

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Implementación de Marcadores Genéticos ISSR en Sotol (*Dasyllirion cedrosanum*)

Por:

OLIVA MENDOZA PACHECO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México.
Mayo 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Implementación de Marcadores Genéticos ISSR en Sotol (*Dasyllirion cedrosanum*)

Por:

OLIVA MENDOZA PACHECO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

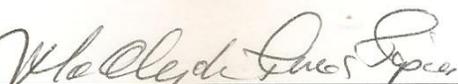
Aprobada:



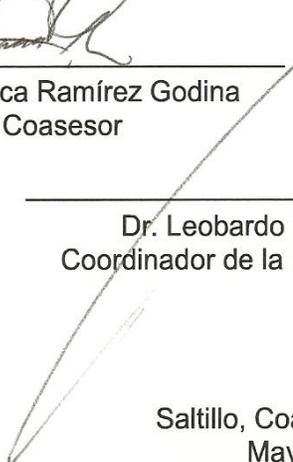
Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés
Asesor Principal



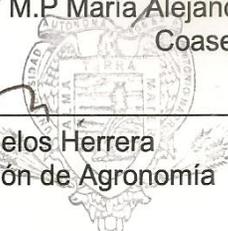
Dra. Francisca Ramírez Godina
Coasesor



M.P. María Alejandra Torres Tapia
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.
Mayo 2014

DEDICATORIA

Este trabajo como resultado de esfuerzo, dedicación, constancia, amor, comprensión, sacrificios, consejos y fe, lo dedico a aquellas personas increíblemente maravillosas que confiaron y confían en mí.

Mis padres

Estefina Pacheco Rodríguez y Luís Mendoza Hernández.

A ti madre gracias por darme la vida, por tus consejos de amiga y por darme fuerza en todo momento por mostrarme que nunca he estado sola, porque el día que Dios te llamo a traer fue el día que te convertiste en mi ángel para siempre, TE AMO. A ti padre por confiar en mí, por tus palabras de aliento y por todo el apoyo incondicional que me has ofrecido.

Mis hermanos

Mi gran familia Mendoza Pacheco: Marcial, Evangelina, Victoria, María de Lourdes, Eusebio Teófilo, René, Alicia, Artemio y a mis cuñadas/os , así como mis sobrinas /os. Por todo el apoyo moral, espiritual y económico, por confiar en mi aún en la distancia. Porque sé que no fue fácil aceptar que la más pequeña saliera de casa pero aquí estoy de pie para seguir.

Mis amigos y compañeros

Laura, Katy, Zury, Anita, Carmen, Luisa, Antonia, Anabel, Beatriz, Lucia, Horacio Juan, Uldárico, Antonio, Raúl René, Julián, Oscar, José Luis etc. Gracias por compartir lindos y tristes momentos juntos, no terminaría de mencionar a todos pero los llevo en mi mente y corazón. Una frase, un gesto, una sonrisa, una mirada que los identifica a cada uno.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por la vida que me ha dado, porque aun cuando mis ojos no te pueden ver te puedo sentir y sé que siempre estas junto a mi, por la fortaleza en los momentos difíciles, por poner en mí camino a personas maravillosas que me han ayudado a crecer. Por todo esto y más gracias mi Dios.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Gracias a ti mi “**Alma Terra Mater**” por permitirme ser parte de ti y por darme la oportunidad de seguirme preparando profesionalmente.

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

Por abrirme las puertas para formar parte de su proyecto. Por brindarme la confianza y la fe durante el desarrollo de éste trabajo, gracias por su paciencia, comprensión y por transmitir parte de sus conocimientos profesionales. Con su profesionalismo me ha enseñado que no hay cosa pequeña que no te ayude alcanzar grandes cosas.

Dra. Francisca Ramírez

Por su colaboración y disposición en formar parte de mi grupo de asesoría para realizar la revisión y corrección del presente trabajo.

M.P. María Alejandra Torres Tapia

Por su apoyo durante mi estancia en la Universidad como alumna y como tesista. Por su amplia disposición en formar parte del comité asesor y por enseñarme que no hay cosa alguna que no se pueda lograr con fe, esfuerzo y dedicación.

L.C.Q. Dulce Victoria Mendoza Rodríguez

Por su profesionalismo en laboratorio, por enseñarme el manejo práctico y funcionamiento de los procesos de técnicas moleculares. Por su apoyo ético e incondicional en todo momento al realizar este trabajo.

A mis maestros

A todo el personal académico de la División de agronomía quienes me brindaron su tiempo y espacio para impartir parte de sus conocimientos principalmente a los docentes del departamento de fitomejoramiento con quien compartí mayor parte de mi tiempo durante mi estancia en esta universidad.

Nota: Los análisis estadísticos y la escritura de este trabajo fueron realizados en su totalidad con software de acceso libre. El lenguaje y ambiente R fue utilizado para el análisis de los datos. La escritura se llevó al cabo con el procesador de palabras de LibreOffice y el manejo e integración de literatura se hizo con Mendeley. Se eligió el estilo de bibliografía de la American Psychology Association.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DEL CUADROS	iii
ÍNDICE DEL FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Diversidad Genética.....	3
¿Cómo se estudia la diversidad genética?.....	3
Importancia de la diversidad genética.....	4
Herramientas para el estudio de diversidad genética.....	4
Marcadores Moleculares.....	4
Técnicas de marcadores moleculares.....	5
ISSR (Inter-secuencia de repeticiones simples).....	7
Estudios previos de diversidad genética en plantas con ISSRs.....	8
Sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i>).....	9
Clasificación taxonómica.....	9
Características generales.....	10
Tipo de reproducción.....	10
Distribución del género <i>Dasyilirion</i>	11
Distribución de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	11
Usos del sotol.....	12
Importancia económica.....	12
Estudios genéticos previos en sotol.....	13

MATERIALES Y MÉTODOS	15
Localidad de estudio.....	15
Material genético.....	15
Recolección de muestras.....	17
Extracción de DNA.....	17
Determinación de la calidad del DNA.....	17
Iniciadores para ISSR.....	18
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
Técnica de electroforesis.....	19
Evaluación de la optimización de las temperaturas de alineación.....	20
Pruebas de diversidad.....	23
Análisis estadístico.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
Optimización de temperaturas de alineación.....	26
Identificación de polimorfismos.....	26
Codificación de los resultados.....	29
Medidas de diversidad.....	32
Análisis del marcador ISSR BEC.....	32
Análisis del marcador ISSR DAT.....	33
Análisis del marcador ISSR W814.....	34
Análisis del marcador ISSR W844.....	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DEL CUADROS

Cuadro 3.1. Lista de plantas de <i>D. cedrosanum</i> usadas en el estudio y su localización.....	16
Cuadro 3.2. Iniciadores utilizados para la ejecución de este trabajo usados previamente en espárrago (Sica, Gamba <i>et al.</i> , 2005).....	18
Cuadro 3.3. Programas de PCR para los iniciadores ISSR.....	23
Cuadro 3.4. Plantas de <i>D. cedrosanum</i> usadas con cada iniciador ISSR.....	24
Cuadro 4.1. Iniciadores ISSR usados y sus temperaturas de alineación en <i>A. acutifolius</i> (Sica, Gamba <i>et al.</i> , 2005) y las obtenidas para <i>D. cedrosanum</i>	26
Cuadro 4.2. Matriz de codificación de bandas para cada marcador ISSR en plantas de sotol.....	30
Cuadro 4.3. Estadísticas de diversidad para el marcador BEC.....	32
Cuadro 4.4. Estadísticas de diversidad para el marcador DAT.....	33
Cuadro 4.5. Estadísticas de diversidad para el iniciador W814.....	34
Cuadro 4.6. Estadísticas de diversidad para el iniciador W844.....	35

ÍNDICE DEL FIGURAS

Figura 3.1. Optimización de temperaturas para el iniciador BEC. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).....	20
Figura 3.2. Optimización de temperaturas para el iniciador DAT. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).....	21
Figura 3.3. Optimización de temperaturas para el iniciador W814. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).....	21
Figura 3.4. Optimización de temperaturas para el iniciador W844. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).....	22
Figura 4.1 Resultados de la amplificación con el iniciador BEC en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.....	27
Figura 4.2. Resultados de la amplificación con el iniciador DAT en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.....	28
Figura 4.3. Resultados de la amplificación con el iniciador W814 en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.	28
Figura 4.4. Resultados de la amplificación con el iniciador W844 en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.	29

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de implementar en sotol (*D. cedrosanum*) un tipo de marcador anónimo: los ISSRs, así como la evaluación de estos marcadores en términos de la capacidad para detectar polimorfismo genético en poblaciones.

Se usó material genético (DNA) de 14 hembras y 14 machos, las cuales fueron probados con cuatro iniciadores de marcadores ISSR: BEC, DAT, W814 y W844. La prueba se realizó mediante el uso de la PCR y electroforesis.

Se analizaron los patrones electroforéticos y por cada iniciador se construyó una matriz binaria donde 0 es ausencia de banda, 1 es presencia de banda y NA es dato perdido. A partir de los resultados obtenidos se estimaron dos parámetros: entropía de Shannon e índice de Gini-Simpson, adecuados para detectar diversidad entre genotipos. Los análisis estadísticos fueron realizados en el ambiente y lenguaje de cómputo R.

Los resultados estadísticos arrojaron datos que muestran al marcador ISSR DAT como posiblemente el mejor para estudios de diversidad genética en *D. cedrosanum*, seguido de los marcadores ISSR W814 e ISSR W844. El marcador ISSR BEC mostró un valor global de entropía muy bajo, lo cual puede ser una limitante en estudios de diversidad en poblaciones de sotol.

Palabras clave: *D. cedrosanum*, sotol, marcador ISSR, diversidad genética.

ABSTRACT

This work was performed with the goal of implementing a type of anonymous marker: ISSR, in sotol (*D. cedrosanum*), and to evaluate this kind of marker in terms of its capability to detect genetic polymorphism in populations of this species.

The genetic material (DNA) came from 14 females and 14 males, which were tested with four primers for ISSR markers: BEC, DAT, W814 and W844. The tests were performed through PCR and electrophoresis.

Electrophoretic patterns were analyzed for each primer by coding a binary matrix for each marker, with 0 for band absent, 1 for band present and NA for missing data. Two parameters were estimated: the Shannon entropy and the Gini-Simpson index, both suitable for detecting diversity between genotypes. The statistical analyzes were performed with the language and environment for statistical computing R.

The results show the ISSR DAT marker as possibly the best for genetic diversity studies in *D. cedrosanum*, followed by the ISSR W814 and ISSR W844 markers. The ISSR BEC marker showed a low global entropy, which may be a limitation for its use in diversity studies in sotol populations.

Keywords: *D. cedrosanum*, sotol, ISSR marker, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

El sotol (*Dasyliirion cedrosanum*) es una planta dioica, perenne, policarpa y semicilíndrica. Llega a medir hasta tres metros y tiene adaptación a zonas áridas y semiáridas. Su forma de reproducción es sexual por semilla. En México se han identificado 16 especies entre las cuales se localiza *D. cedrosanum* propia de la zona norte del país y parte del sur de Estados Unidos.

