

**DIVERSIDAD GENÉTICA EN SOTOL (*Dasyilirion cedrosanum*) A TRAVÉS DE  
MARCADORES MOLECULARES AFLP Y COMPARACIÓN ENTRE  
PLANTAS ESTAMINADAS Y PISTILADAS**

**Yonis Alberto Morales Reyes**

**Tesis**

**Presentada como requisito parcial para  
Obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN FITOMEJORAMIENTO**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre de 2014**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**DIVERSIDAD GENÉTICA EN SOTOL (*Dasyllirion  
cedrosanum*) A TRAVÉS DE MARCADORES  
MOLECULARES AFLP Y COMPARACIÓN ENTRE  
PLANTAS ESTAMINADAS Y PISTILADAS**

**T E S I S**  
**YONIS ALBERTO MORALES REYES**

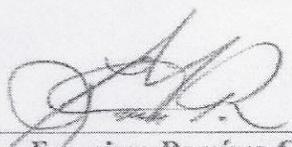
Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como  
requisito parcial para optar al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO**  
**COMITÉ PARTICULAR**

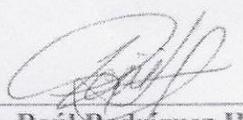
**Asesor Principal:**

  
Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

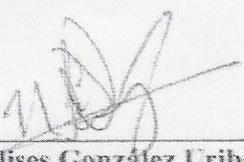
**Asesor:**

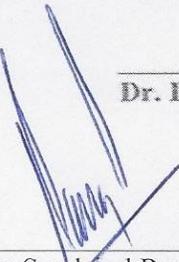
  
Dra. Francisca Ramírez Godina

**Asesor:**

  
Dr. Raúl Rodríguez Herrera

**Asesor:**

  
Dr. Dino-Ulises González Uribe

  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila, México, Diciembre, 2014

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Humberto Reyes por permitirme participar en el proyecto Sotol y a todo el comité de asesores Dra. Francisca Ramírez Godina, Dr. Raúl Rodríguez Herrera y el Dr. Dino Ulises González Uribe por su contribución en el desarrollo y revisión de esta investigación.

En especial al Dr. José Espinoza por su valiosa orientación y esfuerzos brindados que hicieron posible el ingreso, continuidad y culminación de mis estudios en el Departamento de Fitomejoramiento.

Al Dr. Humberto de León por compartir su sabiduría en el área del Fitomejoramiento y por su voto de confianza en mis capacidades profesionales obtenidas al finalizar la maestría.

A Dulce Mendoza por su valiosa contribución en la capacitación y colaboración en aplicar las técnicas de laboratorio básicas para el desarrollo de esta investigación.

A Marisol Requena por la orientación en la práctica de AFLP y por su incansable voluntad de colaboración que contribuyeron en gran medida a la culminación de este trabajo de investigación.

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado que hizo posible esta invaluable oportunidad de crecimiento profesional y personal.

El presente trabajo fue financiado por el gobierno mexicano a través del proyecto SEP-CONACYT de Investigación Científica Básica clave 154682.

## **DEDICATORIA**

### **A MIS PADRES**

Pablo Morales Velásquez y Juana Francisca Reyes

### **A MI ESPOSA E HIJA**

Sonia Lizzeth Solís Oro y Yohani Sofía Morales Solís quienes son mi fortaleza y fuente de amor e inspiración.

### **A MIS HERMANOS Y FAMILIARES**

**Diversidad genética en sotol (*Dasyllirion cedrosanum*) a través de marcadores  
moleculares AFLP y comparación entre plantas estaminadas y pistiladas**

**POR**

**YONIS ALBERTO MORALES REYES**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. 2014**

**Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés**

**RESUMEN**

El Sotol (*Dasyllirion spp.*) es una planta nativa de las tierras semiáridas del Norte de México que se extiende al suroeste de Estados Unidos. La planta es perenne, policárpica y semicilíndrica grande, dioica, perennifolia, tallo corto con una inflorescencia o escapo de 1.5 a 5.5 metros de altura, tolerante a la sequía y temperaturas, pertenece a la familia de las Asparagaceae. Actualmente es la base de la industria especializada en producción de “sotol”. Este sector productivo carece de estudios de diversidad genética y capacidad reproductiva de las poblaciones que son parámetros útiles para definir aprovechamientos sustentables. El presente trabajo tuvo por objetivos estimar la diversidad genética a través de marcadores moleculares AFLP, implementar la técnica ISSR y validar

marcadores y proporciones entre sexos. Para esto fueron evaluados grupos de 40 y 400 individuos respectivamente, todos provenientes de cinco poblaciones distribuidas entre Coahuila y Zacatecas, México. Se extrajo DNA para las técnicas AFLP e ISSR. Para los AFLPs se utilizaron los iniciadores M-CTG, E-AAC y E-AGG mientras que para ISSR los iniciadores fueron OH, W7, 3 y W902. Estos últimos fueron optimizados inicialmente en dos compuestos de DNA (10 hembras y 10 machos) y validados en 20 plantas. De los geles obtenidos se construyeron matrices binarias de presencia y ausencia de bandas para hacer el análisis de diversidad. Se aplicó la prueba exacta de Fisher para evaluar asociación significativa entre marcadores y el sexo, mientras que la prueba de chi cuadrada se utilizó para analizar las proporciones de sexos en la floración de 2010 a 2013. Para el análisis genético concluyente no se consideró el gel a 800 nm y fue eliminada la localidad de San Miguel, ambos por presentar problemas en la amplificación. El análisis reveló una diversidad genética de Nei entre 0.01476 y 0.10502 con carencia de estructura ( $F_{st} = 0.0071$ ) como evidencia que las poblaciones forman una mega población con presencia de diversidad genética y ausencia de bandas asociadas al sexo. Se optimizaron cuatro iniciadores ISSR y se encontró que el ISSR-OH es el más apropiado para estimar diversidad genética. Se observó un desajuste global en la relación a la proporción 1:1 entre sexos con sesgo hacia las hembras en las poblaciones.

**Palabras clave:** *Dasyllirion cedrosanum*, marcadores AFLP, marcadores ISSR, diversidad genética, proporción de sexos.

## ABSTRACT

The Sotol (*Dasyilirion spp.*) is a plant native to the arid lands of Northern Mexico that extends to the southwestern United States of America. The plant is perennial, large semicylindrical polycarpic, dioecious and evergreen, with a short stem or inflorescence stick 1.5 to 5.5 meters tall, drought temperature and tolerant and it belongs to the Asparagaceae family. It is currently the basis of the production of a liquor called "sotol". This productive sector lacks genetic diversity and reproductive potential studies. Which are useful parameters to define sustainable harvesting. The objectives of this study were to estimate genetic diversity through AFLP molecular markers, implementation of the ISSR technique and validation of markers and sex ratios. Groups of 40 and 400 individuals were evaluated respectively, all from five populations distributed in Coahuila and Zacatecas, Mexico. DNA was isolated for the AFLP and ISSR techniques. For the AFLP technique, primers M-CTG, E-AAC and E-AGG were used whereas for ISSR the primers were OH, W7, 3 and W902. The latter were initially optimized in two compounds of DNA (10 females and 10 males) and validated in 20 plants. From the electrophoresis gels binary matrices of presence and absence of band were constructed for diversity analysis. The Fisher's exact test was applied to assess significant association between markers and sex data, whereas chi square tests were applied to test sex ratios from 2010 to 2013 flowering years. For conclusive genetic analysis the gel at 800 nm was not considered, whereas the San Miguel location was eliminated, both showing amplification problems. The analysis revealed a Nei genetic diversity between 0.01476 and 0.10502, with lack of structure ( $F_{st} = 0.0071$ ) as evidence that the populations are part of a mega-population with presence of genetic diversity and

absence of bands associated with gender. Four ISSR primers were optimized, with the ISSR-OH being the most appropriate for estimating genetic diversity. A global departure from the 1:1 sex ratio of 1:1 was observed, with a bias toward female plants.

Keywords: *Dasyilirion cedrosanum*, AFLP markers, ISSR markers, genetic diversity, sex ratios.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general .....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. III. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
3.1 Taxonomía y distribución del sotol.....	5
3.2 Importancia socioeconómica del sotol.....	7
3.3 Dioecia en sotol.....	7
3.4 Diversidad genética.....	8
3.5 Estructura y flujo genético entre las poblaciones.....	10
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4.1 Población de sotol bajo estudio.....	11
4.2 Extracción de DNA.....	12
4.3 Marcadores moleculares AFLP.....	15
4.4 Análisis de diversidad genética entre y dentro de las poblaciones.....	19
4.5 Pruebas de asociación entre marcadores AFLP y el sexo.....	21
4.6 Inter secuencias simples repetidas (ISSR) en sotol.....	22
4.7 Proporciones de sexos en poblaciones de sotol.....	27
4.8 Análisis de distribución espacial entre sexos.....	29
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
5.1 Datos generales del análisis de diversidad genética con AFLP.....	30

5.2	Parámetros y estadísticos de diversidad genética.....	31
5.3	Diversidad genética promedio.....	32
5.4	Diversidad genética general y Estructura.....	33
5.5	Análisis de distancia y similaridad genética entre poblaciones.....	34
5.6	Análisis concluyente de diversidad genética con AFLP.....	35
5.7	Resultados de la prueba de asociación de AFLPs con el sexo.....	39
5.8.	Optimización de iniciadores ISSR en sotol.....	39
5.8.1	Exploración de marcadores ISSR candidatos asociados al sexo.....	42
5.9	Proporción de sexos en poblaciones de sotol.....	42
5.10	Análisis de distribución espacial entre sexos.....	44
VI.	CONCLUSIONES.....	50
VII.	LITERATURA CITADA.....	52

