampliamente utilizados en códigos de barras de ADN, esto con la finalidad de asignar una identidad a las secuencias analizadas.

### **6.8 Análisis de la calidad de la secuencia**

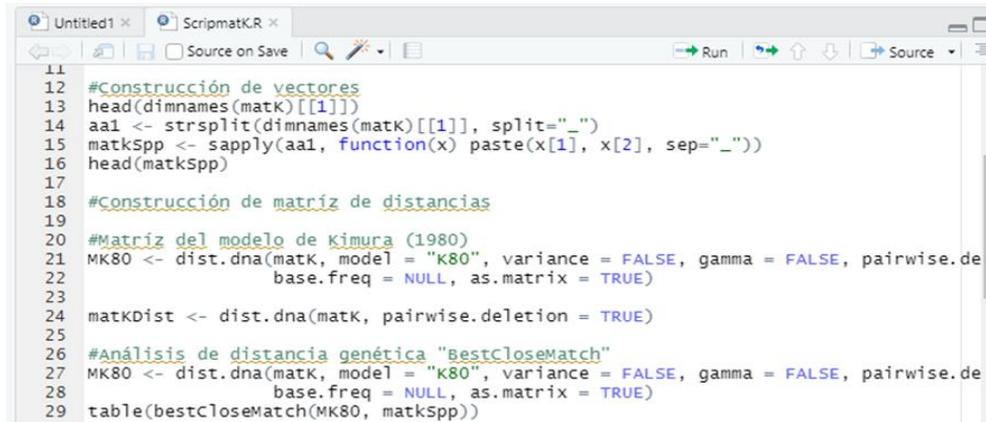
El análisis de la calidad de la secuencia se evaluó por medio de tres parámetros: sitios de conservación (C): la conservación indica que una secuencia ha sido mantenida por selección natural y que ha permanecido relativamente sin cambios en el árbol filogenético y, por lo tanto, en el tiempo geológico, son regiones que varían en grupo de secuencias o eventos de mutación, tales como sustitución de bases (cambio entre bases), inserciones (adición de una nueva base en la secuencia), deleciones (eliminación de una base). Sitios variables (V): la variabilidad indica que una secuencia presenta cambios en el árbol filogenético y, por lo tanto, difiere en las secuencias comparadas. Sitios informativos o Indels (Pi): presentan una inserción en el genoma, tiene como objetivo la búsqueda e identificación de un posible árbol filogenético que requiera el menor número de eventos evolutivos (mínimo de cambios evolutivos o pasos de un estado a otro) para dar explicación a los procesos o fenómenos observados.

### **6.9 Herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST)**

Las secuencias de los dos marcadores se concatenaron (por separado) como una base de datos de consulta y mediante la herramienta de BLASTn, se realizó un BLAST considerando aciertos máximos de 98 a 100% con una especie (Ross *et al.*, 2008).

### **6.10 Distancia genética**

Se utilizó el método de distancia genética (más cercana), con la función *BestCloseMatch* (Sonet *et al.*, 2013) del software SPIDER en el programa bioinformático RStudio (Brown, Collins, Boyer, Lefort, *et al.*, 2012).

The image shows a screenshot of the RStudio interface. The script editor displays R code for constructing distance and Kimura matrices. The code includes comments in Spanish and R commands for handling sequence data, calculating distances, and performing a best-close match analysis. The code is as follows:

```
11
12 #Construcción de vectores
13 head(dimnames(matk)[[1]])
14 aa1 <- strsplit(dimnames(matk)[[1]], split="_")
15 matkSpp <- sapply(aa1, function(x) paste(x[1], x[2], sep="_"))
16 head(matkSpp)
17
18 #Construcción de matriz de distancias
19
20 #Matriz del modelo de Kimura (1980)
21 MK80 <- dist.dna(matk, model = "k80", variance = FALSE, gamma = FALSE, pairwise.de
22     base.freq = NULL, as.matrix = TRUE)
23
24 matkDist <- dist.dna(matk, pairwise.deletion = TRUE)
25
26 #Análisis de distancia genética "BestCloseMatch"
27 MK80 <- dist.dna(matk, model = "k80", variance = FALSE, gamma = FALSE, pairwise.de
28     base.freq = NULL, as.matrix = TRUE)
29 table(bestcloseMatch(MK80, matkSpp))
```

**Figura 9.** Matriz de distancias y matriz del modelo Kimura en el programa bioinformático RStudio para secuencias *matK* y *rbcL*.

### 6.11 Construcción de Dendrogramas

Con base en las secuencias alineadas, el método de unión del vecino más cercano se realizó en MEGA X (Stecher *et al.*, 2020). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980); todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Únicamente las especies con múltiples individuos que formaron un clado monofilético en el árbol se consideraron identificadas con éxito. El análisis basado en la construcción de árboles proporciona un método conveniente y visualizado, que permite evaluar el desempeño discriminatorio mediante el cálculo de la proporción de grupos monofiléticos.

### 6.12 Brecha de códigos de barra de ADN

Para poder distinguir entre la variación interespecífica (entre especies cercanamente relacionadas) y variación intraespecífica (dentro de la misma especie), se realizó el análisis de la brecha de código de barras de ADN mediante el cálculo de la distribución relativa de la variación genética inter e intraespecífica, bajo el modelo de distancia por pares (K2P) con el software SPIDER en RStudio versión 2021.09.2, cuanto mayor sea la diferencia entre éstas, la discriminación de especies será más acertada (Meyer & Paulay, 2005).

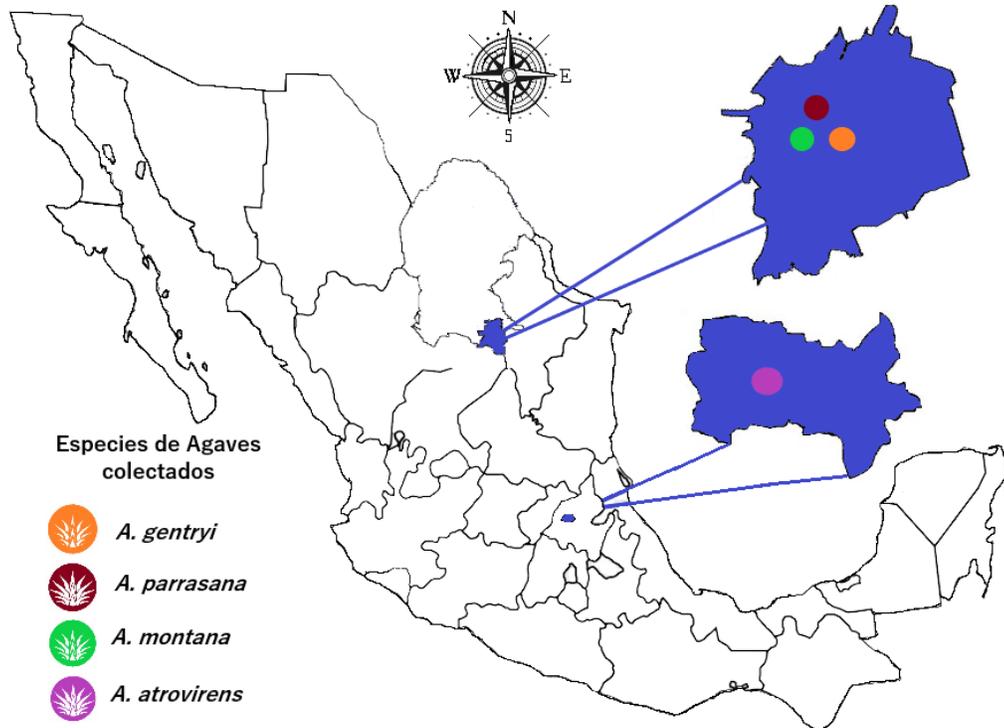
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Colecta de material vegetal

En tres localidades del estado de Hidalgo y tres localidades del estado de Coahuila (Figura 10) se colectaron e identificaron morfológicamente cuatro diferentes especies del género *Agave* de la familia Asparagaceae; se muestrearon un total de 15 ejemplares (Figura 11) en distintos cuadrantes del territorio de colecta (Tabla 8).