Las poblaciones de sotol son altamente importantes por su papel ecológico y los diversos usos como alimento para ganado, material de artesanía y de construcción. El aprovechamiento más importante económicamente es la producción de licor.

El sotol está sujeto a los disturbios generados por su uso irracional. Durante los últimos años nuestro planeta ha experimentado grandes cambios en el medio ambiente que causan daño a la biodiversidad, con pérdidas de hábitat para muchos organismos, introducción de especies exóticas y uso irracional de los recursos naturales. Las poblaciones silvestres forman parte de la dinámica ecológica y de los procesos evolutivos de los ecosistemas en los que viven, y una de las mayores amenazas a las mismas es la pérdida de diversidad genética.

La diversidad genética es la variación entre los genomas de los seres vivos, y se presenta entre los individuos de una población, entre las poblaciones dentro de una especie, así como entre especies. Tal diversidad se ve reducida cuando una población disminuye substancialmente y quedan pocos individuos, lo cual ocasiona cambios en su adaptabilidad y puede incluso conducir a su desaparición parcial o total.

El monitoreo de la diversidad en las poblaciones de plantas es necesaria para el conocimiento del estado de una especie y la toma de decisiones acerca de su manejo. Una de las herramientas más útiles y de mayor actualidad para el estudio de la diversidad en los seres vivos son los marcadores genéticos, que tienen su origen en variaciones individuales en la secuencia común del DNA. Estos marcadores cubren gran parte del genoma, posibilitando su evaluación en fases muy tempranas y a partir de muestras mínimas y no son influenciados por el ambiente. Sin embargo, no todos los marcadores son apropiados para estudiar especies cuya secuencia genómica es desconocida, como es el caso del sotol. En tales circunstancias, resultan particularmente útiles los llamados marcadores anónimos, los cuales no requieren de conocimiento previo de secuencia.

Objetivos

- Implementación de un tipo de marcadores anónimos: los ISSR, en *Dasyilirion cedrosanum*.
- Evaluación de ISSRs en términos de su capacidad para detectar polimorfismo genético en poblaciones.

REVISIÓN DE LITERATURA

Diversidad Genética

La diversidad genética es considerada la variación heredable entre los individuos de una población, entre las poblaciones dentro de una especie, así como entre especies (Brown, 1978). Es el resultado de las muchas diferencias genéticas entre individuos y puede ser evidente en las diferencias en secuencia de DNA, en las características bioquímicas, en las propiedades fisiológicas o en caracteres morfológicos (Hamrick, Godt *et al.*, 1992).

Los avances científicos han desarrollado nuevas técnicas para la secuenciación de genomas, lo que ha permitido un mejor manejo de la biodiversidad. Sin embargo hasta el momento no se ha logrado la secuencia de genomas en todas las especies existentes. Tal es el caso de *Dasyilirion cedrosanum*. Se puede evaluar la variabilidad genética dentro de una población a través de parámetros (Primack, 1993); por ejemplo

1. El número de marcadores polimórficos en la población,
2. El número de alelos por cada marcador polimórfico,
3. La proporción de loci heterocigotos por individuo.

¿Cómo se estudia la diversidad genética?

Los métodos moleculares se han convertido en una parte esencial de la mayoría de los estudios sobre la diversidad genética. Los análisis de la diversidad genética se basan generalmente en aloenzimas o marcadores de DNA, que tienden a ser selectivamente neutros (Karp, 1996).

Importancia de la diversidad genética

La diversidad genética es importante en términos evolutivos. La pérdida de individuos, poblaciones y especies disminuye la variabilidad de genes, lo que dificulta su adaptación a cambios. Cuanto menor sea el tamaño de la población, la diversidad tiende más a disminuir, lo cual ocasiona cambios en su adaptabilidad y puede incluso conducir a su desaparición (Rao y Hodgkin, 2002). El estudio sobre diversidad genética en plantas es de suma importancia para el alcance y distribución de una especie, así como la forma en que está estructurado. Tener conocimientos sobre la base genética es un requisito esencial para la determinación cómo, dónde y en qué conservar el material genético (Maroof, Allard *et al.*, 1990).

Herramientas para el estudio de diversidad genética

La genómica se encarga del estudio de la estructura y función del material genético. Para llegar a lograr el gran avance de la genómica, ha sido necesario el desarrollo de una amplia variedad de técnicas moleculares. Estas técnicas han permitido un desarrollo exponencial en el conocimiento de las bases genéticas de diversas respuestas y procesos presentes en los organismos (McKusick y Ruddle, 1987). Los marcadores de DNA son útiles tanto en la investigación básica como en la aplicada. Han sido utilizados desde 1970 y se aplica en los sectores de alimentación, agricultura, medicina, taxonomía, ciencia forense, etc.

Marcadores Moleculares

Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de DNA. Los marcadores bioquímicos incluyen las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Los marcadores de DNA constituyen la nueva generación. Se basan fundamentalmente

en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del material genético. 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 (Simpson, 1997).

Los marcadores moleculares son en su mayor parte fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Rallo, Belaj *et al.*, 2002). Los marcadores moleculares tienen un rango amplio de aplicaciones, entre éstas: el mapeo y marcaje de genes, los estudios de diversidad genética, las relaciones entre y dentro de las diferentes especies, y la distribución de esa diversidad entre regiones geográficas (Valdés-Infante, Rodríguez-Medina *et al.*, 2010). Los marcadores moleculares corresponden a un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas.

Técnicas de marcadores moleculares

AFLP (Polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados). Detectan fragmentos de restricción de DNA mediante amplificación con PCR y el uso de enzimas de restricción (Vos, Hogers *et al.*, 1995).

DArT (Tecnología de arreglos de diversidad). Es una técnica basada en la hibridación que permite la tipificación simultánea de varios cientos de loci polimórficos en el genoma; es particularmente adecuado para la genotipificación de especies poliploides con grandes genomas. Esta tecnología genera polimorfismo de todo el genoma al detectar presencia / ausencia de fragmentos de DNA generadas a partir de muestras de DNA genómico (Jaccoud, 2001).

ISSR (Inter-secuencia de repeticiones simples). Es una técnica que implica el uso de secuencias de microsatélites como iniciadores en una PCR para generar marcadores multilocus. Estos marcadores han demostrado su utilidad en estudios de diversidad genética y mapeo genético (Zietkiewicz, Rafalski *et al.*, 1994).

RAPD (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente). Consiste en la amplificación al azar de secuencias cortas de nucleótidos, mediante la utilización de pequeños iniciadores de 8 a 10 pares de bases que reconocen sitios anónimos en el genoma, y son amplificados por PCR (Williams, Kubelink *et al.*, 1990).

RFLP (Polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción). Este método consiste en la obtención de fragmentos de DNA con el uso de endonucleasas capaces de reconocer sitios altamente específicos. Los fragmentos de restricción se pueden visualizar por electroforesis en geles de agarosa (Botstein, White *et al.*, 1980).

SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas). Esta técnica fue introducida por Paran y Michelmore, (1993) y se basa en la amplificación de una secuencia conocida utilizando iniciadores de 20 pares de bases.

SNP (Polimorfismo en nucleótidos simples). Son el resultado de la presencia de una base variante en cualquier sitio del genoma y constituyen la forma más común de variaciones genéticas. Se encuentran tanto en secuencias anónimas de DNA como en secuencias codificantes (Jordan y Humphries, 1994).

SSLP (Polimorfismo en longitud de repeticiones de secuencia simples). Son marcadores genéticos que se basan en la amplificación con iniciadores de una zona previamente secuenciada. Se basan en la variación de secuencias cortas repetidas en tándem llamadas SSRs (Dietrich, Katz *et al.*, 1992).

ISSR (Inter-secuencia de repeticiones simples)

En los estudios de diversidad genética, los marcadores más utilizados son los basados en microsatélites. ISSR es un método basado en la PCR, que implica la amplificación de un segmento de DNA presente entre dos microsatélites orientados en dirección opuesta (Zietkiewicz, Rafalski *et al.*, 1994). ISSR es una técnica relativamente nueva y es similar a los RAPDs. Excepto que las repeticiones de microsatélites usados como iniciadores para ISSR pueden ser de nucleótidos di, tri, tetra o penta-nucleótido. La técnica requiere iniciadores de 15 a 30 bases (Zietkiewicz, Rafalski *et al.*, 1994).

Se utilizan dos medios de soporte para realizar la electroforesis de ISSRs: en geles de agarosa y en geles de acrilamida. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 200 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSRs consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados. Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes; la presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus (Zietkiewicz, Rafalski *et al.*, 1994).

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores (González y Aguirre, 2007):

- 1) La no existencia de un sitio de unión completo al iniciador debido a una mutación,
- 2) Rearreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis,
- 3) Inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifique como un locus diferente.

Estudios previos de diversidad genética en plantas con ISSRs

Se realizaron estudios en medición de la diversidad genética de 10 cultivares comerciales. *Carica papaya*, con tres técnicas RAPD, ISSR y DAMD. Todas las técnicas permitieron determinar las relaciones genéticas en el germoplasma. Sin embargo determinaron que el mejor método para el análisis fue con ISSR (Saxena, Chandra *et al.*, 2005).

Krueger y Roose, (2003) llevaron a cabo una investigación donde el objetivo principal fue el desarrollo de técnica y búsqueda de marcadores para caracterizar embriones cigóticos y nucelares en *Citrus spp.* Los ISSRs les permitieron una mejor caracterización de materiales, mejoría en el manejo y orden de la colección. Por otro lado un estudio donde se utilizaron ISSR y aloenzimas en *Viola pubescens*, una planta cleistogámica, mostró una gran variación genética. A nivel de especie, el 100% de los loci fueron polimórficos aún cuando los iniciadores (se utilizaron tres) fueron seleccionados al azar. Dentro de cada población cerca del 71% de 83 loci fueron polimórficos. En general, las aloenzimas y la técnica ISSR dieron resultados similares, lo que indica que los marcadores ISSR muestran potencial para su uso en estudios de genética de poblaciones (Culley y Wolfe, 2001).

En un estudio realizado en *Asparagus acutifolius* L., se evaluaron 42 iniciadores de los cuales 23 resultaron útiles para caracterizar muestras, mientras que 19 fueron excluidos debido a la ausencia de amplificación. Los 23 iniciadores útiles dieron un total de 228 fragmentos polimórficos, que van desde 150 hasta 1100 pb, con 100% de repetibilidad. Los fragmentos del mismo peso molecular se consideraron como el mismo locus. Se observó un alto nivel de variación genética usando marcadores ISSR, con 100% de loci polimórficos a nivel de especie (Sica, Gamba *et al.*, 2005). También se realizaron análisis de la diversidad genética en *Cyamopsis tetragonoloba* L. mediante marcadores RAPD y ISSR, y se obtuvo como resultado que los ISSR

fueron más eficientes que los RAPDs con respecto a la detección de polimorfismo; se detectaron 97% en comparación con 90.3% para los marcadores RAPD. Además, el número medio de bandas polimórficas por iniciador fue mayor en ISSRs (10.5) que para los RAPD (8.2) (Sharma, Sharma *et al.*, 2014).