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 4.1 Coordenadas de las cinco localidades estudiadas.....	11
Cuadro 4.2 Coctel de amplificación selectiva para AFLP multiplex.....	17
Cuadro 4.3 Programa de PCR para amplificación selectiva en AFLP.....	17
Cuadro 4.4 Iniciadores ISSR y sus condiciones para PCR (Sica <i>et al</i> , 005)....	23
Cuadro 4.5 Condiciones base para optimizar la amplificación con iniciadores ISSR.....	24
Cuadro 4.6 Programa de PCR para amplificación de iniciadores ISSR.....	25
Cuadro 5.1 Parámetros y estadísticos de diversidad genética por población...	32
Cuadro 5.2 Diversidad genética promedio interpoblacional (Lynch y Milligan).....	33
Cuadro 5.3 Estructura genética de las cinco poblaciones (Lynch y Milligan, 1994).....	34
Cuadro 5.4 Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones.....	34
Cuadro 5.5 Matriz de distancia (sobre la diagonal) y similaridad genética de Nei (bajo la diagonal) entre poblaciones de sotol (Lynch y Milligan, 1994).....	35
Cuadro 5.6 Parámetros y estadísticos adicionales de diversidad genética por población.....	36
Cuadro 5.7 Estimación adicional de estructura genética en las cuatro poblaciones.....	37

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 5.8 Prueba de permutación adicional para diferenciación genética entre poblaciones.....	38
Cuadro 5.9 Segunda Matriz de distancia (sobre la diagonal) y similaridad genética de Nei (bajo la diagonal) entre poblaciones de sotol (Lynch y Milligan, 1994).....	38
Cuadro 5.10 Optimización de iniciadores ISSR en sotol.....	40
Cuadro 5.11 Registro de hembras y machos en floración de 2010 al 2013.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Área de distribución del sotol según Bogler (1994).....	6
Figura 4.1 Ubicación de las cinco poblaciones de sotol estudiadas.....	12
Figura 5.1 Patrón de bandas AFLP a 700 nm.....	30
Figura 5.2 Patrón de bandas AFLP a 800 nm.....	31
Figura 5.3 Patrón de bandas entre hembras y machos de sotol amplificadas con iniciador ISSR – OH.....	41
Figura 5.4 Patrón de bandas entre hembras y machos de sotol amplificadas con iniciador ISSR – W7.....	41
Figura 5.5 Proporción anual entre sexos en cuatro poblaciones de <i>Dasyilirion cedrosanum</i> .....	44
Figura 5.6 Distribución de plantas hembras y machos en la población de Buenavista.....	45
Figura 5.7 Distribución de plantas hembras y machos en la población de General Cepeda.....	46
Figura 5.8 Distribución de plantas hembras y machos en la población El Novillo.....	47
Figura 5.9 Distribución de plantas hembras y machos en la población de San Miguel.....	48
Figura 5.10 Distribución de plantas hembras y machos en la población de El Cañón de San Lorenzo.....	49

## I. INTRODUCCIÓN

El Sotol (*Dasyllirion spp.*) es una planta, perenne, policárpica y semicilíndricagrande, dioica, perennifolia, tallo corto con una inflorescencia o escapo de 1.5 a 2 metros de altura, tolerante a la sequía y temperaturas, y que pertenece a la familia de las Asparagaceae (WCSP, 2012). Esta se encuentra desde el Norte de México hasta el Suroeste de Estados Unidos. México cuenta con 16 especies principalmente distribuidas en las zonas áridas de Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas y Nuevo León. De las seis a siete especies que están en Coahuila, *D. cedrosanum* es la de mayor importancia económica por su mayor tamaño y abundancia en el centro y sur del estado. Su importancia no solo radica en ser parte estructural del ecosistema de la región, sino que también ha formado parte de las costumbre y forma de vida de las poblaciones prehispánicas, quienes lo utilizaron como fuente de alimento humano y en la actualidad como material de construcción para techos y corrales. Recientemente la principal importancia de esta planta es como fuente de materia prima para elaborar una bebida alcohólica nombrada sotol. A pesar del alto perfil de importancia económica que representa, son muy pocos los estudios realizados para comprender la dinámica y composición de las poblaciones y mucho menos se han hecho estudios para conocer la diversidad genética de la región y las técnicas moleculares más apropiadas para estos análisis. Esta carencia de conocimiento científico dificulta proponer programas de conservación y mejoramiento sustentados con datos que los avalen. En vista de lo cual

se planteó este proyecto de investigación que tiene como objetivo principal estimar la diversidad genética de una población de sotol utilizando marcadores moleculares AFLP y la implementación de marcadores de inter secuencias simples repetidas o ISSR como estrategia para disponer de herramientas moleculares para estudios de diversidad genética en sotol. Este proyecto es una línea de partida para documentar el potencial genético y la factibilidad de utilizar estos marcadores AFLP e ISSR en análisis genético de dicha especie.

## HIPÓTESIS

1. *Dasyilirion cedrosanum* carece de estructura o diferenciación entre las poblaciones, en el sureste de Coahuila y sus límites con Zacatecas.
2. Es posible detectar marcadores moleculares asociados al sexo (hembras o machos) que pueden ser útiles en la diferenciación temprana para fines de conservación y mejoramiento genético de la especie.
3. Los marcadores ISSR son capaces de detectar polimorfismo en sotol y tienen potencial para estudios de diversidad.
4. Existe mayor cantidad de plantas hembras de sotol en el campo en comparación con los machos.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Estimar la proporción de sexos en sotol (*D. cedrosanum*), y determinar su diversidad genética y estructura presente entre las poblaciones y buscar un marcador asociado al tipo sexual de las plantas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudiar la diversidad genética del sotol (*Dasyilirion cedrosanum*) presente en cuatro poblaciones del estado de Coahuila (Buenavista, General Cepeda, San Lorenzo y San Miguel) y El Novillo en Zacatecas, México.
- Comparar y validar frecuencias de plantas masculinas y femeninas.
- Buscar asociación entre marcadores AFLP y el sexo de las plantas.
- Implementar marcadores ISSR para estudios adicionales

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Taxonomía y distribución del sotol.

El Sotol es una planta que pertenece al género *Dasyilirion* y la familia Asparagaceae (WCSP, 2012). En este género se han identificado 16 especies, descritas principalmente en México, el cual se considera como centro de diversificación. Según un análisis filogenético, las especies conocidas forman dos grupos bien definidos, donde uno está compuesto por plantas del centro, sur y noreste de México y otro grupo integrado por especies del sur de Texas, una del norte de Coahuila y otra de Sonora (Bogler, 1994). Esta planta nativa del Norte de México, se extiende hasta el suroeste de Estados Unidos (Figura 3.1).

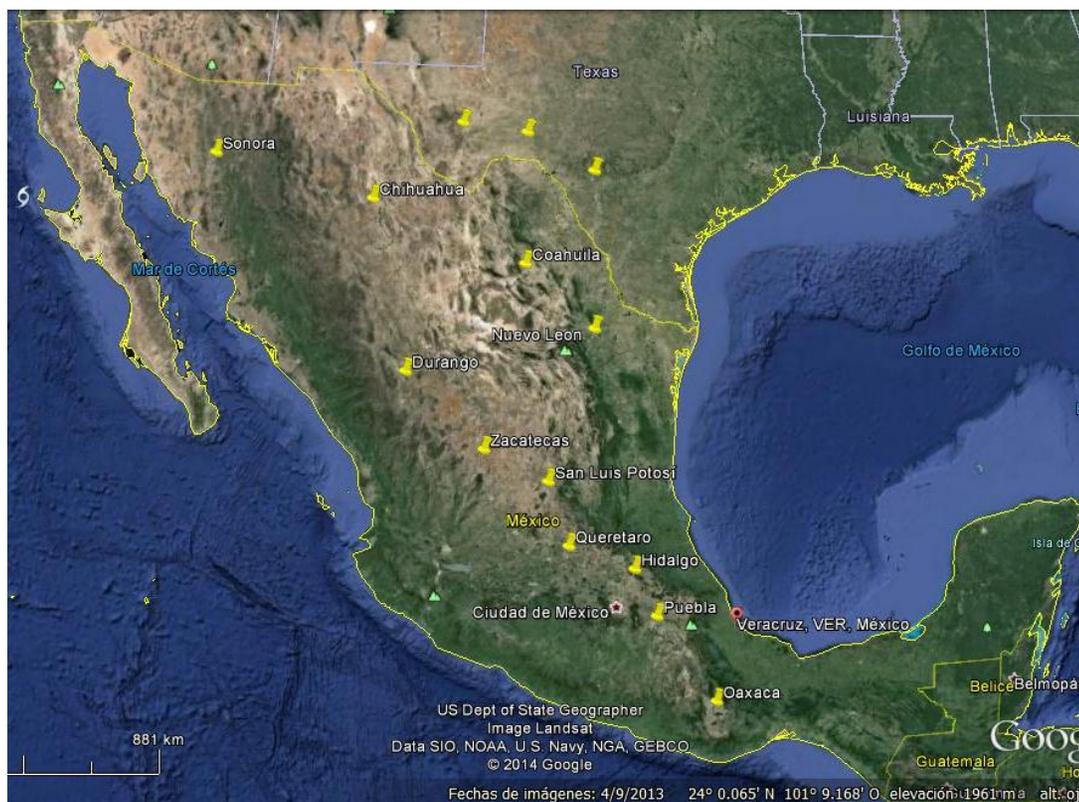


Figura 3.1 Área de distribución del género *Dasyliirion* según Bogler (1994).