**Tabla 8.** Especies y localización geográfica de muestras colectadas.

| Especies             | No. muestra | Lugar de colecta         | Estado   | Coordenadas   |                | Altitud (msnm) |
|----------------------|-------------|--------------------------|----------|---------------|----------------|----------------|
|                      |             |                          |          | Latitud       | Longitud       |                |
| <i>A. gentryi</i>    | 1           | Ejido, Carneros          | Coahuila | 25° 14' 54" N | 101° 5' 28" W  | 2,106          |
| <i>A. gentryi</i>    | 2           | Ejido, Carneros          | Coahuila | 25° 14' 54" N | 101° 5' 28" W  | 2,106          |
| <i>A. gentryi</i>    | 3           | Ejido, Carneros          | Coahuila | 25° 12' 51" N | 101° 5' 30" W  | 2,116          |
| <i>A. gentryi</i>    | 4           | Ejido, Carneros          | Coahuila | 25° 10' 46" N | 101° 5' 38" W  | 2,120          |
| <i>A. gentryi</i>    | 5           | Ejido, Carneros          | Coahuila | 25° 8' 47" N  | 101° 6' 21" W  | 2,124          |
| <i>A. montana</i>    | 1           | El Cedral                | Coahuila | 25° 12' 36" N | 100° 21' 46" W | 2,887          |
| <i>A. montana</i>    | 2           | El Cedral                | Coahuila | 25° 12' 36" N | 100° 21' 45" W | 2,890          |
| <i>A. montana</i>    | 3           | El Cedral                | Coahuila | 25° 8' 47" N  | 100° 21' 44" W | 2,894          |
| <i>A. parrasana</i>  | JB          | Buenavista               | Coahuila | 25° 21' 22" N | 101° 01' 56" W | 1,776          |
| <i>A. parrasana</i>  | 2           | Buenavista               | Coahuila | 25° 21' 22" N | 101° 01' 56" W | 1,776          |
| <i>A. atrovirens</i> | 2           | Tasquillo,<br>Caltimacán | Hidalgo  | 20° 32' 18" N | 099° 22' 36" W | 1,716          |
| <i>A. atrovirens</i> | 3           | Tasquillo,<br>Caltimacán | Hidalgo  | 20° 32' 29" N | 099° 21' 15" W | 1,716          |
| <i>A. atrovirens</i> | 4           | Tasquillo,<br>Danghu     | Hidalgo  | 20° 36' 24" N | 099° 20' 12" W | 1,793          |
| <i>A. atrovirens</i> | 5           | Tasquillo,<br>Portezuelo | Hidalgo  | 20° 29' 28" N | 099° 18' 14" W | 1,780          |
| <i>A. atrovirens</i> | 6           | Tasquillo,<br>Arbolado   | Hidalgo  | 20° 33' 13" N | 099° 19' 32" W | 1,660          |



**Figura 10.** Sitos de colecta de material vegetal en localidades de Coahuila e Hidalgo.

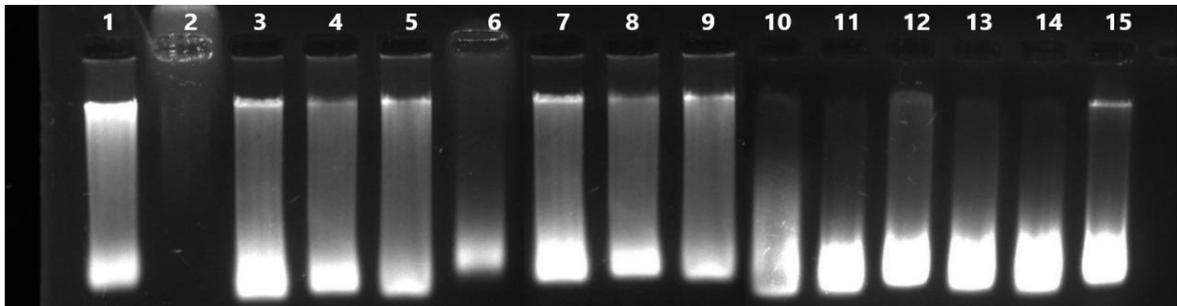




**Figura 11.** Especies colectadas: (A) *A. gentryi*; (B) *A. parrasana*; (C) *A. montana* y (D) *A. atrovirens*.

## 7.2 Extracción de ADN genómico

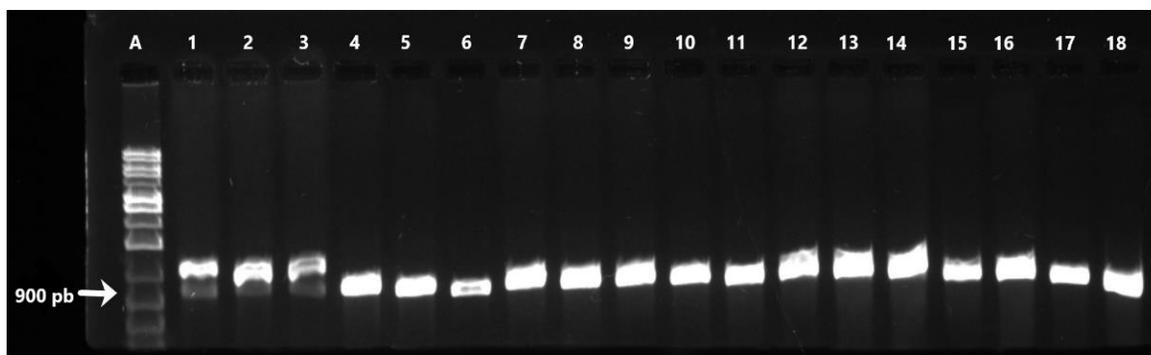
El método de extracción de ADN utilizado permitió la obtención de manera exitosa del ADN de las muestras de agave analizadas (Figura 12), además, en la misma figura es visible la alta calidad del ADN extraído lo cual sugiere su uso en el desarrollo óptimo para la amplificación por PCR.



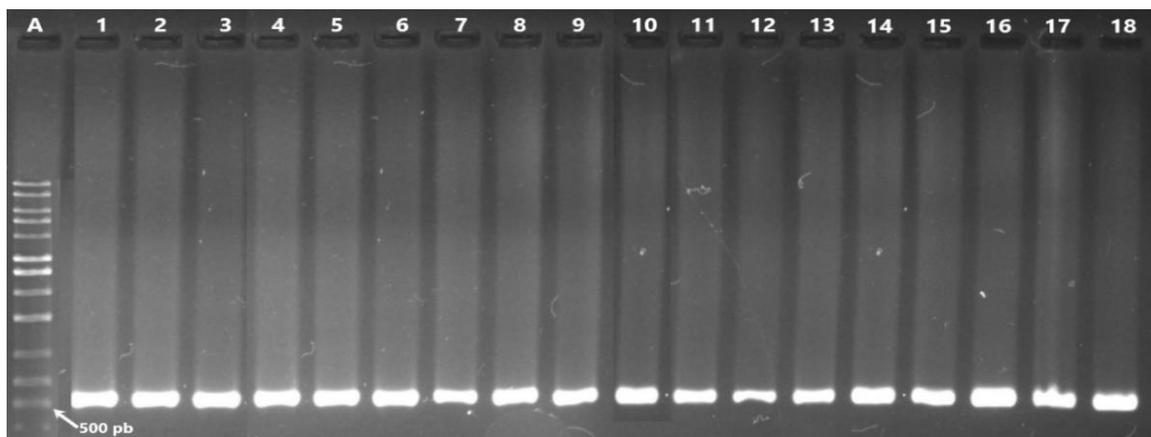
**Figura 12.** Extracción de ADN genómico. Carril 1-5 *A. gentryi*, carril 6-8 *A. montana*, carril 9-10 *A. parrasana* y carril 11-15 *A. atrovirens*.

## 7.3 Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

De acuerdo a la Figura 13 y Figura 14, se obtuvieron productos de PCR en el 100% de las muestras procesadas, los cuales presentaron el tamaño de banda aproximado esperado para ambos marcadores *matK* (700 a 900 pb) y *rbcL* (500 pb).



**Figura 13.** Amplicones obtenidos a partir de la región plastídica del gen *matK*. (A) marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 1-2 *A. gentryi* 2, carril 3-4 *A. gentryi* 3, carril 5-6 *A. gentryi* 4, carril 7-8 *A. atrovirens* 3, carril 9-10 *A. atrovirens* 4, carril 11-12 *A. atrovirens* 6, carril 13-14 *A. montana* 1, carril 15 *A. montana* 2, carril 16 *A. montana* 3, carril 17 *A. parrasana* 2 y carril 18 *A. parrasana* JB.