Sotol (*Dasyilirion cedrosanum*)

Clasificación taxonómica (USDA, 2014)

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Plantae*

Subreino: *Viridaeplantae*

Filum: *Tracheophyta*

Subfilum: *Euphyllophytin*

Infrafilum: *Raiatopses*

Clase: *Spermatopsida*

Subclase: *Liliidae*

Superorden: *Lilianaes*

Orden: *Asparagales*

Suborden: *Asparagineae*

Familia: *Asparagaceae*

Subfamilia: *Nolinoideae*

Género: *Dasyilirion*

Especie: *cedrosanum*

Nombre científico: *Dasyilirion cedrosanum*.

Características generales

El sotol (*Dasyllirion cedrosanum*) es una planta silvestre perteneciente al grupo de las monocotiledóneas. Es dioica, perenne policárpica y semicilíndrica. Llega a alcanzar hasta 3.5 metros de altura, hojas verde pálido, agrupadas en rosetas, fibrosas, de 0.5 - 5 cm de ancho por 30 - 170 cm de largo; espinas gruesas, más del 90 % curvadas hacia la base, raíces fibrosas con flores pequeñas, hembra y macho nacen en plantas separadas. Su inflorescencia se desarrolla en una estructura elevada llamada escapo o garrocha que llega a medir de 2 a 3.5 m de alto (Bogler, 1998). El sotol tiene un índice de germinación por arriba del 90 % en condiciones de laboratorio (Cruz-López, 2011).

Tipo de reproducción

El tipo de reproducción de *D. cedrosanum* es sexual por semilla y su característica más notable es la dioecia, con presencia de plantas pistiladas y estaminadas, lo cual hace que la reproducción cruzada sea obligada (Reyes-Valdés, Benavides-Mendoza *et al.*, 2012). El número cromosómico reportado para *D. cedrosanum* $2n = 38$ en metafase mitótica (Hernández, 2012). Ambos sexos tienen una inflorescencia terminal con estambres funcionales en las plantas femeninas y pistilos funcionales en las masculinas ((Bogler, 1998). Las flores estaminadas tienen una vida más larga que las pistiladas, y presentan seis estambres con filamentos más largos que el perianto (Reyes-Valdés, Benavides-Mendoza *et al.*, 2012). La hembra en un año productivo puede generar de 0.25 a 2.7 kg de semillas que caen de la inflorescencia al ser agitada por el viento. En promedio se pueden contar 95,000 semillas por kilogramo (Sierra-Tristán, Royo-Marquez *et al.*, 2008).

Distribución del género *Dasyilirion*

El género está distribuidos en regiones con climas áridos y semiáridos (Cronquist, 1981). Se distribuye dentro de la república mexicana en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Veracruz, mientras que en Estados Unidos, sólo se localiza en Arizona, Nuevo México y Texas (Bogler, 1998). En México se han encontrado cerca 16 especies, de las cuales *D. cedrosanum*, *D. duranguense* y *D. wheeleri* tienen mayor importancia económica (Standley, 1922), y se han reportado cuatro especies de sotol para el estado de Coahuila: *D. cedrosanum*, *D. heteracanthum*, *D. leiophyllum* y *D. texanum*, de las cuales la más abundante es *D. cedrosanum* (Villarreal-Quintanilla, 2001).

Distribución de *Dasyilirion cedrosanum*

Es una especie representativa del matorral desértico rosetófilo y crassicaule rosetófilo, tipos de vegetación característicos de la zona biogeográfica conocida como Desierto Chihuahuense. El área de distribución de las poblaciones naturales de *D. cedrosanum* se encuentra ubicada dentro la zona fisiográfica del Altiplano Mexicano, en un rango de altitud que oscila entre los 850 y 2600 m, en suelos poco profundos, pedregosos, calcáreos y climas secos continentales o secos, semi-calientes, entre la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental, distribuyéndose en amplias extensiones de esta última. Se ubica en un rango de temperaturas medias que va desde los 17 a los 21 °C y con un rango de precipitación media anual de 150 a 400 mm (Cano-Pineda y Martínez-Burciaga, 2007), y prospera en suelos bien drenados, y ya establecido normalmente necesita poca agua (Bogler, 1998). Puede llegar a vivir 150 años bajo condiciones de invernadero y sobrevivir a los veranos e inviernos extremosos (López-Barbosa, 2005).

Usos del sotol

Uno de los usos más comunes del sotol es como forraje, donde las partes empleadas son el tallo y la base de las hojas. En especial se utilizan como alimento para el ganado en la época de sequía, ya que es muy resistente a la falta de agua. Debido a esto, una gran cantidad de animales han sido salvados durante dichos períodos críticos. Como uso artesanal, se emplean las hojas para tejer petates, sombreros, canastas, sopladores de fuego, algunos adornos para diversas fiestas, y otros objetos (Olhagaray-Rivera, Esparza-Chavéz *et al.*, 2012). Ha tenido un uso en la construcción de viviendas, se emplean los escapos florales como cercos, y en ocasiones las hojas se ocupan para la elaboración de techos en pequeñas viviendas. De mayor importancia económica, se emplea en la preparación de una bebida alcohólica conocida como “sotol” (Herrera-Ramírez, Rodríguez-Herrera *et al.*, 2006).

Importancia económica

La Norma Oficial Mexicana del Sotol (DOF, 2004), en los últimos años ha incrementado considerablemente el interés por la producción y comercialización de *D. cedrosanum* en los estados de Durango, Chihuahua y Coahuila. El “sotol” es la bebida alcohólica que se obtiene de las plantas conocidas comúnmente como sotol (*Dasyliiron cedrosanum*) cuya parte aprovechable para la elaboración de esta bebida, es la piña o cabeza (IMPI, 2002). El licor se obtiene a través de una cocción de piñas, que se somete a fermentación alcohólica con levadura para posteriormente destilarse.

Actualmente se tienen registradas cinco marcas comerciales de este licor, las cuales cuentan con rigurosos controles de calidad, por lo que tienen una gran aceptación en México, Estados Unidos y Europa. La producción del licor es posible debido al alto contenido de carbohidratos complejos y simples, como glucosa, fructosa y una serie

de fructo oligosacáridos y polímeros de fructuosa que tienen estas plantas (De La Garza-Toledo, Martínez *et al.*, 2008). El mercado del sotol se ha incrementado, de tal manera que una forma para asegurar una respuesta oportuna a la demanda es incrementar la cantidad de materia prima, situación que ha levantado una polémica, ya que por sus condiciones naturales la planta del sotol cada vez se recolecta en zonas más lejanas, lo cual implica mayores costos e impacto sobre los ecosistemas naturales y trae consigo una amenaza para la biodiversidad.

Estudios genéticos previos en sotol

En un estudio se recolectaron 20 muestras de piña de sotol independientemente de la edad, así como las hojas de cada planta (Cruz-Requena, De la Garza-Toledo *et al.*, 2013). Este estudio estaba enfocado a separar plantas hembras y machos a través de características químicas y moleculares. En el estudio del análisis químico se reportó que los valores de etanol y azúcar producido a partir de plantas hembras y machos son estadísticamente similares, así como la cantidad de fibra. El análisis molecular para estudiar DNA polimórfico entre plantas se logró usando AFLPs, dentro del análisis molecular se estudió la diversidad genética entre poblaciones de plantas hembras y machos, y los resultados obtenidos fueron estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), donde las variables (alelos efectivos, contenido del índice polimórfico, heterogeneidad imparcial de Nei), no mostraron diferencias significativas (Cruz-Requena, De la Garza-Toledo *et al.*, 2013).

El análisis cluster (agrupamiento) fue utilizado para la comparación de sexo, para ello se calcularon distancias Euclidianas y de Dice, la distancia Dice mostró el valor más alto de correlación cofenética, por esa razón, se utilizó esta distancia para llevar a cabo el análisis de agrupamiento. Pero al momento de separar poblaciones de plantas hembras y machos para estudiar la diversidad genética entre plantas, no fue

posible, esto indica que comparten la mayor parte del contenido genético, es decir la diversidad genética de una población incluye variación genética dentro de una especie, tanto entre poblaciones geográficamente separadas y entre los individuos dentro de las poblaciones (Cruz-Requena, De la Garza-Toledo *et al.*, 2013).

En otro estudio se analizó el número cromosómico y la proporción de sexos en poblaciones de *D. cedrosanum*. Se observó un número cromosómico $2n = 38$ en metafase mitótica (Hernández-Quintero, 2012), el cual es consistente con las observaciones previas en otras dos especies del mismo género: *D. texanum* y *D. wheeleri*, para los cuales se reportó el mismo número cromosómico (Sato, 1935).

Un estudio relacionado a *D. cedrosanum*, sobre diversidad genética ha sido en espárrago (*Asparagus acutifolius* L.) (Sica, Gamba *et al.*, 2005). En éste trabajo se recolectaron muestras de espárrago en ocho regiones diferentes y fueron evaluados a través del marcador genético ISSR, usando 42 iniciadores dentro de estos se localizan BEC, DAT, W814 y W844, del total de los iniciadores, 23 generaron 228 fragmentos polimórficos, que van desde 150 hasta 1,100 pares de bases, con 100 % de repetibilidad. Los resultados estadísticos mostraron un índice de fijación de 0.4561 y Theta-B igual a 0.4776, estos resultados mostraron que hay una gran diversidad genética entre plantas de *A. acutifolius* L. Además, ésta especie comparte algunas características con el sotol, ya que es una planta dioica, perenne y pertenece a la familia de la *Asparagaceae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidad de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Genomas del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila. Las muestras fueron recolectadas en los terrenos de la sede de esta Universidad, localizada en una zona con clima templado semiseco; ubicada geográficamente en los 25° 20' 55.72" N y 101° 01' 40.74" O, con una altitud de 1798 m.

Material genético

Se trabajó con una muestra de plantas de *D. cedrosanum*, compuesta de 14 hembras y 14 machos (Cuadro 3.1). Las hembras fueron etiquetadas en el laboratorio desde H1 a H14 mientras que los machos se identificaron desde M1 a M14. Las 28 plantas de sotol se localizan entre los 1783 y 1814 msnm, dentro de las latitudes 25° 20' 55.50" N y 25° 21' 22.86" N y las longitudes 101° 01' 40.32" O y 101° 01' 54.78" O.

Cuadro 3.1. Lista de plantas de *D. cedrosanum* usadas en el estudio y su localización.