La diversidad genética del sotol mexicano está representada por 16 especies documentadas y distribuidas en las tierras áridas de Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Zacatecas, Querétaro, Puebla y Oaxaca entre otros. La especie *D. cedrosanum* es la de mayor importancia económica en Coahuila por su mayor tamaño y abundancia en el centro y sur del estado. Su importancia se incrementó luego de la primera denominación de origen de la bebida llamada “Sotol” de Coahuila, Durango y Chihuahua en agosto de 2002, que aumentó la presión sobre poblaciones silvestres y originó el establecimiento de normas de explotación como la NOM – 159 – SCFI – 2004, identificación de áreas con altas densidades y estudios de composición química de hembras y machos (Herrera *et al.* 2006).

### **3.2 Importancia socioeconómica del sotol.**

El sotol (*D. cedrosanum*) es una planta de gran importancia económica y social en las zonas áridas y semi-áridas de México. Su aprovechamiento como materia prima para la producción de la bebida alcohólica conocida como sotol, representa una fuente de empleo temporal en las regiones o ejidos donde se ubica. Dicha actividad genera una intensa explotación del recurso natural y acompañado de la delicada forma de propagación se ha puesto en evidencia la virtual erradicación de la especie en algunas áreas del estado de Durango como: Cuencame, Nazas, Simón Bolívar, San Juan de Guadalupe y Viesca en Coahuila (Sánchez, 1984), poniendo en riesgo la conservación de la especie (Olhagaray, 1994).

### **3.3 Dioecia en sotol.**

La dioecia se caracteriza por presentar sexos en plantas separadas y es considerado principalmente como una transición de un ancestro hermafrodita (Torices, 2009) presente entre el 7 y 9 por ciento de las angiospermas (Abarca *et al* 2010). Esta es la única forma de reproducción documentada en el género *Dasyilirion* y la cual define una reproducción cruzada obligatoria. En época de floración las plantas desarrollan escapos que pueden alcanzar los 5 metros de altura, con presencia de inflorescencias desde la parte media o en el tercio distal del escapo. Para determinar un posible determinismo genético de la dioecia se han realizado varios estudios, entre los cuales destacan el

conteo de cromosomas realizado por Hernández-Quintero (2012) donde se encontró  $2n = 38$  cromosomas y el estudio comparativo de marcadores moleculares y valor C de DNA entre plantas estaminadas y pistiladas de sotol (*Dasyilirion cedrosanum*) que postuló un marcador AFLP candidato de 410 pares de bases asociado a los machos en una población de sotol ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México por Ortiz (2013).

### **3.4 Diversidad genética.**

Para definir el concepto de diversidad genética se han propuesto diferentes parámetros que combinan la distribución de las frecuencias alélicas, genotípicas o gaméticas. Todas en función de las características de las poblaciones bajo estudio y de los objetivos planteados. Entre los parámetros propuestos y más frecuentes están: el número de loci polimórficos, el número de alelos por locus y la heterociguidad (Lewontin, 1974).

Las técnicas aplicables para el estudio de la diversidad genética son varias, y abarcan desde la secuenciación del genoma completo de una especie, hasta, el uso de marcadores moleculares dominantes y codominantes. Su aplicación está determinada por la factibilidad y conocimiento de la secuencia genómica de la especie, así como de la información disponible de la composición genética, y de los objetivos y recursos económicos disponibles en el proyecto de investigación. En el caso particular del sotol, donde no se dispone de conocimiento del genoma, los estudios de diversidad están limitados a marcadores moleculares que no requiera conocimiento de secuencia, como

los AFLP implementados en sotol por Ortiz (2013) y los ISSR como es el caso de un estudio realizado en esparrago por Sica *et al* (1995). De estas técnicas es necesario identificar y seleccionar las que presenten mayor grado de polimorfismo, reproducibilidad, factibilidad financiera y simplicidad operativa. Los AFLP e ISSR se perfilan como los mejores candidatos y entre ellos. Los ISSR presentan la mayor factibilidad económica y operativa por ocupar un equipo básico de laboratorio y ser menos complejos que los AFLP. La técnica AFLP se basa en la detección selectiva de fragmentos genómicos de restricción, combinando las técnicas de digestión como la de polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción (RFLP) con la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR). Esta permite observar y comparar el patrón de bandas compuestas por la separación de cientos de fragmentos de DNA producto de la acción de las enzimas endonucleasas EcoRI y MseI (Vos *et al.* 1995). Y los ISSRs son marcadores genéticos que permiten apreciar un alto grado de polimorfismos entre regiones no repetidas intersatelitales (repeticiones en tandem de penta, tetra, tri o dinucleótidos) presentes especialmente en el genoma nuclear de los eucariotes. En esta técnica la secuencia de los microsatelites pasan a ser la secuencia de un iniciador al cual se le agregan 2 a 4 nucleótido como ancla para amplificar las regiones de DNA que están bordeadas por el micro satélite en cuestión. El diseño de los iniciadores es de secuencia pseudoaleatoria y están compuestos por un mínimo de 14 a 18 pares de bases, por tal facilidad se puede aplicar en huella genética hasta como una herramienta de mapeo en una amplio rango de organismos (Zietkiewicz *et al.* 1994). Estos marcadores son muy útiles para diferenciación de individuos incluso cuando existen bajos niveles de variabilidad genética, como en la distinción de individuos de origen clonal y sexual, estudios de diversidad genética, filogenia, localización de genes, cartografía del genoma

y biología evolutiva (Pradeep *et al.* 2002). Al igual que otras técnicas de marcadores moleculares como los AFLPs, esta se basa en la amplificación de fragmentos por PCR, como un proceso posterior a la extracción de DNA. Sin embargo los ISSRs se basan en la amplificación de zonas intermedias entre microsatélites y no de fragmentos de restricción como los AFLPs.

### **3.5 Estructura y flujo genético entre las poblaciones.**

La estructura genética es la diferenciación genética presente entre las subpoblaciones de una mega población y está definida en función de la fijación de alelos específicos en cada una de ellas (Cabrerero y Camacho, 2002). Esta diferenciación esta moldeada por procesos genéticos como la selección, recombinación y mutación. Para su estudio es necesario evaluar genotipos de diferentes individuos que ayudan a comprender el patrón de variación de la especie, además del flujo génico que es componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente (Salkin, 1994).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Población de sotol bajo estudio.

Para el estudio fueron seleccionadas cuatro poblaciones del estado de Coahuila y una de Zacatecas, México. Las coordenadas correspondientes se presentan en el Cuadro 4.1 y su ubicación se muestra en la Figura 4.1.

Cuadro 4.1 Coordenadas de las cinco localidades estudiadas

Localidad	Estado	Latitud N	Longitud W	Elevación (msnm)
Buenavista	Coahuila	25° 21.275'	101° 1.931'	1770
General Cepeda	Coahuila	25° 19.818'	101° 43.010'	1845
San Lorenzo	Coahuila	25° 20.186'	100° 59.680'	1888
San Miguel	Coahuila	25° 35.600'	101° 5.712'	1393
El Novillo	Zacatecas	24° 42.963'	101° 30.140'	1962

msnm= metros sobre el nivel del mar.

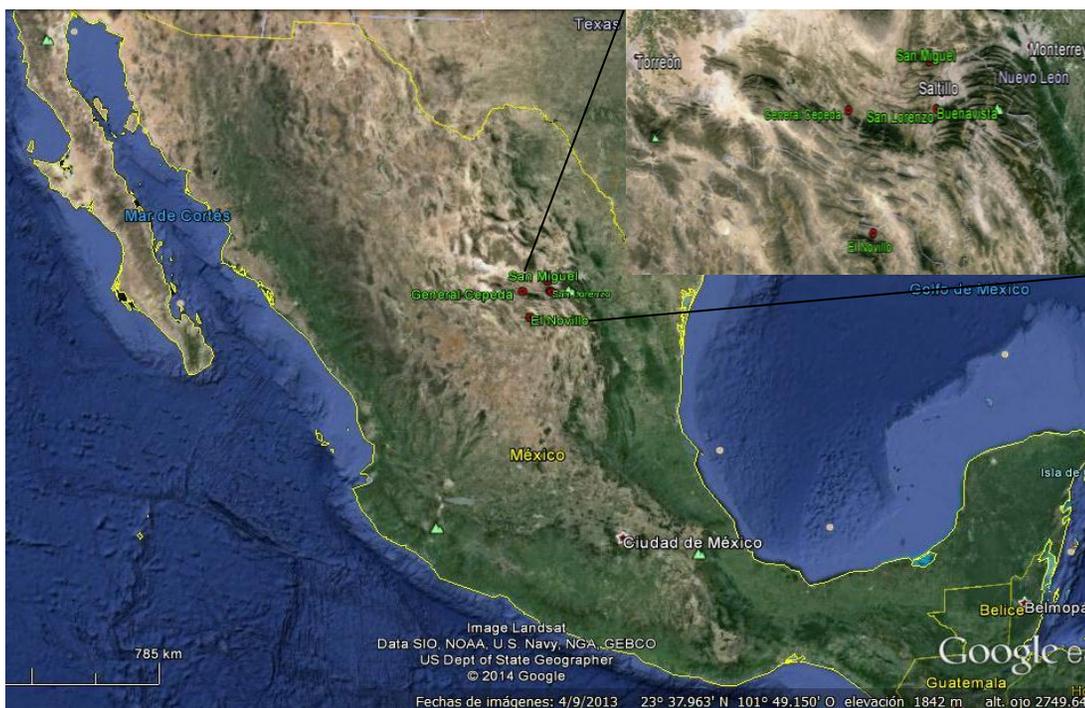


Figura 4.1 Ubicación de las cinco poblaciones de sotol estudiadas

El material para estudios genéticos con marcadores moleculares AFLP consistió de 40 plantas (cuatro machos y cuatro hembras por localidad), 10 hembras y 10 machos de la localidad Buenavista para la implementación de ISSR y un total de 400 plantas distribuidas en cuatro localidades que se utilizaron para evaluar y validar proporciones entre sexo.