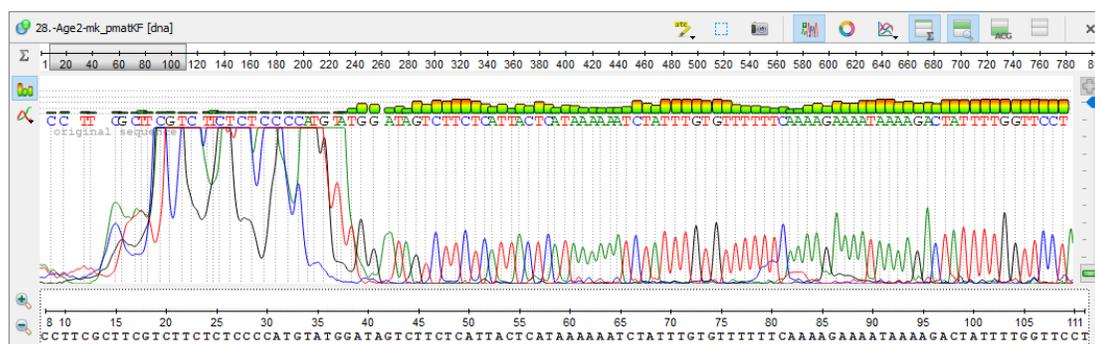


**Figura 14.** Amplicones obtenidos a partir de la región plastídica del gen *rbcL*. (A) marcador de peso molecular 1 K. Carril 1-2 *A. gentryi* 2, carril 3-4 *A. gentryi* 3, carril 5-6 *A. gentryi* 4, carril 7-8 *A. atrovirens* 3, carril 9-10 *A. atrovirens* 4, carril 11-12 *A. atrovirens* 6, carril 13-14 *A. montana* 1, carril 15 *A. montana* 2, carril 16 *A. montana* 3, carril 17 *A. parrasana* 2 y carril 18 *A. parrasana* JB.

#### 7.4 Análisis de secuencias

Se visualizaron de manera individual los electroferogramas resultantes del proceso de secuenciación, se verificó que cada base nucleotídica estuviera representada por un pico cromatográfico bien definido/curva de fluorescencia, lo cual es un indicativo de la calidad en las secuencias. Los electroferogramas generados en este estudio con ambos marcadores mostraron curvas de fluorescencia de buena calidad las cuales representan una base

nitrogenada: verde para adenina, rojo para timina, negro para guanina y azul para citosina (Figura 15). En la misma figura se observa el extremo 5´- 3´ antes de realizar el corte de los extremos, este proceso se realiza comúnmente debido a la baja calidad de reconocimiento de nucleótidos en ambos extremos de las secuencias, pues afecta la calidad y el correcto alineamiento de las mismas.



**Figura 15.** Electroferograma de la especie *A. gentryi* (extremo 5´- 3´).

### 7.5 Búsqueda, descarga y alineamiento de secuencias

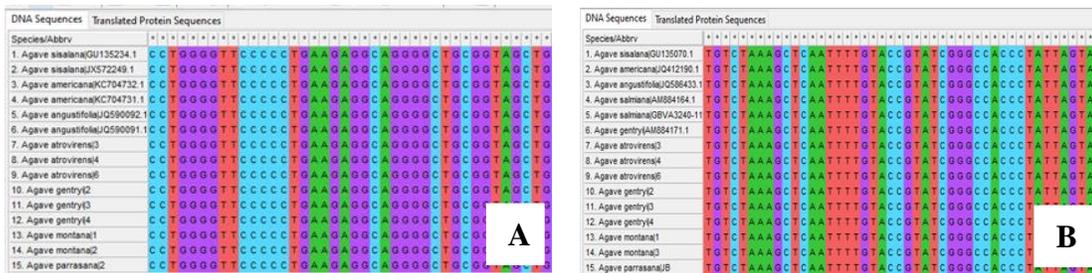
El análisis incluyó un total de 20 secuencias de consulta; 10 del marcador *rbcL* y 10 del marcador *matK*, provenientes de cuatro especies del género *Agave* (Asparagaceae), además se incluyeron 40 especies de referencia (20 *rbcL* y 20 *matK*) que provenían de la base de datos de BOLD systems y NCBI y que sirvieron únicamente para el correcto alineamiento de las secuencias de consulta (Figura 16). La biblioteca de datos final se realizó de manera independiente para cada marcador y constó de nueve secuencias de consulta y seis de referencia (Figura 17) (Tabla 9).



**Figura 16.** (A) Análisis de secuencias consulta y referencia de agaves, antes del alineamiento. (B) Análisis de secuencias consulta y referencia de agaves marcando el alineamiento (se puede observar una inserción o una deleción de una base nitrogenada).

**Tabla 9.** Número de accesoión de BOLD Systems de secuencias sometidas a comparaciones filogenéticas.

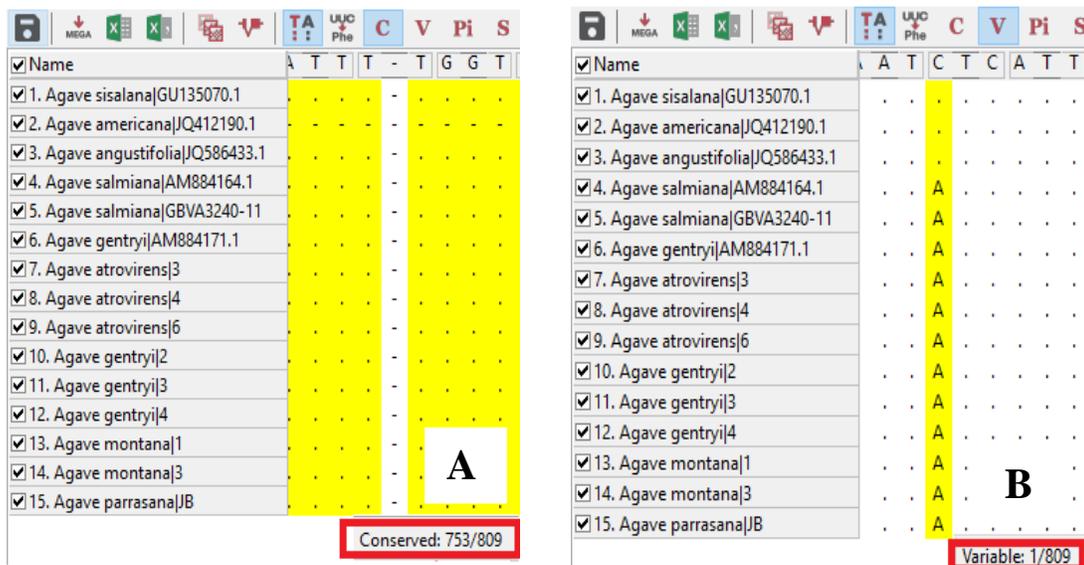
| Especie                   | <i>rbcL</i> | <i>matK</i> |
|---------------------------|-------------|-------------|
| <i>Agave sisalana</i>     | GU135234.1  | GU135070.1  |
| <i>Agave americana</i>    | KC704732.1  | JQ412190.1  |
| <i>Agave angustifolia</i> | JQ590092.1  | JQ586433.1  |
| <i>Agave salmiana</i>     | -           | AM884164.1  |
| <i>Agave salmiana</i>     | -           | GBVA3240-11 |
| <i>Agave gentryi</i>      | -           | AM884171.1  |
| <i>Agave sisalana</i>     | JX572249.1  | -           |
| <i>Agave americana</i>    | KC704731.1  | -           |
| <i>Agave angustifolia</i> | JQ590091.1  | -           |