ID Laboratorio	ID Campo	Sitio de colecta		
		Latitud	Longitud	Altitud (m)
H1	UA2011-32-1	25°21'22.32"	101°01'55.56"	1786
H2	UA2011-35-1	25°20'56.82"	101°01'40.14"	1811
H3	UA2010-30-1	25°20'56.16"	101°01'39.78"	1812
H4	UA2011-3-1	25°20'56.10"	101°01'40.38"	1812
H5	UA2010-27-1	25°21'21.72"	101°01'58.02 "	1783
H6	UA2011-44-1	25°21'21.48"	101°01'57.84"	1785
H7	UA2011-05-1	25°20'56.40"	101°01'40.38"	1812
H8	UA2011-45-1	25°21'20.28"	101°01'58.20"	1787
H9	UA2010-12-1	25°21'21.48"	101°01'54.36"	1791
H10	UA2011-39-1	25°21'20.22"	101°01'54.30"	1789
H11	UA2011-28-1	25°20'56.70"	101°01'40.38"	1809
H12	UA2010-31-1	25°20'55.62"	101°01'40.62"	1813
H13	UA2010-22-1	25°21'21.54"	101°01'57.84"	1784
H14	UA2011-10-1	25°20'55.68"	101°01'40.74"	1813
M1	UA2010-37-1	25°21'21.48"	101°01'57.72"	1784
M2	UA2010-15-1	25°20'55.62"	101°01'40.14"	1810
M3	UA2010-16-1	25°20'55.50"	101°01'40.32"	1813
M4	UA2010-17-1	25°20'55.56"	101°01'40.32"	1814
M5	UA1027	25°20'57.60"	101°01'40.92"	1809
M6	UA2010-26-1	25°20'56.70"	101°01'40.26"	1809
M7	UA2010-28-1	25°20'56.70"	101°01'39.96"	1811
M8	UA2010-29-1	25°20'56.10"	101°01'39.60"	1811
M9	UA2011-2-1	25°20'56.16"	101°01'40.50"	1813
M10	UA2010-32-1	25°20'55.50"	101°01'40.62"	1813
M11	UA2011-9-1	25°20'55.92"	101°01'40.32"	1813
M12	UA2011-23-1	25°21'20.52"	101°01'57.90"	1796
M13	UA2011-17-1	25°21'22.86"	101°01'54.78"	1787
M14	UA2011-30-1	25°21'21.96"	101°01'56.22"	1786

ID = clave de identificación

Recolección de muestras

De las plantas seleccionadas se cortaron hojas jóvenes y se introdujeron en cajas de Petri respectivamente identificadas; se llevaron inmediatamente al laboratorio para ser desinfectadas con una solución de hipoclorito al 1 % por 1 min y etanol al 70 % por el mismo tiempo. Se enjuagaron en agua estéril y se dejaron secar para su posterior procesamiento.

Extracción de DNA

El aislamiento de DNA genómico se realizó con base en el método de López *et al.*, (1995). Para ello se molieron 20 mg de tejido fresco con N₂ líquido y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 ml; se agregaron 600 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH = 8, NaCl 20 mM, EDTA 20 mM y N-Lauril-sarcosina al 7 %) con inversión ocasional dejándolo reposar por 10 minutos. Posteriormente se le agregaron 600 µl de fenol, se agitó en un vortex y se centrifugó por 20 min a 4 °C a 12,000 rpm. Se retomó la fase acuosa, se transfirió a otro tubo y se le agregaron 10 µl de RNAsa (10 mg/ml); se mezcló por inversión e incubó a 37 °C por 15 minutos. Se le agregaron 600 µl de isopropanol frío (-20 °C), se mezcló con cuidado y se dejó reposar por media hora aproximadamente hasta formar la madeja de DNA. Se sacó la madeja con un gancho de pipeta Pasteur estéril y se transfirió a otro tubo eppendorf (1.5 ml); se lavó la madeja con 400 µl de alcohol al 70 % a -20 °C y se resuspendió en 50 µl de TE 1 %, para su almacenamiento a -20 °C.

Determinación de la calidad del DNA

Posterior a la extracción del DNA se cuantificó y evaluó su calidad midiendo la absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) y a 280 nm (A₂₈₀), con un espectrofotómetro Thermo Spectronic (modelo BioMate3). Se colocó en una celda una muestra de 10 µl de DNA

disuelta en 990 µl de agua estéril. Como los ácidos nucleicos tienen su máxima absorbancia a 260 nm mientras que las proteínas lo tienen a 280 nm, el cociente de ambas absorbancias (A260/280) determina si el DNA genómico extraído está libre de impurezas. La calidad del DNA se corroboró por medio de electroforesis en gel de agarosa.

Iniciadores para ISSR

Se usaron cuatro iniciadores para marcadores ISSR: BEC, DAT, W814 y W844 (Cuadro 3.2), los cuales fueron utilizados en un estudio con espárrago (*A. acutifolius*) y mostraron tener un buen resultado en la diferenciación de poblaciones (Sica, Gamba *et al.*, 2005). Cabe señalar que las temperaturas de alineación que se presentan en este cuadro son las que se obtuvieron en el estudio de espárrago y que nos sirvieron como punto de partida para encontrar las temperaturas óptimas de estos iniciadores con las muestras de *D. cedrosanum*.

Cuadro 3.2. Iniciadores utilizados para la ejecución de este trabajo usados previamente en espárrago (Sica, Gamba *et al.*, 2005).

Nombre del iniciador	Secuencia 5' - 3'	TA (°C)
BEC	CACACACACACAYC	54.0
DAT	GAGAGAGAGAGARC	54.0
W814	CTCTCTCTCTCTTTG	52.0
W844	CTCTCTCTCTCTTRC	52.8

TA= Temperaturas de alineación reportadas por Sica *et al.* (2005)

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó la técnica de la PCR con la finalidad de amplificar o reproducir un gran número de copias de una región específica de DNA, partiendo de un mínimo de muestra. Para llevar al cabo esta técnica se prepararon cócteles de PCR que

contenían 4 µl de DNA (75 ng/µl), 4 µl de Taq&Go (Mastermix 5xC, MP ®), 4 µl del iniciador a 2 µM y 8 µl de agua estéril, para un volumen total de 20 µl por muestra.

La PCR fue realizada en un termociclador de gradiente (AXIGEN, Modelo MaxyGene Gradient®). Con la excepción de las temperaturas de alineación, las cuales fueron optimizadas en este trabajo, las condiciones de reacción fueron las reportadas por Sica, Gamba *et al.*, (2005): 94 °C a 1.5 min para la desnaturalización inicial; 35 ciclos con 94 °C por 40 s, 45 s a la temperatura óptima de alineación y 72 °C por 1.5 minutos. Finalmente un ciclo a 94 °C por 45 s, 45 s a la temperatura de alineación óptima y 5 min a 72 °C. Al final de la reacción las muestras se mantuvieron a 4 °C por tiempo indeterminado.

Técnica de electroforesis

Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis horizontal. Se utilizó un equipo de electroforesis Life Technologies™ Gibco. Se prepararon los geles de agarosa disolviendo 1 g de agarosa en 100 ml de TBE. La mezcla se calentó en un horno de microondas por 90 s hasta que se transparentó. Posteriormente se agregaron 10 µl de Gel Red (NucleicAcid Gel Stain, 10,000X 0.5 ml, Biotium®) como agente colorante de tinción y se agitó suavemente para obtener una mezcla homogénea. En seguida se colocó el peine en el lado de la charola correspondiente al polo negativo. La mezcla se vació y se eliminaron las burbujas. El gel se dejó enfriar por 20 min y se cargaron 5 µl de la muestra (producto de PCR) más 1 µl de buffer de carga. Además se cargó en uno de los pozos del gel un total de 3 µl del marcador de tamaño (Ladder DNA marker, Axygen®) más 1 µl de buffer de carga. Una vez que se terminaron de cargar las muestras se cubrió el gel por completo con una solución de TBE; se cerró el aparato, se conectaron los cables a la fuente de poder con un potencial de entre 80 y 95 V, por un tiempo de 2 a 2.5 hrs. Al término de ese tiempo se extrajo el gel y se llevó a un documentador de geles (Bio-Rad Gel Doc™ 170-8170), para su interpretación. Este equipo consta de un trasluminador y

una cámara que capta la imagen del gel y la envía a una computadora con sistema operativo Windows XP y software Quantity One®.

Evaluación de la optimización de las temperaturas de alineación.

Se utilizaron los DNAs de una planta hembra (H), una planta macho (M) de *D. cedrosanum* y una de espárrago (E); se probaron cinco temperaturas por planta para cada iniciador. Se probaron de manera general temperaturas inferiores a las que señala el artículo de Sica, Gamba *et al.*, (2005), con una sola excepción: el iniciador W814 (Figura 3.3), donde se probó una temperatura (53 °C) superior a la que menciona el artículo (52 °C).

En cada uno de los geles obtenidos (Figuras 3.1 a 3.4), se marca con una flecha de color verde la temperatura que mejor amplificó en cada iniciador y de color rojo la que menciona el artículo de (Sica, Gamba *et al.*, 2005).

49.1 °C 52.5 °C 53 °C 54 °C 54.9 °C 49.1 °C 52.5 °C 53 °C 54 °C 54.9 °C 49.1 °C 52.5 °C 53 °C 54 °C
H₁ H₁ H₁ H₁ H₁ M₁ M₁ M₁ M₁ M₁ E₁ E₁ E₁ E₁

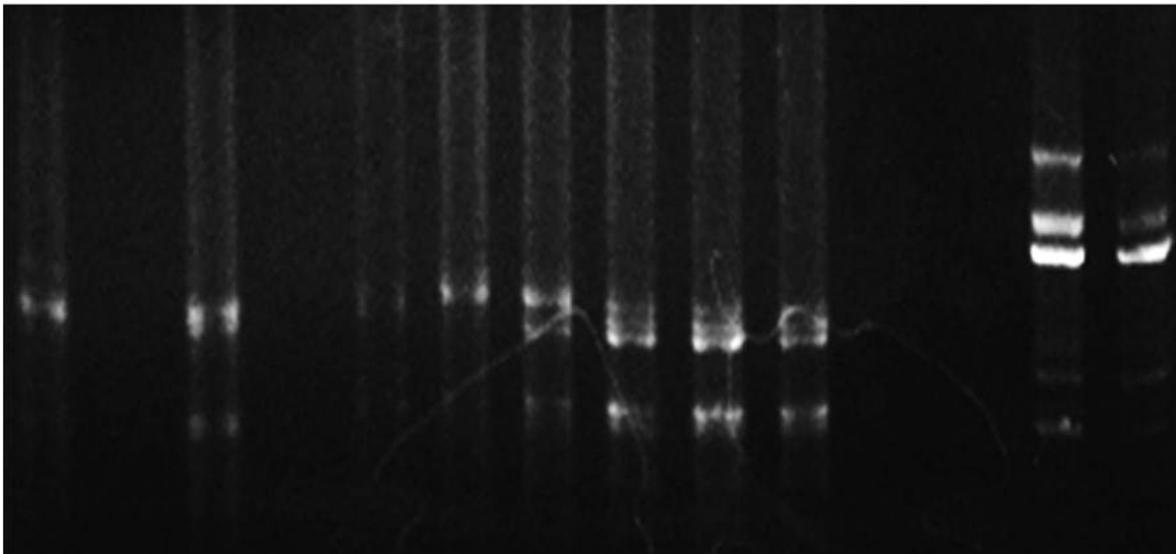


Figura 3.1. Optimización de temperaturas para el iniciador BEC. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).