#### 4.2 Extracción de DNA.

El DNA fue extraído de hojas sanas bien desarrolladas de sotol, mediante la técnica de López *et al* (1995) que incluyó la esterilización del tejido vegetal por inmersión en hipoclorito al 1 por ciento durante un minuto en un vaso de precipitados. Seguido de una inmersión en alcohol al 70 por ciento durante un minuto, con el lavado inmediato de

restos de hipoclorito y alcohol y el secado de las muestras a temperatura ambiente. Una vez esterilizado y seco el tejido, se pesó 0.5 a 1 gramo por planta y fue molido en un mortero con la ayuda del nitrógeno líquido, cubriendo completamente el tejido y triturado hasta formar un polvo fino. Algunas muestras se sometieron a dos y hasta tres inmersiones en nitrógeno por ser muy fibrosas. Una vez molido se depositó en un tubo falcon de 1.5 ml para continuar con la extracción de DNA donde se agregaron 600 µl de buffer de lisis (Tris -HCL 100 mM, pH=8, NaCl 20 mM, EDTA 20 mM y N- Lauril-sarcosina al 7 por ciento) por cada muestra de tejido, con inversión del tubo para humedecer todo el material y se dejó reposar por 10 minutos. Terminado este tiempo se adicionaron 600 µl de fenol y se agitó hasta formar una consistencia lechosa color blanco. En seguida se centrifugo la mezcla por 20 minutos a 4 °C y 12,000 rpm para separar los líquidos y sólidos, y extraer el líquido sobrenadante, el cual se mezcló en proporción 1:1 con RNAsas (1µg/ml) con incubación a 37°C por 15 minutos. De la solución incubada se extrajeron 600 µl y se mezclaron con 600 µl de isopropanol, incubando la mezcla por 30 minutos a -20°C para precipitar el DNA. Al termino de los 30 minutos se colectó la madeja de DNA en un tubo eppendorf de 1.5 ml con la ayuda de un gancho de pipeta Pasteur previamente flameada con alcohol al 90 por ciento. Al completar la extracción se dejó secar por 10 minutos y se agregaron 400 µl de alcohol al 70 por ciento a -20°C para lavar y eliminar restos de proteínas. Una vez lavado el DNA se resuspendió con 50 µl de TE al 1 por ciento con una mezcla homogénea que fue almacenada a -20°C para su conservación.

La calidad del DNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 5 por ciento, preparado con un gramo de agarosa más 100 ml de TBE. El gel resultante se

observó en un transiluminador donde se hizo la evaluación de la concentración y pureza, en función de la ausencia de RNA, DNA íntegro y altamente concentrado como las mejores muestras. Una vez seleccionadas las muestras de mejor calidad, se determinó su concentración en un espectrofotómetro. Para esto se mezclaron en un tubo de ensayo, 990  $\mu$ l de agua y 10  $\mu$ l de DNA y la mezcla resultante se pasó al espectrofotómetro y se tomó nota de absorbancia a 260 nm con la que se estimó la concentración de DNA (absorbancia a 260 nm X 5000 = ng DNA/ $\mu$ l), la concentración de proteínas y el cociente DNA (abs260nm/abs280nm) como el mejor indicador de pureza donde el valor óptimo es dos. Con el previo conocimiento de la concentración y calidad de las muestras, fueron seleccionadas las 8 mejores de cada población, integradas por 4 plantas hembras y 4 machos con una concentración mayor a 2000 ng/ $\mu$ l y con un cociente DNA igual o cercano a dos. La concentración final del DNA depende del tipo de marcador molecular a utilizar, en este caso los AFLP según protocolo de Li-Cor, necesitan 100 ng de DNA/muestra, por tal razón de todas las muestras se preparó 20  $\mu$ l a 100 ng de DNA/ $\mu$ l, según la siguiente fórmula:

$$V1C1 = V2C2$$

$$V1 = V2C2/C1$$

dónde:

V1 = Volumen de DNA inicial necesario para obtener una concentración final.

C1 = Concentración inicial del DNA

V2 = Volumen que se quiere preparar a una menor concentración que la inicial (20  $\mu$ l a 100 ng/ $\mu$ l).

C2 = Concentración final o de interés para el estudio (100 ng de DNA/ $\mu$ l).

$$V2 = V1(\mu\text{l}) + \text{AGUA}(\mu\text{l})$$

### **4.3 Marcadores moleculares AFLP.**

La técnica de AFLP se aplicó según el protocolo IRDye Fluorescent AFLP Kit for Large Plant Genome Anlysi propuesto por Li – Cor Biosciences, el cual consiste de las siguientes etapas en el manejo y tratamiento del DNA:

#### Digestión del DNA

En esta etapa, los 100 ng de DNA/muestra fueron cortados por la acción de las enzimas de restricción EcoRI/MseI (1 $\mu$ l) en combinación con 2.5 $\mu$ l 5X de Buffer de reacción, 1  $\mu$ l de DNA (100 ng/ $\mu$ l) y 8  $\mu$ l de agua, formando 12.5  $\mu$ l por muestra, el cual fue incubado a 37°C durante dos ciclos de 90 minutos seguido de la inactivación enzimática por la exposición a 72°C durante 15 minutos y finalizando con 4°C por tiempo indefinido para conservar la integridad de los fragmentos resultantes de la digestión. Esta secuencia de tiempos y temperaturas se integró en un termociclador de gradiente para su ejecución.

#### Ligado de adaptadores

Después de la digestión del DNA, se procedió con la incorporación de adaptadores específicos para las enzimas EcoRI y MseI, con el propósito completar la doble hélice de

DNA. Para esto se agregó 12 µl de adaptadores mixtos en los 12.5 µl de DNA previamente digerido, más 0.5 µl de T4 DNA ligasa, para un volumen final de 25 µl/muestra que en seguida fue incubado por dos horas a 20°C. Una vez finalizado el proceso de ligado de adaptadores, se procedió a preparar una dilución 1:10. Para esto se mezclaron 10 µl de DNA ligado más 90 µl de buffer TE. Estas nuevas muestras diluidas son la materia prima para hacer la pre-amplificación.

### Pre-amplificación

La pre-amplificación se realizó mediante la mezcla de 2.5 µl de DNA de dilución 1:10, 20 µl de AFLP pre-amp primer mix, 2.5 µl de PCR reaction buffer (10X) y 0.5µl de Taq DNA polimerasa (5 unidades/µl), para un volumen total de 25.5 µl/muestra. Esta mezcla se pasó a PCR bajo un programa de 94°C por 5 minutos, 94°C por 30 segundos, 56°C por un minuto, 20 ciclos a 72°C por un minuto, un ciclo de 72°C por 10 segundos más 4°C por tiempo indefinido. Una vez finalizada la pre-amplificación, se continuó con la preparación de diluciones 1:40, mediante la mezcla de 5 µl de ADN pre-amplificado más 195 µl de agua extra pura. Esta dilución final es la utilizada en la amplificación selectiva.

### Amplificación selectiva

En este último paso de la técnica de AFLP, se utilizaron los iniciadores M – CTG, E – AAC, E – AGG, estos dos últimos están marcados con flurocromos que emite luz a 700 y 800 nm y que originan dos patrones de bandeo en el mismo gel si ambos

iniciadores amplifican en el genoma del sotol. Para hacer efectiva la amplificación se formó el coctel descrito en el Cuadro 4.2, una vez finalizada la mezcla, fue puesta en PCR bajo el programa descrito en el Cuadro 4.3.

Cuadro 4.2 Coctel de amplificación selectiva para AFLP multiplex.

Reactivos	Cantidad ( $\mu$ l)
DNA preamplificado en dilución (1:40)	2.0
Taq DNA polimerasa (5 units/ $\mu$ l)	0.1
Iniciador MseI con dNTPs	2.0
Iniciador EcoRI marcado 700 nm	0.5
Iniciador EcoRI marcado 800 nm	0.5
Buffer de amplificación 10X	1.12
Agua desionizada	4.8
<b>Volumen total</b>	<b>11.1</b>

Cuadro 4.3 Programa de PCR para amplificación selectiva en AFLP.

Paso	Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Tiempo (seg)	Ciclos
1	94	30	
2	65	30	1
3	72	60	
4	94	30	
5	65	30	12

6	72	60	
7	94	30	
8	56	30	23
9	72	60	
10	4	$\infty$	$\infty$

$^{\circ}\text{C}$  = grados centígrados, seg= segundos.