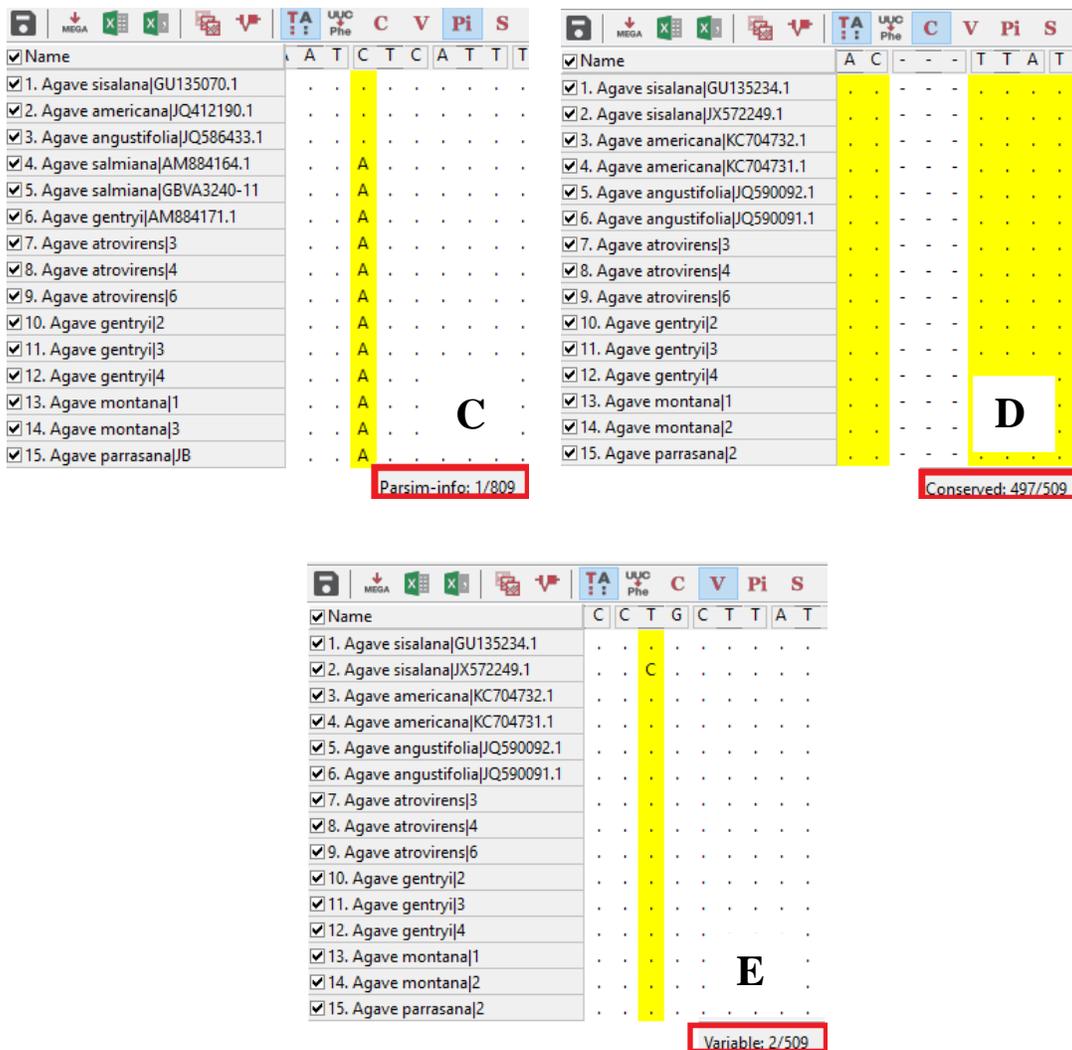


**Figura 17.** Alineamiento de secuencias consulta y secuencias referencia de agaves. (A) región *rbcL*. (B) región *matK*.

### 7.6 Análisis de la calidad de secuencias

El análisis de calidad de secuencias varió para cada marcador. Con el marcador *matK* se observaron 753 sitios de conservación (C); un sitio variable (V) y un sitio informativo (Pi) (Figura 18). Para el marcador *rbcL* se observó un total de 497 sitios conservados (C); dos sitios variables (V) y no se observaron sitios de información (Pi) (Figura 18). El resumen de variabilidad se muestra en la (Tabla 10).





**Figura 18.** Figura (A) sitios de conservación con marcador *matK*, (B) sitios variables con marcador *matK* y (C) sitios informativos o Indels con marcador *matK*. (D) sitios de conservación con marcador *rbcL* y (E) sitios variables con marcador *rbcL*.

**Tabla 10.** Resumen de variabilidad.

| Marcador    | Número de Acciones | Longitud de Secuencia | Longitud de Secuencia Alineada | Contenido de G + C (%) | Número de sitios conservados | Número de Sitios variables (%) | Número de Sitios Informativos (%) |
|-------------|--------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <i>matK</i> | 15                 | 803-815               | 809                            | 0.30                   | 753                          | 1                              | 1                                 |
| <i>rbcL</i> | 15                 | 571-579               | 509                            | 0.41                   | 497                          | 2                              | 0                                 |

## 7.7 Análisis de códigos de barras de ADN

### 7.7.1 Alineamiento de secuencias

El método de BLAST proporcionó altos porcentajes de identificación con el marcador *rbcL* con un promedio del 99.61%, dicho marcador logró la identificación a nivel de género en ocho secuencias de consulta (Tabla 11). Mientras que el marcador *matK* logró únicamente la correcta identificación a nivel de género de tres secuencias analizadas con un promedio de porcentaje de identidad del 99.74 %, el resto de las especies tuvieron una identificación “ambigua” (Tabla 12).

**Tabla 11.** Resultados de identificación usando *rbcL* por el método de BLAST.

| Género       | Especie           | No. De muestra | Porcentaje de identidad BLAST | Región analizada (pb) | Género         | Especie        |
|--------------|-------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| <i>Agave</i> | <i>atrovirens</i> | 3              | 99.28                         | 571                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>atrovirens</i> | 4              | 99.82                         | 572                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>atrovirens</i> | 6              | 99.64                         | 572                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>gentryi</i>    | 2              | 99.81                         | 579                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>gentryi</i>    | 3              | 99.1                          | 574                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>gentryi</i>    | 4              | 99.82                         | 572                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>parrasana</i>  | 2              | 99.82                         | 575                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>montana</i>    | 1              | 100                           | 572                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>montana</i>    | 2              | 99.63                         | 572                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |

**Tabla 12.** Resultados de identificación usando *matK* por el método de BLAST.

| Género       | Especie           | No. De muestra | Porcentaje de identidad BLAST | Región analizada (pb) | Género         | Especie        |
|--------------|-------------------|----------------|-------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| <i>Agave</i> | <i>atrovirens</i> | 3              | 99.74                         | 812                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>atrovirens</i> | 4              | 99.74                         | 813                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>atrovirens</i> | 6              | 99.87                         | 815                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>gentryi</i>    | 2              | 99.48                         | 811                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>gentryi</i>    | 3              | 99.61                         | 813                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>gentryi</i>    | 4              | 99.74                         | 811                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>parrasana</i>  | JB             | 99.74                         | 809                   | <i>Agave</i>   | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>montana</i>    | 1              | 99.87                         | 803                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |
| <i>Agave</i> | <i>montana</i>    | 3              | 100                           | 815                   | <i>Ambiguo</i> | <i>ambiguo</i> |

### 7.7.2 Distancia genética

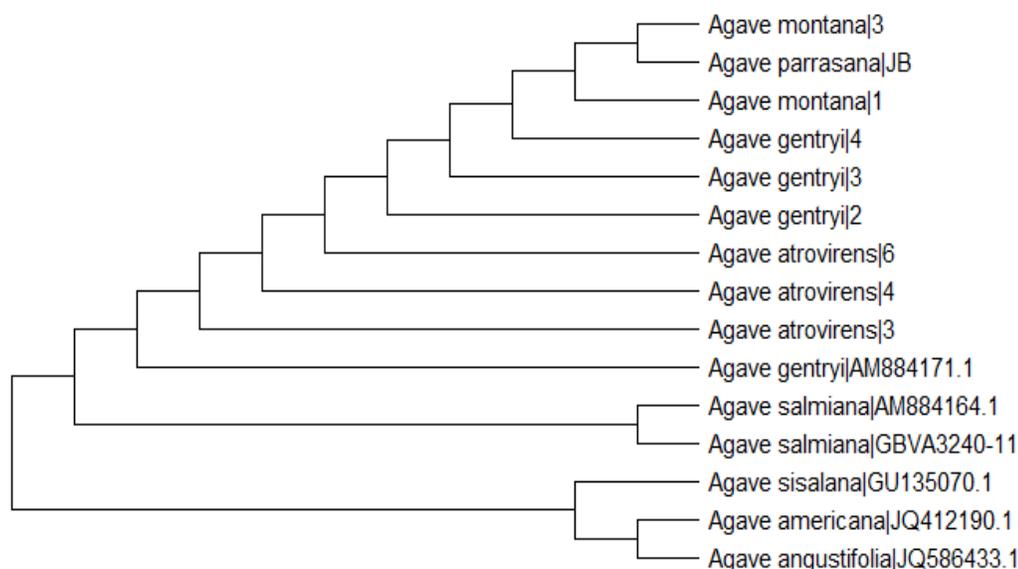
El método basado en la distancia genética más cercana mostró las tasas más bajas de identificación de especies, dicha metodología no logró la identificación correcta de especies con ninguno de los marcadores utilizados (Tabla 13).