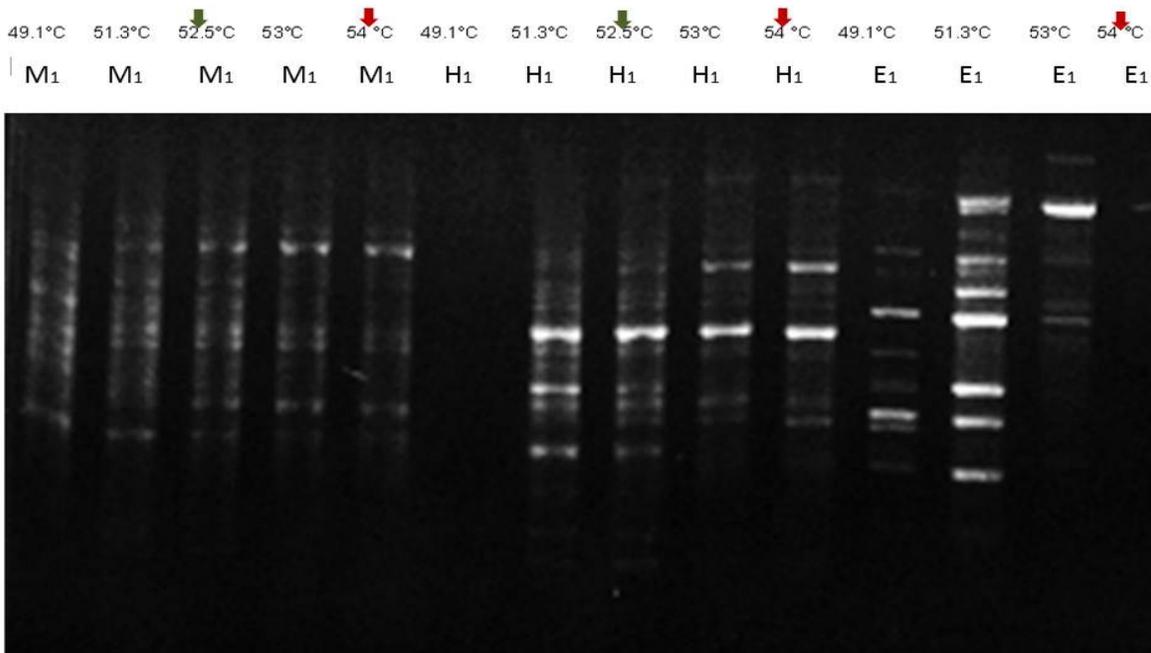


Figura 3.2. Optimización de temperaturas para el iniciador DAT. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).

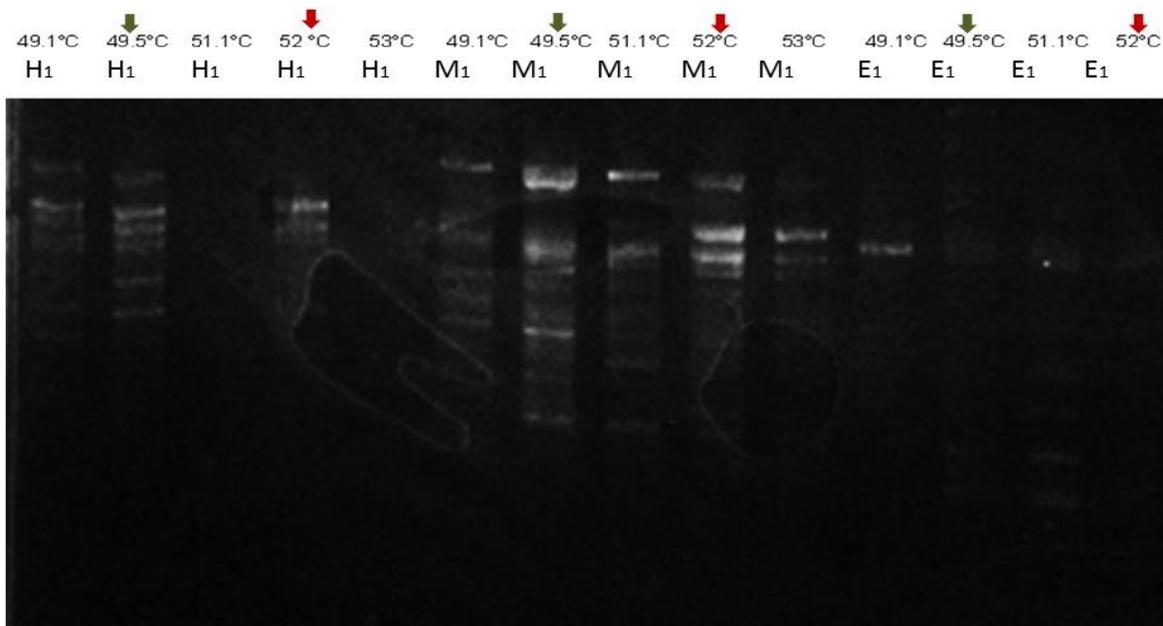


Figura 3.3. Optimización de temperaturas para el iniciador W814. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).

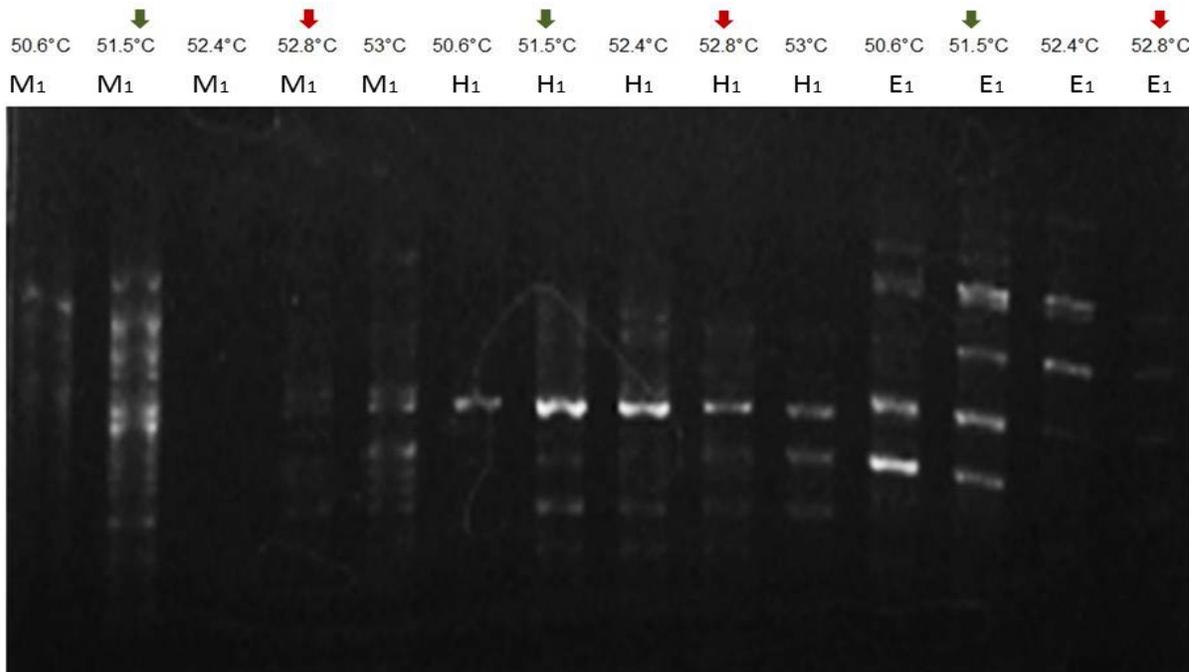


Figura 3.4. Optimización de temperaturas para el iniciador W844. Hembra (H), macho (M) y espárrago (E).

Una vez que se obtuvieron las temperaturas óptimas, se procedió a detectar polimorfismo en nuestra muestra de *D. cedrosanum*. Para ello fue necesario utilizar nuevamente la técnica de la PCR (Cuadro 3.3). En este cuadro se muestra el nombre de cada iniciador, seguido de las temperaturas programadas y el período de tiempo para cada una de estas; esto se llevó al cabo en cuatro pasos. En los pasos 2 y 3 se incluyeron las temperaturas de alineación optimizadas (en negritas) en cada iniciador.

Cuadro 3.3. Programas de PCR para los iniciadores ISSR.

BEC	Paso 1	Paso 2			Paso 3			Paso 4
	Desnaturalización inicial	35 ciclos			1 ciclo			Almacenamiento
Temperatura (°C)	94.0	94.0	53.0	72.0	94.0	53.0	72.0	4.0
Tiempo (minutos)	1:30	0:40	0:45	1:30	0:45	0:45	5:00	∞

DAT	Paso 1	Paso 2			Paso 3			Paso 4
	Desnaturalización inicial	35 ciclos			1 ciclo			Almacenamiento
Temperatura (°C)	94.0	94.0	52.5	72.0	94.0	52.5	72.0	4.0
Tiempo (minutos)	1:30	0:40	0:45	1:30	0:45	0:45	5:00	∞

W814	Paso 1	Paso 2			Paso 3			Paso 4
	Desnaturalización inicial	35 ciclos			1 ciclo			Almacenamiento
Temperatura (°C)	94.0	94.0	49.5	72.0	94.0	49.5	72.0	4.0
Tiempo (minutos)	1:30	0:40	0:45	1:30	0:45	0:45	5:00	∞

W844	Paso 1	Paso 2			Paso 3			Paso 4
	Desnaturalización inicial	35 ciclos			1 ciclo			Almacenamiento
Temperatura (°C)	94.0	94.0	51.5	72.0	94.0	51.5	72.0	4.0
Tiempo (minutos)	1:30	0:40	0:45	1:30	0:45	0:45	5:00	∞

Pruebas de diversidad

Con base en las temperaturas óptimas obtenidas para cada iniciador, fue posible llevar al cabo las pruebas de capacidad de detección de diversidad en plantas de *D. cedrosanum*. Para estas pruebas se usó material genético (DNA) de plantas individuales (Cuadro 3.4) y se probaron con cada uno de los cuatro iniciadores mediante el uso de la PCR (Cuadro 3.3). Del total de las plantas hembras y machos

10 de 14 se probaron con los cuatro iniciadores (Cuadro 3.4), mientras que las últimas cuatro solo se usaron con el iniciador W814, ya que el DNA disponible de las primeras muestras se terminó. Por tal motivo para la preparación del cóctel de PCR se usaron cuatro muestras más de plantas hembras y machos diferentes al resto, para cubrir con el total de 10 plantas y de esa manera poder hacer comparaciones entre iniciadores.

Cuadro 3.4. Plantas de *D. cedrosanum* usadas con cada iniciador ISSR.