Inmediatamente después de terminar la PCR, el DNA resultante de la amplificación selectiva fue almacenado a  $-24^{\circ}\text{C}$  para evitar su degradación y garantizar la disponibilidad para la electroforesis vertical.

#### Electroforesis vertical de AFLP en gel de poliacrilamida

El proceso de electroforesis del DNA con amplificación selectiva, consistió en: La tinción y desnaturalización del DNA donde se mezclaron 5  $\mu\text{l}$  de “Stop Azul” con el DNA de la amplificación selectiva, seguido de la exposición a temperaturas de  $94^{\circ}\text{C}$  por tres minutos en un termociclador y la preparación del gel de poliacrilamida seguida de la electroforesis vertical. En esta última etapa, el gel de poliacrilamida fue preparado, mediante la mezcla de 0.1g de sulfato de amonio con 1 ml de agua desionizada; de la mezcla resultante se utilizaron 150  $\mu\text{l}$  y se mezclaron con 15  $\mu\text{l}$  de Temed y 20 ml de poliacrilamida (KB Plus 6.5 por ciento Gel Matrix). Con el cuidado de depositar primero la poliacrilamida y enseguida agregar el sulfato de amonio y el Temed (los dos a la vez), con la inmediata decantación de la mezcla entre los vidrio de corrida, que fueron

previamente lavados con jabón para vidrios y limpiados con isopropanol y armados con separadores de 0.25 mm que definen el grosor final del gel. Después de vertida la mezcla, se dejó reposar por 2.5 horas o el tiempo necesario hasta que polimerizó (gelificó) y enseguida se instaló en el secuenciador e inició la pre-corrida para confirmar la calidad del gel y finalmente la corrida por 3 horas que dio como resultado dos fotos, una con el patrón de bandas a 700 nm y otra a 800 nm.

#### Codificación binaria de geles de poliacrilamida en AFLP

Con las fotos obtenidas del secuenciador se inició el proceso de codificación en las cinco localidades bajo estudio. Primero se determinó el tamaño del fragmento en pares de bases (bp), con el programa GelQuanPro. Una vez definido el tamaño, se construyó la tabla binaria de presencia y ausencia. En la cual la presencia de banda se etiquetó con el valor de (1), ausencia (0) y dato perdido con (NA).

#### **4.4 Análisis de diversidad genética entre y dentro de las poblaciones.**

El análisis de los parámetros de diversidad genética fue realizado en el programa AFLP-SURV 1.0 un programa de versión libre en el cual se estimó:

La diversidad genética de Nei ( $H_j$ ) por población:

$$H_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L He(i)$$

Donde  $H_j$  es la heterocigocidad promedio esperada para todos los loci de la población j y  $He(i)$  es la heterocigocidad esperada en el iesimo locus.

$$He(i) = 2q(i)[1 - q(i)]$$

La diversidad promedio dentro de las poblaciones  $H_w$

$$H_w = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n H_j$$

Donde  $n$  es el número de poblaciones evaluadas y  $H_j$  es la diversidad genética de Nei estimada en cada población.

La diversidad genética promedio entre las poblaciones ( $H_b$ )

$$H_b = \frac{2}{n(n-1)} \sum_{j < k} \hat{H}_{JK}$$

Donde  $n$  es el número de poblaciones y  $\hat{H}_{JK}$  es la heterocigosis promedio para todos los loci entre pares de poblaciones (j y k) estimada con la fórmula:

$$\hat{H}_{JK} = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L H_{JK(i)}$$

Donde  $H_{JK(i)}$  es la heterocigosis esperada en el i-esimo locus entre la población J y K, la cual se calcula como:

$$H_{JK(i)} = q_j(i)[1 - q_k(i)] + q_k(i)[1 - q_j(i)]$$

Una vez obtenidas la diversidad dentro  $H_w$  y entre poblaciones ( $H_b$ ), se calculó con el AFLP-SURV la diversidad genética total  $H_t = H_w + H_b$  y con este el coeficiente de fijación ( $F_{st}$ ) entre pares de poblaciones igual a  $F_{st} = H_b/H_t$  y el coeficiente de fijación insesgado general definido como:

$$F_{st} = \frac{H_b}{H_t} x \left( 1 + \frac{H_b Var(H_w) - H_w Var(H_b) + (H_b + H_w) Cov(H_b, H_w)}{H_b H_t^2} \right)^{-1}$$

Además se consideró 500 permutaciones para la prueba de estructura genética (confianza del 99 por ciento) y 1000 bootstraps para el análisis de: distancia genética entre pares de poblaciones estimada como:

$$D_{JK} = -\ln \left( \frac{J_{jk}}{\sqrt{J_j J_k}} \right)$$

Donde  $J_j$  es la identidad genética dentro de la población  $J = (1 - H_j)$ ,  $J_k$  es la identidad genética dentro de la población  $K = (1 - H_k)$  y  $J_{jk}$  es la identidad genética entre las poblaciones  $J$  y  $K = (1 - H_{jk})$  y similaridad genética entre poblaciones  $(1 - D_{JK})$ , así como también el porcentaje y número de bandas polimórficas por población con sus respectivos componentes de varianza acreditada a muestreo de los individuos, loci y poblaciones.

#### **4.5 Pruebas de asociación entre marcadores AFLP y el sexo.**

En este trabajo fue aplicada la prueba exacta de Fisher a los 523 loci presentes en los geles de 700 y 800 nm con el objetivo de identificar posibles marcadores candidatos ligados al sexo. Para esto se construyó una tabla de presencia (P) y ausencia (A) entre machos y hembras, bajo formato txt como se presenta a continuación.

Locus	HembrasP	HembrasA	MachosP	MachosA
1	dato x	dato y	dato x´	dato y´
..	..	..	..	..
523	dato x	dato y	dato x´	dato y´

Esta tabla fue analizada en el programa R para estimar el valor de  $p$  según la prueba exacta de Fisher y se utilizaron los siguientes comandos:

```
> datos<-read.table("nombre.txt",head=T)
> dat<-datos[1:523,2:5]
> dat
> apply(dat,1, function(x) fisher.test(matrix(x,nr=2))$p.value)
```

Con  $\alpha = 0.05$  y con la consideración de que hay 523 pruebas de asociación entre los marcadores y el sexo, fue necesario aplicar la corrección de Bonferroni para el valor de  $p$  crítico para rechazar la hipótesis nula. Con dicha corrección se rechaza la hipótesis nula si el valor de  $p$  es menor a  $9.56 \times 10^{-5}$  ( $\alpha / 523$ ) y se afirma que si existe asociación entre un marcador y el sexo.

#### **4.6 Inter secuencias simples repetidas (ISSR) en sotol.**

El área de estudio comprendió la población de sotol presente en la localidad de Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Se utilizaron segmentos de hojas sanas y bien desarrolladas de 17 plantas hembras y 19 machos más una planta de esparrago como testigo. El DNA fue extraído según López et al (1995) descrito en la sección 4.2.

De los 23 iniciadores que amplificaron en esparrago en el estudio de Sica *et al* (2005) fueron seleccionados 4 que cubren un amplio rango de temperaturas de alineación y sus condiciones generales para PCR se presentan en el Cuadro 4.4.

Cuadro 4.4 Iniciadores ISSR y sus condiciones para PCR (Sica et al, 2005).

Nombre del iniciador	Secuencia del Iniciador	Temperatura de Alineación (°C)
OH	(GAG) <sub>7</sub> RG	66.7
W7	(CT) <sub>8</sub> RG	52.8
3	(CA) <sub>8</sub> AT	50
W902	(GT) <sub>6</sub> AY	39

La optimización de las condiciones de reacción de PCR específicas de cada iniciador se llevó a cabo de la siguiente manera:

El DNA de las 17 plantas hembras seleccionadas fue la materia prima para formar dos muestras compuestas de DNA. Una integrada por la mezcla de DNA de 10 plantas hembras y otra por mezcla de siete plantas. De las 19 plantas macho también se

formaron dos compuestos de 11 y 8 plantas respectivamente y se incluyeron en el estudio dos muestras de DNA de esparrago como testigo.

#### Optimización de iniciadores ISSR

Para tener una mayor oportunidad de éxito en la amplificación de los iniciadores ISSR se trabajó con gradientes de concentración de: iniciadores, DNA y temperatura de alineación, tomando como referencia lo reportado por Sica *et al* (2005) más varios valores superiores y/o inferiores descritos en el Cuadro 4.5.

Cuadro 4.5 Condiciones base para optimizar la amplificación con iniciadores ISSR.

Iniciadores evaluados	Concentración del iniciador ( $\mu\text{M}$ )	Concentración de DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )	Temperatura de Alineación ( $^{\circ}\text{C}$ )
OH	0.6 y 2	2, 5, 25, 50, 75, 100	66.7 $\pm$ 6
W7	0.6 y 2	2, 5, 25, 50, 75, 100	52.8 $\pm$ 6
3	0.6 y 2	2, 5, 25, 50, 75, 100	50 $\pm$ 6
W902	0.6 y 2	2, 5, 25, 50, 75, 100	39 $\pm$ 6

Una vez definida la combinación de gradientes de concentración de DNA, iniciadores y temperatura de alineación, se procedió a preparar el coctel de PCR compuesto por 4  $\mu\text{l}$  de DNA, 4  $\mu\text{l}$  de iniciador, 4  $\mu\text{l}$  Taq polimerasa con DNTPs y 8  $\mu\text{l}$  de agua, completando un volumen de 20  $\mu\text{l}$  por muestra. Finalizada la mezcla y tomando

en consideración la concentraciones propuestas en el Cuadro 4.5, se inició la amplificación bajo un programa de amplificación general detallado en el Cuadro 4.6.