**Tabla 13.** Identificación de especies mediante la distancia genética más cercana.

| Marcador    | Correcta | Incorrecta | Ambigua | No identificado |
|-------------|----------|------------|---------|-----------------|
| <i>rbcL</i> | 0        | 0          | 0       | 15              |
| <i>matK</i> | 0        | 0          | 0       | 15              |

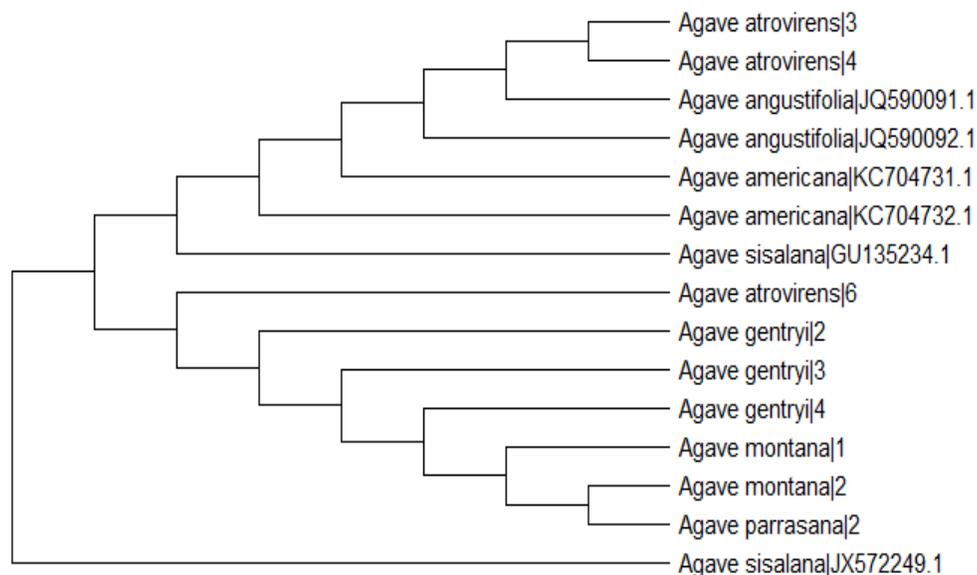
### 7.7.3 Construcción de Dendrogramas

El dendrograma generado con el marcador *matK* mostró una división en tres clados; se dice que las especies que forman un clado son un grupo que comparten características sinapormorficas. Aquí, las especies de consulta como era de esperarse, se establecieron en un clado (parte superior), lo que significa un mayor emparentamiento entre ellas, el siguiente clado muestra agrupada a la especie *A. salmiana* esto muestra a su vez una mayor cercanía de dicha especie al grupo de las especies de consulta, finalmente, un tercer clado agrupo a tres especies menormente emparentadas con *A. montana*, *A. parrasana*, *A. gentryi* y *A. atrovirens* e incluso de *A. salmiana*.



**Figura 19.** Análisis filogenético molecular usando la región plastídica *matK* para 15 secuencias con base en la distancia genética K2P.

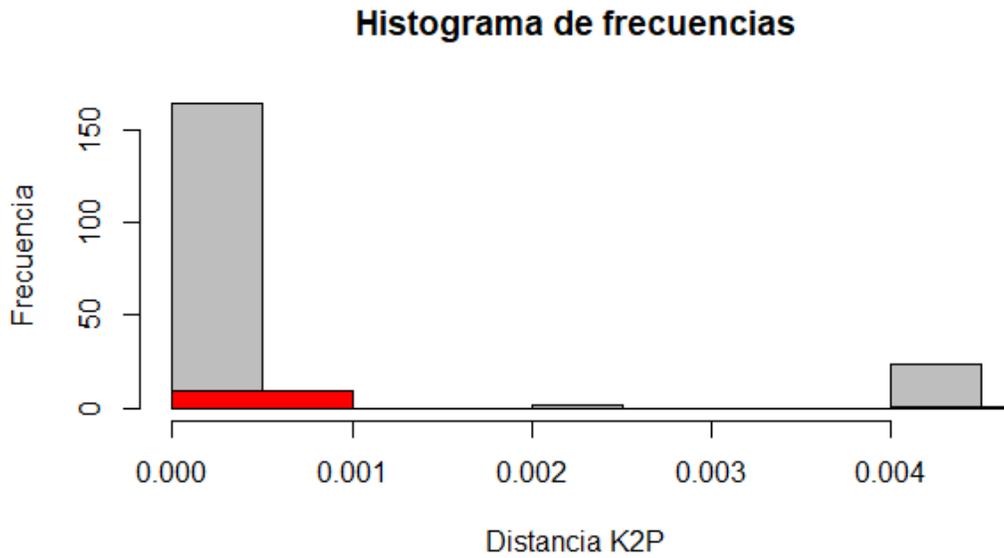
El dendrograma generado con la región *rbcL*, también formó tres clados, sin embargo, no existe una separación clara de las especies, esto, debido a que la especie de *A. atrovirens* y *A. sisalana* se presenta en dos clados diferentes lo cual podría ser dado a una posible variación en alguna base nucleotídica generada por alguna deficiencia en la alineación o debido al propio rendimiento del marcador utilizado. Por su parte, *A. gentryi*, *montana* y *parrasana* se consolidaron en un solo clado, mostrando así la similitud y emparentamiento entre dichas especies.



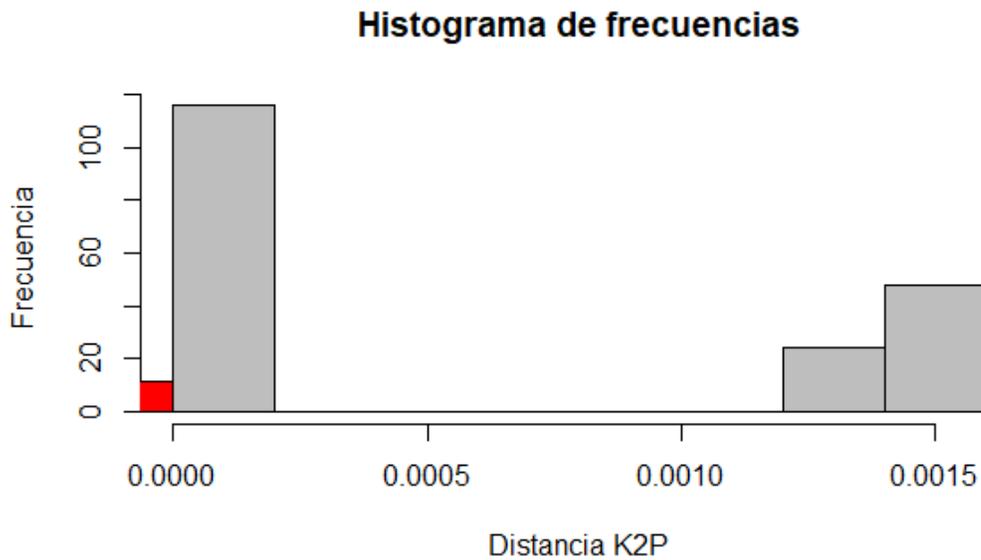
**Figura 20.** Análisis filogenético molecular usando la región plastídica *rbcL* para 15 secuencias con base en la distancia genética K2P.

#### 7.7.4 Brecha de códigos de barra de ADN

Los resultados obtenidos en el análisis de la brecha de código de barras ninguna de las dos regiones propuestas (*matK* y *rbcL*) mostraron una brecha/espacio obvio, esto se asume debido a que, el análisis para la región *rbcL* exhibió una superposición de las distancias intra e interespecíficas de las muestras (Figura 21); por otro lado, el análisis para la región *matK* muestra una separación de ambos grupos de distancias, sin embargo, aunque no se observa un solapamiento entre las distancias, tampoco es visible un espacio suficientemente claro en el histograma que muestre la llamada brecha de código de barras de ADN (Figura 22).



**Figura 21.** Brecha de código de barras de ADN con la región *rbcL*.



**Figura 22.** Brecha de código de barras de ADN con la región *matK*.

## 8. DISCUSIÓN

Los códigos de barras de ADN tienen el objetivo de proponer un sistema de identificación de organismos a través de secuencias cortas de ADN y así, brindar soporte a los programas de investigación sobre biodiversidad, de manera rápida y eficaz (Lanteri, 2007). Para que una secuencia sea aceptada como código de barras debe cumplir con tres aspectos fundamentales: universalidad (amplificación y secuenciación), facilidad técnica (para obtener las secuencias) y alta capacidad de discriminación (Salazar-Chávez Gerardo, 2009). En el presente trabajo se utilizaron dos regiones provenientes del cloroplasto: *rbcL* y *matK*, propuestas por el grupo de trabajo CBOL para la identificación de plantas terrestres, debido a la conservación de sus genes y a su alta universalidad (Rentarías, 2010). En este sentido, los cebadores utilizados presentaron buenos resultados de amplificación en las cuatro especies de agaves analizadas, ambas regiones produjeron amplicones a partir de los cuales se obtuvieron secuencias de buena calidad en el 100% de las muestras analizadas. En general la alta universalidad, es decir, altos porcentajes de amplificación y recuperabilidad de secuencias con cebadores *rbcL* ha sido documentada por otros autores en plantas tropicales, medicinales y arbóreas (Amandita *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2017; Maloukh *et al.*, 2017; Parmentier *et al.*, 2013). Por su parte Jaén-Molina *et al.*, (2010) analizaron un grupo de plantas vasculares de gran importancia para México algunas listadas en la NOM-059; quienes evaluaron la factibilidad de amplificar, secuenciar y alinear siete marcadores, donde la región *rbcL* tuvo un éxito de amplificación y secuenciación del 100%. Dichos locus funcionan de manera adecuada como una región central de código de barras de ADN, debido a que proporciona suficiente variación para la discriminación entre especies en diferentes grupos de plantas (Burgess *et al.*, 2011; Kress & Erickson, 2007). Por otro lado, el uso de cebadores *matK* reportados en la literatura no tuvieron el éxito de universalidad esperado; pues no se obtuvieron los amplicones necesarios para el desarrollo de esta investigación, por ello, se recurrió al diseño de cebadores específicos para el género *Agave*, con lo cual se logró la amplificación y obtención de secuencias de buena calidad de las muestras analizadas. Resultados similares han sido reportados por otros autores quienes mencionan bajas tasas de amplificación y secuenciación con cebadores *matK* previamente reportados en angiospermas y gimnospermas (Hilu *et al.*, 2003; Parmentier *et al.*, 2013). Incluso el uso de estos cebadores en grupos específicos ha proporcionado bajos rendimientos de universalidad de la región *matK*, por ejemplo, Piredda