ID Laboratorio	ID Campo	Iniciadores	ID Laboratorio	ID Campo	Iniciadores
H1	UA2011-32-1	BEC DAT,W844 y W814	M1	UA2010-37-1	BEC DAT,W844 y W814
H2	UA2011-35-1	BEC DAT,W844	M2	UA2010-15-1	BEC DAT,W844
H3	UA2010-30-1	BEC DAT,W844 y W814	M3	UA2010-16-1	BEC DAT,W844 y W814
H4	UA2011-3-1	BEC DAT,W844 y W814	M4	UA2010-17-1	BEC DAT,W844 y W814
H5	UA2010-27-1	BEC DAT,W844	M5	UA1027	BEC DAT,W844
H6	UA2011-44-1	BEC DAT,W844 y W814	M6	UA2010-26-1	BEC DAT,W844 y W814
H7	UA2011-05-1	BEC DAT,W844	M7	UA2010-28-1	BEC DAT,W844
H8	UA2011-45-1	BEC DAT,W844 y W814	M8	UA2010-29-1	BEC DAT,W844 y W814
H9	UA2010-12-1	BEC DAT,W844	M9	UA2011-2-1	BEC DAT,W844
H10	UA2011-39-1	BEC DAT,W844 y W814	M10	UA2010-32-1	BEC DAT,W844 y W814
H11	UA2011-28-1	W814	M11	UA2011-9-1	W814
H12	UA2011-30-1	W814	M12	UA2011-23-1	W814
H13	UA2010-22-1	W814	M13	UA2011-17-1	W814
H14	UA2011-10-1	W814	M14	UA2011-30-1	W814

Análisis estadístico

Por cada iniciador se construyó una matriz binaria donde 0 es ausencia de banda, 1 es presencia de banda y NA es dato perdido, es decir cuando no se logró identificar la presencia o ausencia de una banda. La matriz estuvo compuesta de 22 columnas. En la primera columna se anotó el número de locus, en la segunda su tamaño de banda y en las 20 restantes se colocaron los datos binarios para 10 plantas hembras

y 10 machos. El número de filas correspondió al total de loci polimórficos.

Con los datos obtenidos en las matrices se estimaron dos parámetros: la entropía de Shannon y el índice de Gini–Simpson, descritos detalladamente por Reyes-Valdés, (2013) y adecuados para detectar diversidad entre genotipos.

La entropía de Shannon está dada en unidades de bits y se interpreta como la información disponible para distinguir entre individuos de la población. Para una variable discreta se define como:

$$H(M) = -\sum_{i=1}^g p_i \log_2 p_i,$$

Donde p_1, p_2, \dots, p_g son probabilidades asignadas a los posibles valores de m_1, m_2, \dots, m_g de una variable aleatoria M . Para g valores posibles de una variable aleatoria discreta, el valor máximo de entropía de Shannon es $\log_2(g)$, cuando $p_1 = p_2 = \dots = p_g$, mientras que el mínimo es 0 para cualquier $p_i = 1$.

El índice de Gini–Simpson se interpreta como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la población tengan genotipos diferentes y se define como:

$$GS = 1 - \sum_{i=1}^g p_i^2,$$

Donde p_i es la frecuencia del i -ésimo genotipo, con g genotipos diferentes.

Los datos obtenidos de las matrices fueron analizados en el lenguaje y ambiente estadístico R (R Core Team, 2013) y se utilizó un script desarrollado por Humberto Reyes Valdés.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de temperaturas de alineación

Las temperaturas óptimas de alineación obtenidas para los cuatro iniciadores que se utilizaron en *D. cedrosanum* se muestran en el Cuadro 4.1, junto con las indicadas por Sica, Gamba *et al.*, (2005) para espárrago. Como se puede apreciar en dicho cuadro todos los iniciadores amplificaron a temperaturas de alineación menores a las reportadas en espárrago. El iniciador con temperatura de alineación más baja fue W814. Esto se debe a las diferencias entre el genoma del sotol y del espárrago, y a las condiciones técnicas específicas del laboratorio donde se hizo la optimización.

Cuadro 4.1. Iniciadores ISSR usados y sus temperaturas de alineación en *A. acutifolius* (Sica, Gamba *et al.*, 2005) y las obtenidas para *D. cedrosanum*.

Iniciador	Espárrago TA (°C)	Sotol TA (°C)
BEC	54.0	53.0
DAT	54.0	52.5
W814	52.0	49.5
W844	52.8	51.5

TA=Temperatura de Alineación

Identificación de polimorfismos

En las Figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4, se muestran los patrones electroforéticos para dos geles por iniciador. El primer gel corresponde a los primeros trece carriles y el segundo gel corresponde a los últimos siete carriles. Es por ello que no se observa una secuencia progresiva de etiquetas en las muestras.

En la Figura 4.1 se muestran los patrones electroforéticos para el iniciador BEC. Los carriles presentan 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). De las 20 plantas 19 generaron patrones. La excepción fue la planta M10 (ID Campo: UA2011-39-1) en la cual no se observó amplificación, debido probablemente a algún problema técnico.

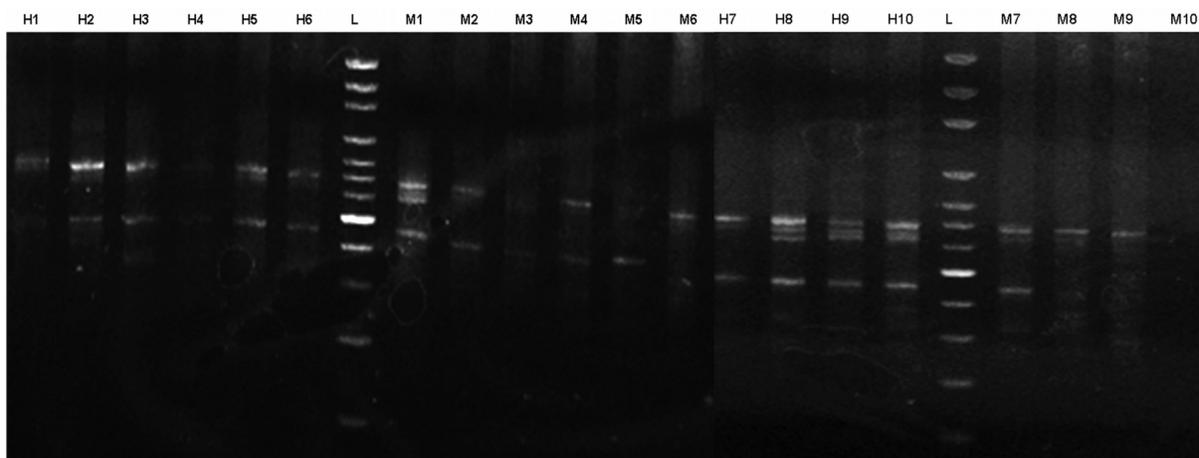


Figura 4.1 Resultados de la amplificación con el iniciador BEC en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.

En la Figura 4.2 se muestran los patrones electroforéticos para el iniciador DAT. Un total de 18 muestras presentaron patrones electroforéticos, mientras que para las plantas H10 y M7 no se mostró amplificación; esto pudo deberse a problemas técnicos.

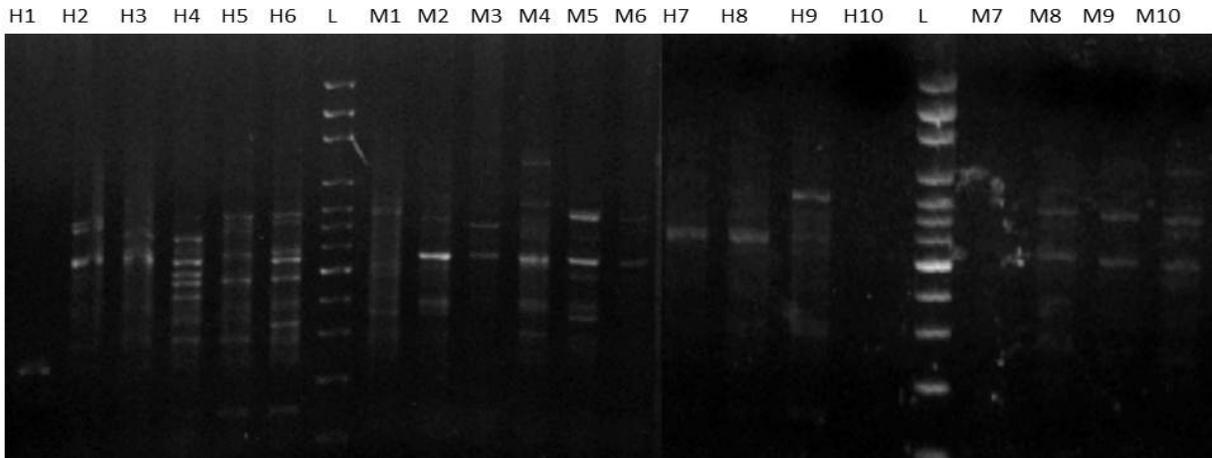


Figura 4.2. Resultados de la amplificación con el iniciador DAT en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.

En la Figura 4.3 se presentan los patrones electroforéticos del marcador ISSR W814. Para este iniciador se usaron cuatro plantas hembra y cuatro plantas macho diferentes al resto del grupo (Cuadro 3.4). En el segundo gel (últimos siete carriles) están ubicadas estas plantas. De las veinte muestras sólo una no mostró amplificación (M1). Esto pudo deberse a problemas técnicos.

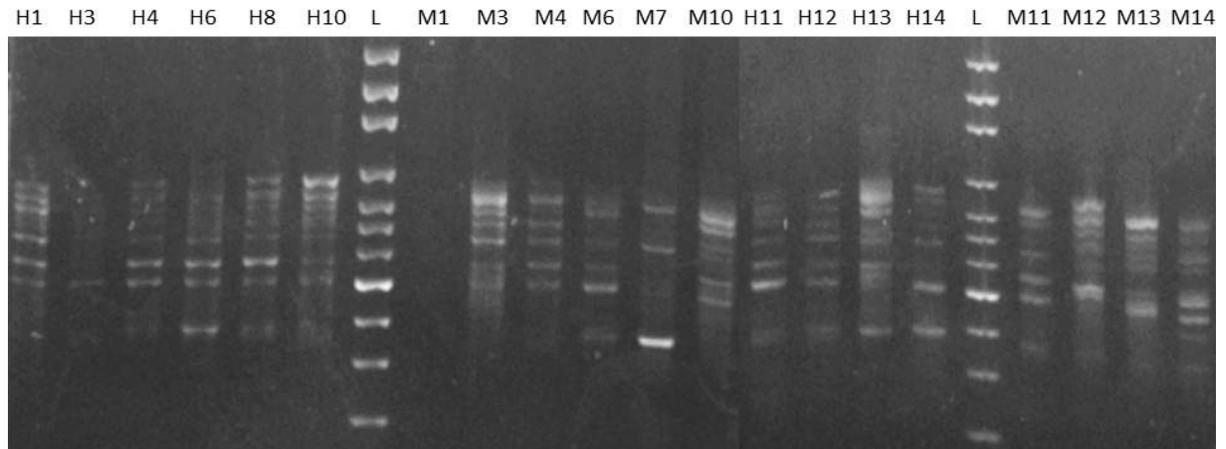


Figura 4.3. Resultados de la amplificación con el iniciador W814 en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.