Cuadro 4.6 Programa de PCR para amplificación de iniciadores ISSR.

Concepto	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
1	94	90	1
2	94	45	
3	Temperatura de alineación (TA)	45	35
4	72	90	
5	94	45	
6	TA	45	1
7	72	300	
8	4	∞	∞

seg= segundos.

Para la electroforesis o separación de los productos amplificados se preparó un gel de agarosa, mediante la mezcla de 80 ml de TBE al 0.5, 0.8 g de agarosa al 1.5 por ciento y calentamiento de la mezcla durante 1.5 minutos en el microondas más 0.8 µl de Gel red como agente de tinción para visualizar los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta. Terminada la mezcla se vertió en el aparato de electroforesis colocando un peine de 15 pozos para la evaluación de 15 muestras. Una vez formado el gel, se mezclaron 5 µl de DNA amplificado más 1 µl de buffer de carga por muestra y se

depositó cada muestra en uno de los pozos. Finalizada esta labor se cubrió el gel con TBE y se dio inicio a la corrida bajo 121 amperios por 1.5 a 2 horas. Finalizada la electroforesis los geles fueron transferidos a bolsas plásticas transparentes y se pasaron a un documentador de geles BioRad donde se observó y analizó la calidad de la amplificación según la nitidez y perfecta diferenciación de las bandas amplificadas. Una vez tomada la foto de cada amplificación visualizada en el gel de agarosa se procedió con la selección de las mejores condiciones de amplificación con énfasis en la nitidez y perfecta diferenciación de las bandas amplificadas.

Después de visualizar el gel y seleccionar las condiciones óptimas de amplificación por cada iniciador, se continuó con la validación en 10 plantas hembras y 10 machos. Del gel resultante se construyó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0), con el propósito de identificar y seleccionar el mejor iniciador en función del número de bandas polimórficas amplificadas. Este proceso de evaluación incluyó los siguientes trabajos:

1. Amplificación de 20 muestras en termociclador.
2. Electroforesis horizontal en gel de agarosa.
3. Visualización y toma de foto en el documentador de geles BioRaD.
4. Codificación binaria.

Una vez obtenida la codificación binaria de los geles ISSR, se procedió a su análisis en función total de bandas amplificadas, porcentaje y número de bandas polimórficas, y se finalizó con la elección del iniciador que presentó el mayor número de bandas

polimórficas y por ende el que presentó mejor potencial para estudios de diversidad genética.

#### 4.7 Proporciones de sexos en poblaciones de sotol.

Para la validar las proporciones entre sexos encontradas por Hernández-Quintero (2012), se documentó la floración 2013 en cuatro de las cinco localidades descritas en el Cuadro 4.1. Se identificó el número de plantas hembras y machos por año. Estas fueron georeferenciadas e identificadas con su número de planta correspondiente. Estos datos se unieron con los recabados desde el 2010 al 2012 y se corroboró por la prueba de chi cuadrada para evaluar igualdad de proporciones 1:1 entre hembras y machos y se concluyó con una prueba de chi cuadrada con simulación de Montecarlo aplicada para las cuatro poblaciones evaluadas, esto con el objetivo de identificar la independencia de las proporciones con respecto a las localidades. Para esto se construyó una tabla de presencia de machos y hembras por localidad bajo formato txt, como se presenta a continuación.

Localidad	Hembras	Machos
Buenvista	dato x	dato y
El_Novillo	dato x	dato y
San_Miguel	dato x	dato y
San_Lorenzo	dato x	dato y
Total	x	y

Esta tabla fue analizada en el lenguaje R para estimar el valor de  $p$  según la prueba de chi cuadrada por localidad con simulación de Montecarlo para las cuatro localidades y el total, se utilizó el siguiente código:

```
datos<-read.table("nombre.txt",head=T)
```

```
Buenavista<-datos[1:1,2:3]
```

```
chisq.test((Buenavista),simulate.p.value=TRUE,B=10000)
```

```
El_Novillo<-datos[2:2,2:3]
```

```
chisq.test((El_Novillo),simulate.p.value=TRUE,B=10000)
```

```
San_Miguel<-datos[3:3,2:3]
```

```
chisq.test((San_Miguel),simulate.p.value=TRUE,B=10000)
```

```
San_Lorenzo<-datos[4:4,2:3]
```

```
chisq.test((San_Lorenzo),simulate.p.value=TRUE,B=10000)
```

```
Total<-datos[5:5,2:3]
```

```
chisq.test((Total),simulate.p.value=TRUE,B=10000)
```

```
dat<-datos[1:4,2:3]
```

```
chisq.test(dat,correct=FALSE)
```

```
chisq.test(dat, simulate.p.value = TRUE, B = 10000)$p.value
```

Bajo la hipótesis nula de igual proporción entre hembras y machos e independencia de las proporciones con respecto a las localidades, con  $\alpha = 0.05$ , se rechaza la hipótesis nula cuando el valor de  $p$  fue inferior a  $\alpha$  y se afirma que la proporción entre sexos presente en la localidad difiere de una proporción 1:1.

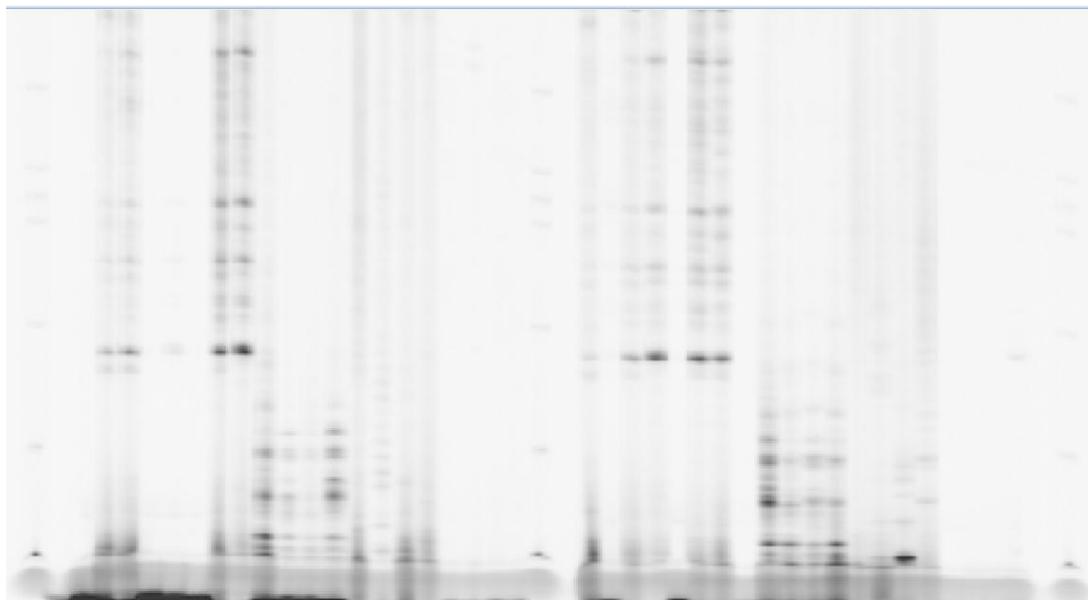
#### **4.8 Análisis de distribución espacial entre sexos.**

Para este análisis se utilizaron los datos de georeferenciación, obtenidos en el registro de floración (2010 a 2013) con el propósito de buscar si existe algún patrón no aleatorio que ayude a comprender mejor la dinámica reproductiva del sotol. Esto se hizo como análisis exploratorio.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Datos generales del análisis de diversidad genética con AFLP.

Se encontró un total de 523 loci con la técnica de AFLP y de estos, 522 (99.8 por ciento) fueron polimórficos, con un promedio de 23.5 fragmentos por individuo, un tamaño medio de 203.04 pb por fragmento, con una desviación estándar de 103.18 pb, además de una correlación negativa (-0.2630) entre el tamaño del fragmento y su frecuencia en la población con  $p = 0.00000$ . Todos estos loci fueron identificados en los patrones electroforéticos a 700 y 800 nm (Figura 5.1 y 5.2).



L HHHH**HHHHHHHHHHHH**HHHH L MMMM**MMMMMMMMMM**MMMM L

Figura 5.1 Patrón de bandas AFLP a 700 nm. L = marcador de pesos molecular, H = Hembras, M = Machos.



Cuadro 5.1 Parámetros y estadísticos de diversidad genética por población.

Población	N	#loc	#loc_P	PLP	Hj	E.E(Hj)
Buenavista	8	523	290	55.4	0.10222	0.00299
General Cepeda	8	523	174	33.3	0.06157	0.00267
El Novillo	8	523	96	18.4	0.03339	0.00269
San Lorenzo	8	523	10	1.9	0.02174	0.00159
San Miguel	8	523	3	0.6	0.00894	0.00087

N = número de muestras, #loc = número de loci totales, #loc\_P= número de loci polimórficos, PLP= porcentaje de loci polimórficos al nivel de 5%, Hj= heterocigosis esperada o diversidad génica de Nei.

Los datos presentados en el Cuadro 5.1, en especial la diversidad genética deben ser considerados como datos preliminares y exploratorios en la especie *D. cedrosanum* debido a que no se encuentran más estudios con el que se puedan hacer comparaciones.