*et al.*, (2011), optaron por la eliminación del análisis de datos en las secuencias provenientes de la región *matK* (universal) sugerida por el CBOL en encinos italianos, debido a la baja amplificación por PCR y un bajo poder discriminatorio. Sin embargo, en diferentes investigaciones han reportado un buen índice de amplificación y secuenciación con *matK* (Chávaro Ortiz *et al.*, 2001) (China Plant BOL Group *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2010; Korotkova *et al.*, 2011). No obstante, al mismo tiempo los autores mencionan que el uso de dicha región requiere de un esfuerzo técnico mayor comparado con el uso de otros marcadores. La versatilidad de resultados reportados puede deberse a las tasas evolutivas variables en diferentes taxones, pues se sabe que *matK* tiene una alta tasa de sustituciones de nucleótidos influenciada muy probablemente por factores climáticos que pueden afectar la conservación del locus (Gillman *et al.*, 2010; Hilu *et al.*, 2003). El uso de la región *matK* como código de barras de ADN es imprescindible en la discriminación de especies, por lo que, es necesario continuar con la búsqueda de cebadores que permitan la amplificación de ADN de grupos taxonómicos difíciles o grupos específicos (Hollingsworth *et al.*, 2011; Piredda *et al.*, 2011).

El análisis de códigos de barras de ADN y la efectividad del poder discriminatorio de las regiones de ADN utilizadas en este estudio se evaluaron mediante cuatro métodos analíticos ampliamente utilizados en códigos de barras de ADN, esto con la finalidad de asignar una identidad a las secuencias analizadas; cada una de ellas mostraron diferentes tasas de discriminación para cada marcador. BLAST: es una herramienta de alineamiento local por pares, consiste en hacer coincidir un par de secuencias; es decir, sólo producen alineamientos por pares de la secuencia problema con cada una de las secuencias de la base de datos con las que muestra alta similitud (Altschul *et al.*, 1990). En el presente trabajo el análisis BLAST mostró un porcentaje de identificación del 99.67% con el marcador *rbcL*; mientras que el marcador *matK* logró porcentajes de identidad a nivel género del 99.75%. En especies del género *Passiflora* (Miño Domínguez, 2018) se reportaron resultados similares en donde se obtuvo un 98% para ambos marcadores usando BLAST. En otro informe basado en secuencias de especies de *Quercus* el número de las coincidencias correctas en BLAST que proporcionó el poder de identificación fue de 98.1 y 98.3%, respectivamente (Pacheco-Reyes *et al.*, 2021). Así mismo, en un grupo de encinos de origen chino y en Apocynaceae se encontró que este método arrojó la identificación más alta (género y especie) respecto a otros

métodos de identificación (Cabelin & Alejandro, 2016; Yang *et al.*, 2016). Probablemente uno de los factores que afectan el éxito de identificación de especies es la disponibilidad de datos de secuencias de ADN en las bases de datos como BOLD y GenBank (Amandita *et al.*, 2019).

El método basado en la distancia genética (más cercana) mostró tasas de discriminación extremadamente bajas al no lograr la identificación de especies de manera correcta con ambos marcadores. Otros estudios reportan resultados similares, Gao *et al.*, (2010) describen que la distancia genética también mostró bajas tasas en la discriminación en especies de la familia Fabaceae con marcadores *rbcL* y *matK*. Mientras que, Rivera-Jiménez *et al.*, (2020) mostraron la eficiencia de este método en el reconocimiento y discriminación de especies con distintos marcadores en especies del género *Gynerium* en todos los casos el éxito de identificación fue mayor al 40%, siendo la región *matK* la cual presentó la mayor tasa de correcta identificación seguida de ITS y finalmente *rbcL*. Diferentes autores mencionan bajas tasas de identificación atribuido principalmente a la sensibilidad del método a procesos de divergencia y al tipo de muestreo realizado (Chen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010).

Por su parte, la construcción de árboles o dendrogramas se realizó a partir de datos moleculares con la finalidad de probar los niveles de emparentamiento de las especies de consulta del género *Agave*. Así, la metodología de unión de vecinos cercanos mostró a través de los dendrogramas generados la separación de especies en distintos clados y de acuerdo al marcador utilizado. En general, ambas regiones de ADN definieron a las especies de consulta en un clado, a excepción de *A. atrovirens* (*matK*). Con base en datos reportados en la literatura las especies: *salmiana*, *montana*, *parrasana* y *gentryi* pertenecen a la sección Salmianae, mientras que *Agave atrovirens* es ubicado en la sección Hiemiflorae ambas secciones altamente emparentadas (Gentry, 2004). Dicha información se observa en el dendrograma generado con la región *matK*. Sin embargo, de acuerdo a estudios moleculares, diferentes autores mencionan que aún no es completamente clara la filogenia entre las especies de agaves, a pesar de que se ha comprobado la monofilia del grupo, aún se requieren datos para reconstruir las relaciones filogenéticas de uno de los géneros más diversos y complejos de Asparagaceae ya que con más de 250 especies la diversidad morfológica,

ecológica y evolutiva del grupo ha complicado su estudio taxonómico a nivel molecular (Eguiarte *et al.*, 2021; Good-Avila *et al.*, 2006).

El análisis de la brecha de código de barras de ADN es uno de los métodos más utilizados, los resultados aquí obtenidos muestran la ausencia de la brecha con ambos marcadores; a pesar de ello, el histograma generado a partir de las secuencias *matK* no mostró una superposición de ambas distancias. En otros estudios se ha reportado la existencia de la brecha de código de barras de ADN en taxones como *Tetrastigma*, *Abies* y *Cupressus* (Armenise *et al.*, 2012). Pero son más los autores que mencionan la falta o inexistencia de una brecha de código de barras en una amplia gama grupos de plantas (Group *et al.*, 2009; Lahaye *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2006; Parmentier *et al.*, 2013). El bajo éxito de un código de barras de ADN para discriminar especies puede deberse a: una clasificación de linaje incompleta, al tipo de muestreo realizado o por la falta de una "brecha de código de barras" (Amandita *et al.*, 2019; van Velzen *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de esta ausencia, los códigos de barras generados en este estudio mostraron un poder discriminatorio relativamente alto con otros métodos analíticos aplicados.

## 9. CONCLUSIÓN

La extracción de genómico por el método de CTAB resulto ser exitosa, ya que permitió la extracción de ADN en especies de *Agave*, normalmente consideradas como difíciles; los cebadores previamente reportados, utilizados en este estudio, permitieron la amplificación de los marcadores, lo cual apoya a la universalidad de dichos cebadores y permite pensar que pueden servir para amplificar los mismos marcadores en todas las especies de agaves. Tanto la extracción como la PCR, permitieron la obtención de secuencias de buena calidad con ambas regiones de ADN y utilizables para su análisis. La discriminación de especies varió de acuerdo con los métodos analíticos utilizados, se obtuvieron dendrogramas con topologías diferentes, pero similares; y a pesar de la falta de una brecha de código de barras la metodología del uso de dendrogramas mostró la agrupación de especies de acuerdo a datos morfológicos propuestos en la taxonomía tradicional.