La Figura 4.4 revela los patrones electroforéticos del iniciador W844. Para este iniciador al igual que BEC y DAT se usaron las primeras 10 plantas hembra y 10 plantas macho de manera individual para las muestras. En las muestras M3 y M6 se dificultó visualizar la presencia de patrones electroforéticos.

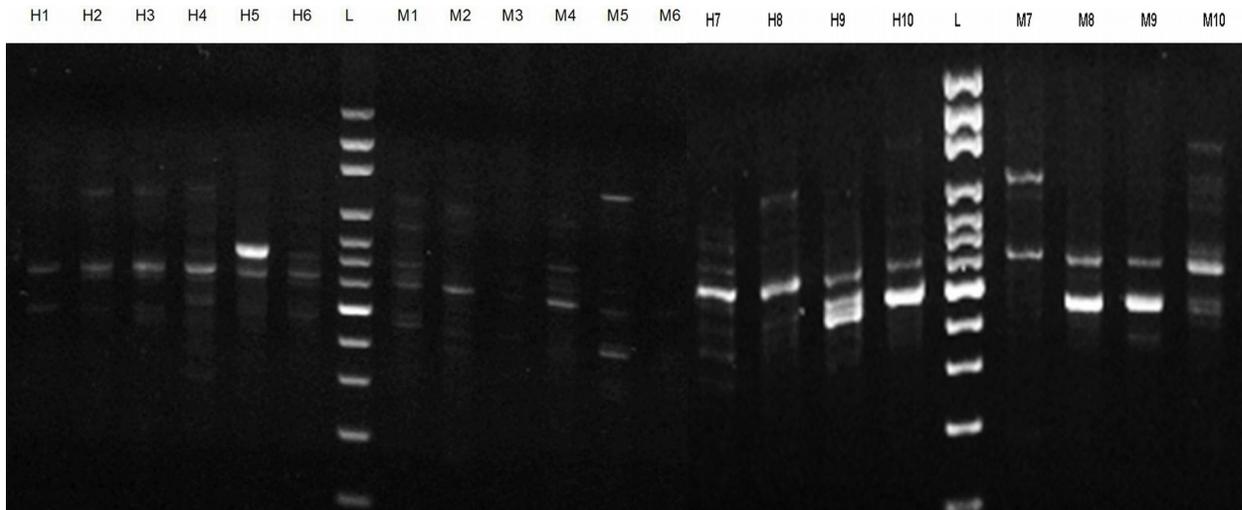


Figura 4.4. Resultados de la amplificación con el iniciador W844 en 10 plantas hembra (H) y 10 plantas macho (M). L representa el marcador de tamaño.

Codificación de los resultados

En el Cuadro 4.2 se presentan las matrices de codificación binaria de los patrones electroforéticos para cada marcador ISSR.

Cuadro 4.2. Matriz de codificación de bandas para cada marcador ISSR en plantas de sotol.

Marcador ISSR BEC																					
Locus	T	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
1	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
2	675	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	NA	0
3	625	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4	450	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	NA	0	0
5	325	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Marcador ISSR DAT																					
Locus	T	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
1	1250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
3	800	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	NA	0	0	1
4	725	0	1	NA	0	1	1	0	0	1	0	NA	1	1	NA	0	NA	0	0	0	0
5	650	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
6	550	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
7	500	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
8	475	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	400	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	NA	0	0	0	0	0
10	350	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
11	325	0	0	0	1	NA	NA	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
12	300	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
13	275	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Marcador ISSR W814																					
locus	T	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
1	950	1	0	NA	0	1	1	0	NA	NA	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	850	1	0	NA	NA	1	1	0	NA	NA	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0
3	800	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA	1	NA	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1
4	700	0	0	0	0	NA	NA	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	NA	NA	NA
5	690	1	0	NA	1	NA	NA	NA	0	NA	0	0	1	1	NA	0	1	1	NA	NA	NA
6	600	1	0	1	1	1	NA	1	0	NA	0	0	NA	1	1	0	NA	0	0	0	NA
7	500	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	1	0	1	1	NA	0	1	1	1	NA	1
8	450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	450	0	0	0	1	1	NA	NA	NA	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	NA	NA

Continuación del Cuadro 4.2.

Marcador ISSR W844																					
Locus	T	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
1	1500	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	NA	0	0	0	1	0	0	0	0	1
2	1250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
3	1000	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	NA	0	1	0	0	0	0	0	1
4	750	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	NA	0	1	1	0	0	0	0	1
5	650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	0	0	1	0	0	1	0	0	1
6	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
7	500	0	0	0	NA	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
8	475	1	NA	1	NA	0	NA	1	0	1	0	1	1	1	NA	1	0	0	0	0	0
9	425	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	325	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

T = Tamaño en pares de bases, NA = dato perdido, H = hembra y M = macho

Medidas de diversidad

Análisis del marcador ISSR BEC

Con base en el análisis de polimorfismo, el marcador BEC en promedio tiene valores altos de entropía e índice de Gini-Simpson (Cuadro 4.3), sin embargo sólo generó 5 loci polimórficos. El locus 3 con 625 pb, mostró los valores más altos de diversidad con 0.99 y 0.50 de entropía e índice de Gini-Simpson, en contraparte el locus 1 presentó los valores más bajos de diversidad con 0.57 y 0.24 respectivamente para entropía e índice de Gini-Simpson. Bajo la suposición de loci independientes, con este marcador se espera tener un valor global de entropía de 3.90 el cual es relativamente bajo. El valor resultó de multiplicar la media de entropía por el total de loci. En general los valores de diversidad para los loci de este marcador tendieron a ser uniformes.

Cuadro 4.3. Estadísticas de diversidad para el marcador BEC.

Locus	Tamaño	Entropía	GS
1	700	0.57	0.24
2	675	0.83	0.39
3	625	0.99	0.50
4	450	0.83	0.39
5	325	0.68	0.30
Media		0.78	0.36

GS = Índice de Gini-Simpson

Análisis del marcador ISSR DAT

El marcador DAT en el Cuadro 4.4, mostró tener el mayor número de loci polimórficos (14). Sin embargo en promedio fue uno de los que presentaron los valores más bajos de diversidad, como es el caso del locus 1 con 0.28 y 0.09 respectivamente para entropía e índice de Gini-Simpson, mientras que los valores más altos lo presentó el locus 6 con 0.99 y 0.50 de entropía e índice de Gini-Simpson. Bajo la suposición de loci independientes, el valor global esperado de entropía con este marcador es de 9.24, lo cual resulta ser un valor alto para diferenciar los individuos de la población. El valor se obtuvo de la multiplicación del total de loci por la media de entropía. De manera general los valores de diversidad para los loci de este marcador resultaron ser contrastantes.

Cuadro 4.4. Estadísticas de diversidad para el marcador DAT.

Locus	Tamaño	Entropía	GS
1	1250	0.28	0.09
2	850	0.28	0.09
3	800	0.93	0.45
4	725	0.98	0.49
5	650	0.90	0.43
6	550	0.99	0.50
7	500	0.95	0.46
8	475	0.44	0.17
9	400	0.76	0.34
10	350	0.68	0.30
11	325	0.65	0.28
12	300	0.68	0.30
13	275	0.44	0.17
14	200	0.28	0.09
Media		0.66	0.30

GS = Índice de Gini-Simpson

Análisis del marcador ISSR W814

El marcador W814 tuvo loci con los valores más altos de diversidad, con 1 y 0.50 respectivamente para entropía e índice de Gini-Simpson (Cuadro 4.5, loci 2, 5 y 6). Los valores más bajos los presentó el locus 8 con 0.28 y 0.09 de entropía e índice de Gini-Simpson. De los nueve loci polimórficos siete presentaron valores de diversidad por encima de la media con 0.87 y 0.42 respectivamente para entropía e índice de Gini-Simpson. Bajo la suposición de loci independientes, el valor global esperado de entropía con este marcador es de 7.83 (9×0.87), el cual es relativamente alto. En general los loci para este marcador tienden a valores similares de diversidad.

Cuadro 4.5. Estadísticas de diversidad para el iniciador W814.

locus	Tamaño	Entropía	GS
1	950	0.92	0.44
2	850	1.00	0.50
3	800	0.98	0.49
4	700	0.98	0.49
5	690	1.00	0.50
6	600	1.00	0.50
7	500	0.74	0.33
8	450	0.28	0.09
9	400	0.93	0.45
Media		0.87	0.42

GS = Índice de Gini-Simpson

Análisis del marcador ISSR W844

El marcador W844 reveló 10 loci polimórficos (Cuadro 4.6). Cinco de ellos se encuentran por encima de la media y cinco se encuentran por debajo de la media. El locus 8 presentó los valores más altos de diversidad con 1 y 0.50 de entropía e índice de Gini-Simpson; mientras que los loci 6 y 10 mostraron los valores más bajos de diversidad con 0.44 y 0.17 respectivamente para entropía e índice de Gini-Simpson. La entropía global de este marcador si se asume independencia entre marcadores es de 7.72 el cual es relativamente alto. El valor resultó del producto del total de loci por la media de entropía. En general el marcador W844 tendió a valores diferentes de diversidad para los loci.

Cuadro 4.6. Estadísticas de diversidad para el iniciador W844.

Locus	Tamaño	Entropía	GS
1	1500	0.89	0.42
2	1250	0.68	0.30
3	1000	0.76	0.34
4	750	0.97	0.48
5	650	0.67	0.29
6	600	0.44	0.17
7	500	0.93	0.45
8	475	1.00	0.50
9	425	0.67	0.29
10	325	0.44	0.17
Media		0.74	0.34

GS = Índice de Gini-Simpson

El marcador DAT mostró la máxima entropía global (9.24) y el máximo número de loci polimórficos (14). En contraparte el marcador BEC mostró la mínima entropía global (3.91) y el mínimo número de loci polimórficos (5). El marcador W814 generó un valor global relativamente alto para entropía (7.83) y generó 9 loci polimórficos. A su vez el marcador W844 obtuvo mayor número de loci (10) que BEC y W814, con una

entropía global de 7.4 el cual resulta ser un valor alto en comparación con el valor para BEC.

El marcador DAT, aunque con loci de menor diversidad promedio, resultó ser el mejor ya que el valor global de entropía es alto (9.24). El marcador BEC aun cuando comprende loci de alta diversidad, su bajo número de polimorfismos arrojan una entropía global muy baja, de 3.91. A su vez el marcador W814 para diferenciar individuos de la población resulta ser el segundo marcador ya que comprende loci de alta diversidad, con un valor de entropía global relativamente alto (7.8) en comparación con el marcador BEC. El marcador W844 resulta ser el tercer marcador con 7.4 de entropía global.