### 5.3 Diversidad genética promedio.

El análisis de diversidad genética promedio dentro las cinco poblaciones reveló un valor de 0.0457 donde más del 99.6 por ciento de la variación observada es acreditada al muestreo de las poblaciones (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2 Diversidad genética promedio intrapoblacional (Lynch y Milligan).

n	Hw	E.E.(Hw)	Var(Hw)	VarI(Hw)	VarL(Hw)	VarP(Hw)
5	0.0457	0.01660	0.000276	0.000001	0.000000	0.000274
Porcentaje de Varianza de (Hw)				0.36	0.05	99.59

n = número de poblaciones, (Hw) = diversidad promedio dentro de las poblaciones, Var(Hw) = varianza total; VarI(Hw) = varianza debida al muestreo de los individuos; VarL(Hw) = varianza debida al muestreo de loci, y VarP(Hw) = varianza debida al muestreo de poblaciones.

#### 5.4 Diversidad genética general y Estructura.

La diversidad genética general estimada según fórmula de Lynch y Milligan (1994) fue de 0.0464, de esta, el 98.49 por ciento está dentro de las poblaciones lo que pone en manifiesto el intercambio genético entre las poblaciones vecinas de sotol. Además se estimó un nivel de fijación ( $F_{st}$ ) general de 0.0136, el cual no fue estadísticamente significativo con  $p = 0.01$  e implica una evolución conjunta de todas las poblaciones estudiadas que está dominada por un alto flujo genético (polen) entre ellas, posiblemente favorecido por la facilidad de transporte del polen por el viento e insectos y la falta de obstáculos naturales que le impidan el paso al estar en una zona de semidesierto. No se demuestra que las poblaciones estudiadas de *D. cedrosanum* tengan diferenciación o estructura genética, y por tanto pudieran ser consideradas parte de una mega población relativamente uniforme en cuanto a similaridad de frecuencias génicas entre las subpoblaciones (Cuadro 5.3 y 5.4).

Cuadro 5.3 Estructura genética de las cinco poblaciones (Lynch y Milligan, 1994).

N	Ht	Hw	Hb	Fst
5	0.0464	0.0457	0.0007	0.0136
E.E		0.016599	0.000245	0.429669

N = Numero de poblaciones, Ht = Diversidad genética total, Hw = Diversidad Genética promedio dentro de la población, Hb = Diversidad promedio entre poblaciones en exceso del que se observó dentro de las poblaciones, Fst = Correlación entre los genes de una subpoblación con los genes de la población general, E.E = Error estándar.

Cuadro 5.4 Prueba de permutación para diferenciación genética entre poblaciones.

Estadístico	Valor
Fst observado	0.0136
Límite inferior al 99%	-0.0173
Limite Superior al 99%	0.0138

### 5.5 Análisis de distancia y similitud genética entre poblaciones.

Se encontró que la distancia genética entre las poblaciones es prácticamente cero, debido a que el rango de distancia o disimilaridad, está entre 0.0 y 0.0012. Estos valores representan una similitud genética entre 0.9988 y 1 (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5 Matriz de distancia (sobre la diagonal) y similaridad genética de Nei (bajo la diagonal) entre poblaciones de sotol (Lynch y Milligan, 1994).

	Buenavista	General Cepeda	El Novillo	San Lorenzo	San Miguel
Buenavista	0.0000	0.0000	0.0006	0.0008	0.0012
General Cepeda	1.0000	0.0000	0.0002	0.0001	0.0005
El Novillo	0.9994	0.9998	0.0000	0.0004	0.0009
San Lorenzo	0.9992	0.9999	0.9996	0.0000	0.0000
San Miguel	0.9982	0.9995	0.9991	1.0000	0.0000

## 5.6 Análisis concluyente de diversidad genética con AFLP.

Debido a los problemas de amplificación encontrados en el gel a 800 nm y en una localidad del gel a 700 nm, se buscó hacer mejores estimados de los parámetros genéticos y en especial el índice de fijación. Esto se logró mediante un análisis adicional que incluyó solo el patrón electroforético a 700 nm y la eliminación de la población San Miguel. Se encontró un total de 242 loci, de los cuales 241 (99.6 por ciento) fueron polimórficos entre plantas, con un promedio de 13.3 fragmentos por individuo y un tamaño medio de 197 pb por fragmento. Este alto porcentaje de loci polimórficos de la población global concuerda con lo esperado en una especie alógama obligada por tratarse de una planta dioica, además indica que el número de individuos que entran en cada ciclo reproductivo es lo suficientemente grande para evitar la fijación de loci que

estaría causada únicamente por la erosión genética, por lo que dicha limitación reproductiva está ausente en la especie. Cabe destacar que los valores máximos de porcentaje de loci polimórficos correspondieron a las localidades de Buenavista y General Cepeda con valores de 58.7 y 37.2 respectivamente, y que en último lugar se ubicó el Cañón de San Lorenzo, con un valor de 2.9 por ciento (Cuadro 5.6). Esta gran diferencia entre el número de loci polimórfico de San Lorenzo es posible que se deba a que el intercambio genético o flujo entre las poblaciones no sea 100 por ciento recíproco. La orografía de la zona, la cual tiene el relieve de un cañón, podría contribuir a un cierto grado de aislamiento de otras poblaciones. Estos diferentes porcentajes de loci polimórficos detectados entre las poblaciones demuestra que al estudiar las poblaciones silvestres podemos encontrar sitios muy ricos en diversidad genética así como sitios muy pobres donde el porcentaje de bandas polimórficas es muy bajo.

Cuadro 5.6 Parámetros y estadísticos adicionales de diversidad genética por población.

Población	N	#loc	#loc_P	PLP	Hj	E.E(Hj)
Buenavista	8	242	142	58.7	0.10502	0.00382
General Cepeda	8	242	90	37.2	0.06915	0.00378
El Novillo	8	242	18	7.4	0.01476	0.00289
Cañón de San Lorenzo	8	242	7	2.9	0.03568	0.00264

N = número de muestras, #loc = número de loci totales, #loc\_P = número de loci polimórficos, PLP = porcentaje de loci polimórficos, Hj = heterocigosis esperada o diversidad génica de Nei.

El Cuadro 5.6 muestra que fue posible detectar diversidad genética en todas las poblaciones estudiadas, donde aquella con mayor diversidad genética fue Buenavista con un valor de 0.10502 y El Novillo como la más pobre con valor de 0.01476. El análisis de la estructura genética y sus componentes presentado en el Cuadro 5.7 revela falta de subdivisión genética entre las cuatro poblaciones ya que el 99.29 por ciento de la diversidad genética total (0.0566) observada, correspondió a la diversidad dentro de sitios, lo que pone en manifiesto la uniformidad entre las poblaciones vecinas de sotol.

Cuadro 5.7 Estimación adicional de estructura genética en las cuatro poblaciones.

N	Ht	Hw	Hb	Fst
4	0.0566	0.0562	0.0005	0.0071
E.E		0.0198	0.0000	0.0000

N = Número de poblaciones, Ht = Heterocigosis esperada en la población total, Hw = Heterocigosis esperada en subpoblaciones, Hb = Exceso de heterocigosis esperada total, con respecto al promedio de las subpoblaciones, Fst = Índice de fijación.

Esta observación de uniformidad genética entre las poblaciones es avalada por los resultados no significativos de la prueba de permutaciones realizada al coeficiente de fijación (Fst) y cuyos datos son mostrados en el Cuadro 5.8, en la que el Fst = 0.0071 no presentó una magnitud estadísticamente significativa, con un intervalo al 99 por ciento de confianza, e implica una carencia de subdivisión genética en la población. Esto puede deberse a una falta de aislamiento reproductivo favorecido por la falta de obstáculos naturales que le impida el paso del polen en esta zona semidesértica.

Cuadro 5.8 Prueba de permutación adicional para diferenciación genética entre poblaciones.

<b>Estadístico</b>	<b>Valor</b>
Fst observado	0.0071
Límite inferior al 99%	-0.0174
Limite Superior al 99%	0.0166

La falta de estructura entre las poblaciones coincide con las reducidas distancias genéticas observadas en la matriz de distancias genéticas presentadas en el Cuadro 5.9, en el cual se encontró que el rango de distancia entre poblaciones esta entre 0.0000 y 0.0010.

Cuadro 5.9 Segunda Matriz de distancia (sobre la diagonal) y similaridad genética de Nei (bajo la diagonal) entre poblaciones de sotol.

	Buenavista	General Cepeda	El Novillo	Cañón de San Lorenzo
Buenavista	0.0000	0.0000	0.0010	0.0001
General Cepeda	1.0000	0.0000	0.0005	0.0000
El Novillo	0.9990	0.9995	0.0000	0.0000
Cañón de San Lorenzo	0.9999	1.0000	1.0000	0.0000

La similaridad de frecuencias alélicas resultante entre subpoblaciones posibilita el intercambio genético artificial para fines de conservación y reforestación ya que todas ellas podrían ser consideradas parte de una mega población. Este conocimiento puede ser de gran utilidad para definir estrategias eficientes de conservación e incremento de la diversidad genética en las subpoblaciones de sotol o en trabajos de reforestación.