## 10. LITERATURA CITADA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Amandita, F. Y., Rembold, K., Vornam, B., Rahayu, S., Siregar, I. Z., Kreft, H., & Finkeldey, R. (2019). DNA barcoding of flowering plants in Sumatra, Indonesia. *Ecology and Evolution*, 9(4), 1858–1868. <https://doi.org/10.1002/ece3.4875>
- Andrade, J. L. B. E. de la; R. G. C. R. M. F. V. S. G. & C. J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 81(0366–2128), 37–50.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Armenise, L., Simeone, M. C., Piredda, R., & Schirone, B. (2012). Validation of DNA barcoding as an efficient tool for taxon identification and detection of species diversity in Italian conifers. *European Journal of Forest Research*, 131(5), 1337–1353.
- Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G. O. U., Swartz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B., & Ferrer, E. A. (2011). Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*, 471(7336), 51–57. <https://doi.org/10.1038/nature09678>
- Bergmann, T., Rach, J., Damm, S., DeSalle, R., Schierwater, B., & Hadrys, H. (2013). The potential of distance-based thresholds and character-based DNA barcoding for defining problematic taxonomic entities by CO 1 and ND 1. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1069–1081.
- Bioinformatics & Genomics group. (2022). *Bioinformatics at COMAV*. Filogenias.
- Brown, S. D. J., Collins, R. A., Boyer, S., Lefort, M., Malumbres-Olarte, J., Vink, C. J., & Cruickshank, R. H. (2012). Spider: An R package for the analysis of species identity

and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 562–565.

Brown, S. D. J., Collins, R. A., Boyer, S., Lefort, M., Malumbres-Olarte, J., Vink, C. J., & Cruickshank, R. H. (2012). SPIDER: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 562–565. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x>

Burgess, K. S., Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Husband, B. C., Newmaster, S. G., Percy, D. M., Hajibabaei, M., & Barrett, S. C. H. (2011). Discriminating plant species in a local temperate flora using the rbcL+ matK DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4), 333–340. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00092.x>

Čandek, K., & Kuntner, M. (2015). DNA barcoding gap: reliable species identification over morphological and geographical scales. *Molecular Ecology Resources*, 15(2), 268–277.

Cabelin, V. L. D., & Alejandro, G. J. D. (2016). Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA barcoding. *Pharmacognosy Magazine*, 12(Suppl 3), S384. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.185780>.

Centre for Biodiversity Genomics. (2021). *BOLD Systems (Barcode of Life Data System)*. [https://www.boldsystems.org/index.php/Public\\_SearchTerms?SearchMenu=records&query=Agave&taxon=](https://www.boldsystems.org/index.php/Public_SearchTerms?SearchMenu=records&query=Agave&taxon=).

Chávaro Ortíz, R. M., Alvarado, A. M., & Hernández Sandoval, L. G. (2001). Amplificación De Las Regiones Trnh-Psba Y MatK De Diferentes Especies De Los Géneros *Agave Sp. Beaucarnea Sp. Y Nolina Sp.* *Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro*.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., & Pang, X. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS One*, 5(1), e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>.

China Plant BOL Group, C. P. B., Li, D.-Z., Gao, L.-M., Li, H.-T., Wang, H., Ge, X.-J., Liu,

- J.-Q., Chen, Z.-D., Zhou, S.-L., Chen, S.-L., Yang, J.-B., Fu, C.-X., Zeng, C.-X., Yan, H.-F., Zhu, Y.-J., Sun, Y.-S., Chen, S.-Y., Zhao, L., Wang, K., ... Duan, G.-W. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19641–19646. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104551108>
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO, H. I. A. A. F. y A. G. (2021, May 25). *Qué nos aportan los agaves*. [https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N\\_agaves](https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_agaves)
- CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología). (2022, May 8). *Los Códigos de Barras De La Vida, Una Alternativa Para México y Su Biodiversidad*. Códigos de Barra de La Vida. <https://centrosconacyt.mx/objeto/los-codigos-de-barras-de-la-vida-una-alternativa-para-mexico-y-su-biodiversidad/#lagaleria>
- Cowan, R. S., Chase, M. W., Kress, W. J., & Savolainen, V. (2006). 300,000 species to identify: problems, progress, and prospects in DNA barcoding of land plants. *Taxon*, 55(3), 611–616.
- Cowie, R. H., Bouchet, P., & Fontaine, B. (2022). The Sixth Mass Extinction: fact, fiction or speculation? *Biological Reviews*, 97(2), 640–663. <https://doi.org/10.1111/brv.12816>
- Crawford, A. J., Lips, K. R., & Bermingham, E. (2010). Epidemic disease decimates amphibian abundance, species diversity, and evolutionary history in the highlands of central Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13777–13782.
- Cuenoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J., & Chase, M. W. (2002). Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany*, 89(1), 132–144. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.1.132>
- Dueñas, A. C. (2016). Presencia de saponinas en *Agave spp.* de México. *BIOZ Revista de Divulgación UACB*, 1(1).

- Eguiarte, L. E., Jiménez Barrón, O. A., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gamez, N., Gasca-Pineda, J., Castellanos-Morales, G., Moreno-Letelier, A., & Souza, V. (2021). Evolutionary ecology of Agave: distribution patterns, phylogeny, and coevolution (an homage to Howard S. Gentry). *American Journal of Botany*, *108*(2), 216–235.
- Eguiarte Luis; Souza Valeria & Silva-Montellano Arturo. (2000). Evolution of the Agavaceae family: Phylogeny, reproductive biology and population genetics. *Botanical Sciences*, *66*(No 66 (2000)), 131–150.
- Elías-Gutiérrez Manuel, & Moreno-Valdéz Martha. (2015, October 8). *Los Códigos de Barras de la Vida, una alternativa para México y su biodiversidad*. ECOSUR Unidad Chetumal. <https://www.ecosur.mx/los-codigos-de-barras-de-la-vida-una-alternativa-para-mexico-y-su-biodiversidad/>
- Erickson, D. L., Spouge, J., Resch, A., Weigt, L. A., & Kress, J. W. (2008). DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. *Taxon*, *57*(4), 1304–1316.
- Espinoza-Barrera Laura Angelica. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*, *7*(2395–8790), 161–164. [https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde\\_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa\\_Barrera-Generalidades\\_e\\_importancia\\_de\\_los\\_agaves\\_en\\_Mexico.pdf](https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa_Barrera-Generalidades_e_importancia_de_los_agaves_en_Mexico.pdf)
- Fazekas, A. J., Kuzmina, M. L., Newmaster, S. G., & Hollingsworth, P. M. (2012). DNA barcoding methods for land plants. In *DNA barcodes* (pp. 223–252). Springer.
- Ford, C. S., Ayres, K. L., Toomey, Ni., Haider, N., van L, J., Kelly, L. J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W., & Wilkinson, M. J. (2009). Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *159*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00938.x>
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y., Ma, X., Pang, X., Xu, H., & Chen, S. (2010). Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, *130*(1), 116–121.

- García Aguilar, M. de los A., Terrazas, T., Segura León, O., Arias, S., Vibrans, H., & López-Mata, L. (2013). Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1), 13–22.
- García-Mendoza A. (2002). Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and ITS endemic species in México. *Cactus and Succulent Journal*, 74.4, 177–187.
- García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, I. S., & Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica mexicana*, 126. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- García-Mendoza Abisaí J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23.
- Gentry, H. S. (2004). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press.
- Gernandt, D. S., Flores, O. Z., & Goyenechea, I. (2007). Inferencia filogenética mediante secuencias de DNA: un ejemplo con los pinos piñoneros. *La Sistemática, Base Del Conocimiento de La Biodiversidad. Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo*, 55–65.
- Gernandt, D., Salazar, G., Vergara, F., Arias, S., Sosa, V., García, A., Reyes, J., Cabrera, L., & Rosas, P. (2009). *Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México*. Proyecto.
- Gillman, L. N., Keeling, D. J., Gardner, R. C., & Wright, S. D. (2010). Faster evolution of highly conserved DNA in tropical plants. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(6), 1327–1330.
- Good-Avila, S. V, Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124–9129.
- González-Álvarez Marcela. (2005). *Revisión Taxonómica de la Sección Salmianae Berger del Género Agave L. (Agavaceae)* [Grado de Doctor]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- González-Medrano Francisco. (2012). Suculencia, Adaptaciones de las plantas. In Instituto Nacional de Ecología (Ed.), *Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación*. (Primera Edición, pp. 81–84).
- Group, C. P. W., Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., & Erickson, D. L. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(31), 12794–12797.
- Heckenhauer, J., Barfuss, M. H. J., & Samuel, R. (2016). Universal Multiplexable *matK* Primers for DNA Barcoding of Angiosperms. *Applications in Plant Sciences*, *4*(6), 1500137. <https://doi.org/10.3732/apps.1500137>
- Hernández-Sandoval, L. (1995). Análisis cladístico de la familia Agavaceae. *Botanical Sciences*, *56*, 57–68.
- Hilu, K. W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Savolainen, V., Chase, M. W., Powell, M. P., Alice, L. A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T. A. B., Rohwer, J. G., Campbell, C. S., & Chatrou, L. W. (2003). Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *American Journal of Botany*, *90*(12), 1758–1776. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.12.1758>
- Hilu, K. W., & Liang, gping. (1997). The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*, *84*(6), 830–839. <https://doi.org/10.2307/2445819>
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(49), 19451–19452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108>
- Iglesias-Mancera Emma. (2020, September 17). *Distribución del Agave (maguey) en México y principales magueyes pulqueros*. [Http://Www.Destiladoscampesinos.Com](http://Www.Destiladoscampesinos.Com).
- Jaén-Molina, R., Rodríguez, Á. M., Reyes-Betancort, J. A., Suárez, J. N., Santos-Guerra, A., Caujape-Castells, J., Werner, O., Patiño, J., González-Mancebo, J. M., & Draper, I. (2010). La flora endémica del parque nacional de Garajonay bajo la perspectiva

molecular: Las secuencias de ADN como herramienta en la identificación taxonómica. *Naturaleza y Parques Nacionales. Serie Investigación En La Red. Madrid, Spain: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino*, 249–273.