Los resultados obtenidos en éste trabajo nos permiten tener una base más para estudios posteriores con plantas de sotol y con ello hacer inferencias sobre la diversidad que hay dentro y entre poblaciones y realizar estudios de estructura poblacional.

De acuerdo con la experiencia en el laboratorio la repetibilidad de la técnica de ISSR depende fundamentalmente de: (i) Tener una concentración uniforme en las muestras de DNA con las que se estén trabajando, (ii) Calibración de micropipetas con las que se extrae el DNA, iniciador y la Taq&Go para la preparación de la reacción, de lo contrario puede dar un volumen erróneo, (iii) Colocar la cantidad exacta de DNA, iniciador y Taq&Go en el tubo eppendorf al momento de estar preparando el cóctel para la PCR, ya que si por error se coloca mayor o menor cantidad de la que se requiere se afectarán los patrones electroforéticos, (iv) La contaminación en el momento de estar preparando las reacciones es otro factor que puede impedir obtener el mismo resultado con los marcadores ISSR, por ello es importante trabajar en condiciones asépticas y con material estéril, (v) La degradación de los productos de la PCR puede interferir en la repetibilidad, por lo cual no debe pasar mucho tiempo entre la reacción de PCR y la electroforesis.

CONCLUSIONES

Los marcadores ISSRs son una muy buena alternativa para estudios de diversidad en sotol, ya que no se requiere información *a priori* de la secuencia del genoma.

Los iniciadores BEC, DAT, W814 y W844, para marcadores genéticos ISSR probados en *D. cedrosamum*, amplificaron a temperaturas de alineación menores a las reportadas por Sica, Gamba *et al.*, (2005) en espárrago.

Los resultados obtenidos en el análisis de diversidad con los marcadores ISSR arrojaron datos estadísticos que muestran al marcador ISSR DAT como posiblemente el mejor para estudios de diversidad genética en *D. cedrosanum*, seguido de los marcadores ISSR W814 e ISSR W844.

El marcador ISSR BEC mostró un valor global de entropía muy bajo. Los marcadores generaron patrones electroforéticos en la mayoría de las muestras de sotol. La diversidad genética observada entre plantas es compatible con la reproducción cruzada obligada en el género *Dasyilirion*.

BIBLIOGRAFÍA

- Bogler, D. J. (1998). Three new species of *Dasyllirion* (Nolinaceae) from Mexico and a clarification of the *D. longissimum* Complex. *Brittonia*, 50(1), 71. doi:10.2307/2807720
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. y Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–31. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686077&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Brown, A. H. (1978). Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 52(4), 145–57. doi:10.1007/BF00282571
- Cano-Pineda, A. y Martínez-Burciaga, O. U. (2007). Determinación de áreas potenciales para el establecimiento de plantaciones de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.) en el estado de Coahuila. *INIFAP-CIRNE*, 31, 48. Retrieved from <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/183.pdf>
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants (p. 1262). Columbia University Press. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=EB6qflbmcrcwC&pgis=1>
- Cruz-López, H. F. (2011). Efecto en la capacidad fisiológica en semillas de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.), con aplicación de bioreguladores. Tesis Licenciatura en Agrobiología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo Coah.

- Cruz-Requena, M., De La Garza-Toledo, H., Aguilar-González, C. N., Aguilera-Carbó, A., Reyes-Valdés, H., Rutiaga, M. y Rodríguez-Herrera, R. (2013). Chemical and molecular properties of sotol plants (*Dasyilirion cedrosanum*) of different sex and its fermentation products. *International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences*, 3(1), 41–49. Retrieved from http://www.cibtech.org/J_CHEMICAL_SCIENCES/PUBLICATIONS/2013/Vol_3_No_1/05-009...Marisol...Chemical...Products...41-49.pdf
- Culley, T. M. y Wolfe, A. D. (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86(5), 545–556. doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00875.x
- De La Garza-Toledo, H., Martínez, M., Lara, L., Rodríguez-Herrera, R Rodríguez-Martínez, J. y Aguilar, C. N. (2008). Production of a mexican alcoholic beverage: sotol. *Research Journal of Biological Sciences*, 3(6), 566–571. Retrieved from <http://www.medwelljournals.com/abstract/?doi=rjbsci.2008.566.571>
- Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S. E., Shin, H. S., Friedman, J., Dracopoli, N. L. y Lander, E. S. (1992). A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, 131(2), 423–447. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/131/2/423.short>
- DOF, Diario Oficial de la Federación. (2004). Norma oficial mexicana del sotol NOM-159-SCFI-2004. México. Retrieved from <http://www.aduanas-mexico.com.mx/claa/ctar/normas/nm159asc.htm>
- González, A. y Aguirre, X. (2007). Inter simple sequence repeats (ISSR's). In: SEMARNAT (Instituto Nacional de Ecología, México) y CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México). In L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (IEPSA, Méx., Vol. 6, pp. 567–571.). Instituto Nacional de Ecología. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=KT7YILvV6YMC&pgis=1>

- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Sherman, B. y Susan, L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *In: Population genetics of forest trees. Springer Netherlands, 42*, 95–124. doi:10.1007/978-94-011-2815-5
- Hernández-Quintero, J. de D. (2012). Estudio cromosómico y de la estructura de la proporción de sexos en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*). Tesis Maestro en Ciencias en Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah.
- Herrera-Ramírez, E. B. Rodríguez-Herrera, R., Noe-Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. H. y De la Garza-Toledo, H. (2006). SOTOL: un planta con PASADO, PRESENTE y FUTURO. *Ciencia Cierta, 2*(5).
- IMPI, Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual. (2002). Declaratoria general de protección de la denominación de origen “sotol.” México. Retrieved from http://www.wipo.int/wipolex/en/text.jsp?file_id=220963
- Jaccoud, D. (2001). Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research, 29*(4), 25e–25. doi:10.1093/nar/29.4.e25
- Jordan, S. A. y Humphries, P. (1994). Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31 - q35. *Human Molecular Genetics, 3*(10), 1915–1915. doi:10.1093/hmg/3.10.1915
- Karp, A. (1996). Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany, 78*(2), 143–149. doi:10.1006/anbo.1996.0106
- Krueger, R. R. y Roose, M. L. (2003). Use of molecular markers in the management of citrus germplasm resources. *J. Amer. Soc. Hort. Sci., 128*(6), 827–837. Retrieved from <http://journal.ashspublications.org/content/128/6/827.short>
- López et al. (1995). Técnica de extracción de DNA. *Molec. Genomic. Genetic*. Modificado por Hernández, G. F. 2008. (247), 603–613.
- López-Barbosa, L. A. (2005). El sotol en coahuila, potencialidades y limitaciones. *In*

- C. C. Delgado y I. R. Ortega (Eds.), *Bebidas y regiones: historia e impacto de la cultura etílica en México* (pp. 63–84). Mexico: Plaza y Valdes. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=N69XIPt_Pe8C&pgis=1
- Maroof, M. A. S., Allard, R. W. y Zhang, Q. F. (1990). Genetic diversity and ecogeographical differentiation among ribosomal DNA alleles in wild and cultivated barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(21), 8486–8490. doi:10.1073/pnas.87.21.8486
- McKusick, V. A. y Ruddle, F. H. (1987). A new discipline, a new name, a new journal. *Genomics*, *1*(1), 1–2. Retrieved from <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.genom.7.080505.115749>
- Olhagaray-Rivera, Eduardo C. Esparza-Chávez, G. y Vega-Sotelo, F. (2012). Nota técnica producción y comercialización de licores sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) en Durango, Coah. México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. Retrieved from <http://ibsa.mx/~inifap4/index.php/Forestales/article/view/57>
- Paran, I. y Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, *85*(8), 985–93. doi:10.1007/BF00215038
- Primack, R. B. (1993). *Essentials of conservation biology* (p. 564). Sinauer Associates. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=3UTwAAAAMAAJ&pgis=1>
- R Core Team. (2013). R: a language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*. doi:<http://www.R-project.org>.
- Rallo, P., Belaj, A., De La Rosa, R. y Trujillo, I. (2002). *Marcadores moleculares*. Cordoba, España.
- Rao, V. R. y Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *68*(1), 1–19. doi:10.1023/A:1013359015812

- Reyes-Valdés, M. H. (2013). Informativeness of microsatellite markers. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1006, 259–70. doi:10.1007/978-1-62703-389-3_18
- Reyes-Valdés, M. H., Benavides-Mendoza, A., Ramírez-Rodríguez, H. y Villarreal-Quintanilla, J. Á. (2012). Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion* spp). Parte I: sistemática, genética y reproducción. *Planta*, 14(7), 11–13. Retrieved from <http://www.fcb.uanl.mx/www/images/planta-no17.pdf#page=16>
- Sato, D. (1935). Analysis of the karyotypes in yucca, agave and the related genera with special reference to the phylogenetic significance. *The Japanese Journal of Genetics*, 11(5), 272–278. doi:10.1266/jjg.11.272
- Saxena, S., Chandra, R., Srivastava, A. P., Mishra, M., Pathak, R. K. y Ranade, S. A. (2005). Analysis of genetic diversity among papaya cultivars using single primer amplification reaction (SPAR) methods. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80(3), 291–296. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16781264>
- Sharma, P., Sharma, V. y Kumar, V. (2014). Genetic diversity analysis of cluster bean [*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub] genotypes using RAPD and ISSR markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(2), 433–443. Retrieved from http://jast.modares.ac.ir/article_10508_16.html
- Sica, M., Gamba, G., Montieri, S., Gaudio, L. y Aceto, S. (2005). ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genetics*, 6(1), 17. doi:10.1186/1471-2156-6-17
- Sierra-Tristán, S. J., Royo-Marquez, C., Morales-Nieto, R., Mendoza-Castillo, A., Carrillo-Romo, R. L. y Lara-Macías, C. R. (2008). Los sotoles *Dasyilirion* spp de Chihuahua. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/2406>
- Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, (60), 73–76.

- Standley, P. C. (1922). Trees and shrubs of Mexico. *Gliricidia*. *Contributions from the U.S. National Herbarium.*, 23(2), 482–483. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20057002297.html;jsessionid=4009F6C03002C82ACF54F0703B16BBC5>
- USDA, ARS. (2014). National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)*. Retrieved from <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genusfamfind.pl>
- Valdés-Infante, J., Rodríguez-Medina, N. N., Velasquez, B., Rivero, D., Martínez, F., Risterucci, A.-M. y Rohde, W. (2010). Comparison of the polymorphism level, discriminating capacity and informativeness of morpho-agronomic traits and molecular markers in guava (*Psidium guajava* L.). *Acta Horticulturae*, 121–131. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=23649851>
- Villarreal-Quintanilla, J. Á. (2001). Flora de Coahuila (p. 138). UNAM. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=k6RkjAuRR2YC&pgis=1>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. van de, Hornes, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. doi:10.1093/nar/23.21.4407
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535. doi:10.1093/nar/18.22.6531
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–83. doi:10.1006/geno.1994.1151