Jeanson, M. L., Labat, J.-N., & Little, D. P. (2011). DNA barcoding: a new tool for palm taxonomists? *Annals of Botany*, *108*(8), 1445–1451.

Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., & Long, W. (2017). DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9.

Kim, K. J. (2015). *Consortium for the barcode of life: Plant working group*. Washington DC: National Museum of Natural History. <http://www.barcoding.com>

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, *16*(2), 111–120.

Korotkova, N., Borsch, T., Quandt, D., Taylor, N. P., Müller, K. F., & Barthlott, W. (2011). What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (Cactaceae). *American Journal of Botany*, *98*(9), 1549–1572.

Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., & Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(44), 18621–18626.

Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*, *2*(6), e508.

Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G., & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(8), 2923–2928.

- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de La Sociedad Entomológica Argentina*, 66(3–4), 15–25.
- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-Wakil, H., & Lakshmi, T. V. R. (2017). Discriminatory power of rbcL barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *3 Biotech*, 7(2), 1–7.
- Mark W. Chase, & James L. Reveal. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01002.x>
- Martínez-Agustino Antonio, Martínez-Margarito Cruz, Palma-De Jesus Felipe, & Córdoba Félix. (1995). *La Distribución, Usos Y Algunas Características Química, De Los Agaves De Oaxaca (México)*.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P. K. L. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5), 715–728.
- Meyer, C. P., & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3(12), e422.
- Miño Domínguez, J. E. (2018). *Identificación molecular del género Passiflora (Passifloraceae), de la región norte del ecuador por medio del método DNA Barcoding [Grado]*. Universidad Politécnica Salesiana.
- National Library of Medicine (US). (2021). *NCBI (National Center for Biotechnology Information)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nuccore/?Term=Agaves>.
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415–427.
- Oceguera-Figueroa Alejandro, & León-Régagnon Virginia. (2009). Códigos de barras para identificar a los seres vivos. *¿cómoves?*, 131, 10–14.
- Ortiz, D. G., van der Meer, P., Lumbreras, E. L., & Picornell, J. A. R. (2009). *El género Agave L. en la flora alóctona valenciana* (Vol. 3). José Luis Benito Alonso.

- Pacheco-Reyes, F. C., Wei, L., & Perez-Rodriguez, M. A. (2021). Análisis filogenético de especies de *Quercus* L. utilizando tres códigos de barras de ADN: Filogenia en especies del género *Quercus* L. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(2).
- Parmentier, I., Duminil, J., Kuzmina, M., Philippe, M., Thomas, D. W., Kenfack, D., Chuyong, G. B., Cruaud, C., & Hardy, O. J. (2013). How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? *PLoS One*, 8(4), e54921.
- Paz Andrea, Gonzalez Mailyn, & Crawford J. Andrew. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16 (3), 161–176.
- Peral-García; Giovambattista, G. & R. v. (2015). IDENTIFICACIÓN ESPECIE-ESPECÍFICA EN TRÁFICO DE FAUNA SILVESTRE. *Genética Forense No-Humana*, 186.
- Piredda, R., Simeone, M. C., Attimonelli, M., Bellarosa, R., & Schirone, B. (2011). Prospects of barcoding the Italian wild dendroflora: oaks reveal severe limitations to tracking species identity. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 72–83.
- Quiroz, D. C., Quintanilla, J. Á. V., & Pineda, A. C. (2007). El género *Agave* L. bajo cultivo: Taxonomía, distribución y usos. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 32(101), 57–70.
- Rentaría, A. M. (2010). Capítulo 18: Breve revisión de los marcadores moleculares. Parte III: Las herramientas moleculares. *Consejo Argentino Para La Información y Desarrollo de La Biotecnología. Argentina*, 541–566.
- Rivera-Jiménez, H.-J., Rossini, B.-C., Humanez-Alvarez, A.-D.-C., Silva, S.-R., Yepes-Escobar, J., & Marino, C.-L. (2020). DNA barcoding for molecular identification of *Gynerium sagittatum* (Poales: Poaceae): genetic diversity in savannah genotypes from Córdoba, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 68(4), 1049–1061.
- Rocha, M., & Gasca, J. (2007). Ecología molecular de la conservación. *Ecología Molecular*, 251–272.
- Rocha, P. J. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Revista Palmas*, 24(2), 11–25.

- Romano-Grande E. (2017). Agave, mezcal tradicional, cultura y diversidad. *Oikos. Ciencias*, 18, 9–13.
- Rosales, M. S. D., Jiménez, M. de la L. G., Gómez, C. R., Valles, C. Q., de León, S. D. D., Ordaz, S. J. M., & Balch, E. P. M. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género Agave. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53–62.
- Ross, H. A., Murugan, S., & Sibon Li, W. L. (2008). Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology*, 57(2), 216–230.
- Rucci Enzo. (2013). *Computación reciente del alineamiento de secuencias de ADN sobre cluster de multicores* [Grado: Especialista]. Universidad Nacional de La Plata.
- Salazar-Chávez Gerardo. (2009). *Identifican con Código de Barras Características y Funciones de las Plantas*.
- Santos-Zea, L., Maria Leal-Diaz, A., Cortes-Ceballos, E., & Alejandra Gutierrez-Uribe, J. (2012). Agave (Agave spp.) and ITS traditional products as a source of bioactive compounds. *Current Bioactive Compounds*, 8(3), 218–231.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2019, January 2). *Agaves, maravillosas y magnánimas plantas*. <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/agaves-maravillosas-y-magnanimas-plantas>
- Sharma, R., Mahla, H. R., Mohapatra, T., Bhargava, S. C., & Sharma, M. M. (2003). Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(1), 43–50.
- Simeone, M. C., Piredda, R., Papini, A., Vessella, F., & Schirone, B. (2013). Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (Quercus, Fagaceae): problems, prospects and phylogenetic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 172(4), 478–499.
- Sonet, G., Jordaens, K., Nagy, Z. T., Breman, F. C., de Meyer, M., Backeljau, T., & Virgilio, M. (2013). Adhoc: An R package to calculate ad hoc distance thresholds for DNA barcoding identification. *ZooKeys*, 365, 329.

- Stecher, G., Tamura, K., & Kumar, S. (2020). Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) for macOS. *Molecular Biology and Evolution*, 37(4), 1237–1239.
- Sun, H., McLewin, W., & Fay, M. F. (2001). Molecular phylogeny of *Helleborus* (Ranunculaceae), with an emphasis on the East Asian-Mediterranean disjunction. *TAXON*, 50(4), 1001–1018. <https://doi.org/10.2307/1224717>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 1, 2–3.
- Troiani, H.; P. A.; M. W.; T. M. & B. L. (2017). Flor. In Caraballo-Melina (Ed.), *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*. (pp. 113–122).
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110–117.
- Van Velzen, R., Weitschek, E., Felici, G., & Bakker, F. T. (2012). DNA barcoding of recently diverged species: relative performance of matching methods. *PloS One*, 7(1), e30490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030490>
- Vázquez-Elorza Ariel & Rivera-Ramírez Javier. (2020). Panorama socioeconómico de la población en territorios con agave maguey. *Centro de Investigación y Asistencia En Tecnología y Diseño Del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ)*, 978-607-8734-14-6, 11–15.
- Villarreal Q, J. A. (1996). Una Nueva Especie De " Agave " Subgénero " Agave " (Agavaceae) De México. *SIDA, Contributions to Botany*, 191–195.
- Vu, J. P., Vásquez, M. F., Feng, Z., Lombardo, K., Haagensen, S., & Bozinovic, G. (2021). Relative genetic diversity of the rare and endangered *Agave shawii* ssp. *shawii* and associated soil microbes within a southern California ecological preserve. *Ecology and Evolution*, 11(4), 1829–1842.

- Yang, Y., Zhou, T., Duan, D., Yang, J., Feng, L., & Zhao, G. (2016). Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species. *Frontiers in Plant Science*, 7, 959.
- Yu, J., Xue, J., & Zhou, S. (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*, 49(3), 176–181.