### **5.7 Resultados de la prueba de asociación de AFLPs con el sexo.**

El análisis de asociación según la prueba exacta de Fisher aplicada a los 523 marcadores amplificados, revelo que no existen bandas asociadas significativamente al sexo. Pero esto no descarta que la definición del sexo este determinada por un componente genético, únicamente muestra que los iniciadores evaluados no amplifican los segmentos del genoma que están ligados a la expresión del carácter (sexo) en *D. cedrosanum*. Es por esto que en este estudio se considera que es necesario diseñar iniciadores AFLPs o utilizar otras combinaciones distintas a las cuarenta combinaciones de Li – Cor Biosciences disponibles en el mercado ya que estas no amplifican bandas ligadas al sexo en esta especie de sotol.

### **5.8. Optimización de iniciadores ISSR en sotol.**

Se lograron identificar las condiciones óptimas para amplificación efectiva para PCR en cuatro tipos de iniciadores ISSR. Esto fue posible gracias la evaluación de gradientes menores y mayores en la concentración de iniciadores, DNA y temperatura de alineación reportadas por Sica *et al* (2005) (Cuadro 5.10).

Cuadro 5.10 Optimización de iniciadores ISSR en sotol.

Iniciadores evaluados	Concentración del iniciador ( $\mu\text{M}$ )		Concentración de DNA ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ )		Temperatura de Alineación ( $^{\circ}\text{C}$ )	
	Reportada	Optimizada	Reportada	Optimizada	Reportada	Optimizada
	OH = (GAG) <sub>7</sub> RG	0.6	2	2 - 5	75	66.7
W7 = (CT) <sub>8</sub> RG	0.6	2	2 - 5	75	52.8	49.2
3 = (CA) <sub>8</sub> AT	0.6	2	2 - 5	75	50	47
W902 = (GT) <sub>6</sub> AY	0.6	2	2 - 5	75	39	34.9 - 39

De los cuatro iniciadores evaluados fueron seleccionados el OH ((GAG)<sub>7</sub>RG) (Figura 5.3) y el W7 ((CT)<sub>8</sub>RG) (Figura 5.4), ya que estos amplificaron 14 y 10 bandas polimórficas respectivamente según análisis preliminar de diversidad realizado con el programa AFLP-SURV, donde estos dos iniciadores se perfilaron con el mayor potencial para hacer estudios de diversidad, además de mostrar una buena capacidad de transferibilidad de los marcadores ISSR entre especies de la misma familia en este caso se abren posibilidad explorar el resto de los 23 iniciadores que fueron elegidos y aplicados por Sica *et al* (2005), en la estimación de la diversidad genética de 8 poblaciones de *Asparragus acutifolius*. Y de esta forma buscar la diversificación de las herramientas disponibles para continuar los estudios genéticos de interés en sotol.

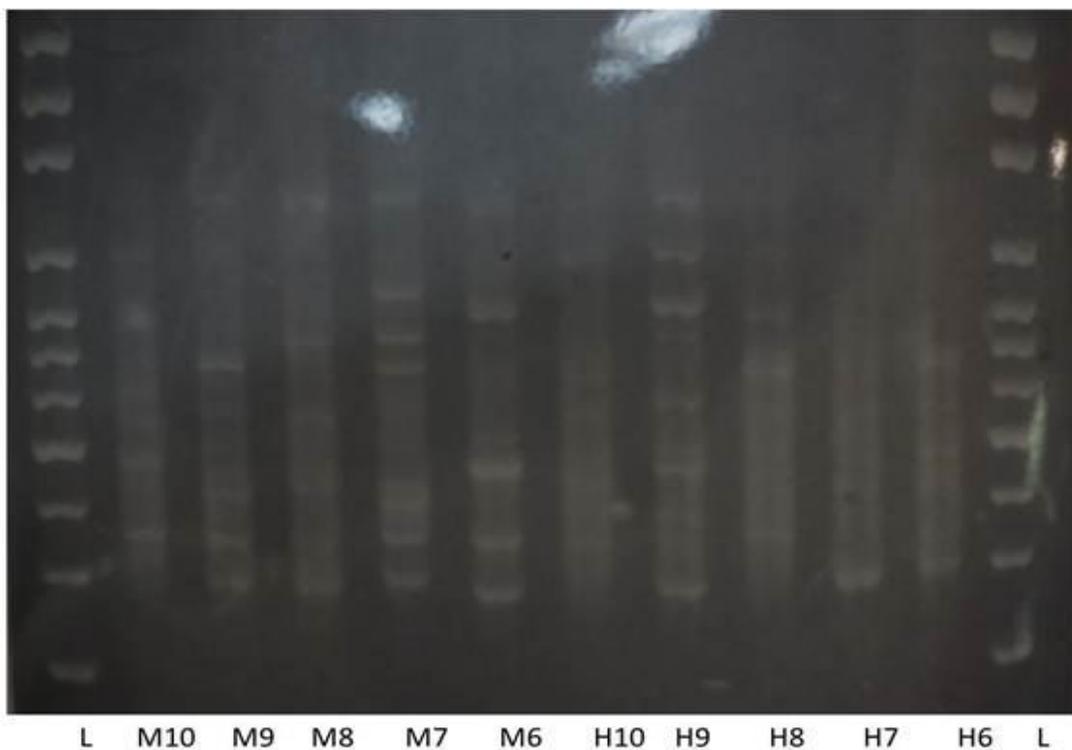


Figura 5.3 Patrón de bandas entre hembras y machos de sotol amplificadas con iniciador ISSR - OH

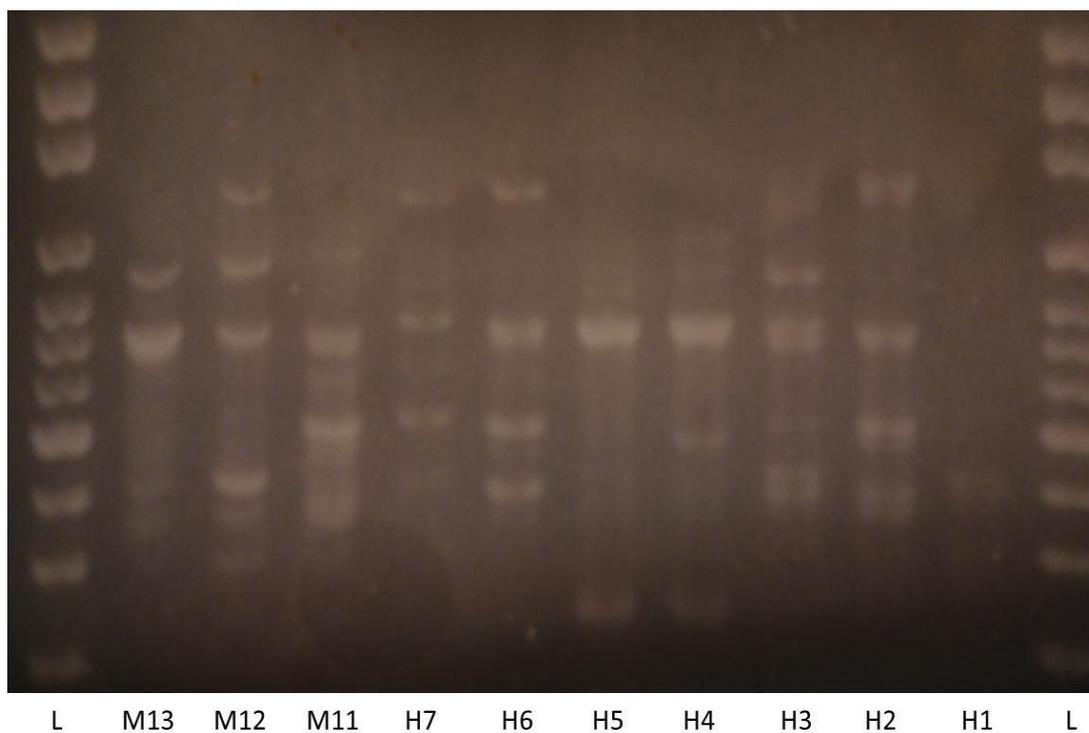


Figura 5.4 Patrón de bandas entre hembras y machos de sotol amplificadas con iniciador ISSR - W7.

### **5.8.1 Exploración de marcadores ISSR candidatos asociados al sexo.**

La prueba exacta de Fisher demostró que ninguno de los tres iniciadores ISSRs que amplificaron bandas con alta nitidez y bien diferenciadas, presentaron bandas candidatas asociada o ligada exclusivamente a uno de los sexos. Esto muy probablemente se debe a que la secuencia del iniciador no coincide con la que determina el sexo.

### **5.9 Proporción de sexos en poblaciones de sotol.**

De los 400 datos obtenidos y analizados con prueba de chi cuadrada global entre sexos y proporciones entre localidades bajo hipótesis nula de igualdad de proporciones de sexos entre localidades, se rechaza la proporción 1:1 (Cuadro 5.11), y se plantea que la especie presenta un sesgo hacia las hembras en todas las subpoblaciones y que la proporción entre sexos es igual en todas las subpoblaciones. Además que la proporción entre sexos de los individuos que participan en cada ciclo reproductivo fluctúa en cada año de floración (Figura 5.5) ya que el número de plantas por sexo que florecen varía anualmente lo que dificulta definir una proporción en un año de toma de datos. El sesgo general hacia las hembras coincide con lo observado en El Novillo por Hernández-Quintero (2012).

Cuadro 5.11 Registro de hembras y machos en floración de 2010 al 2013.

Localidad	Hembras (H)	Machos (M)	Total	Hembras %	Machos %	Proporción (H/M)	p-valor Chi cuadrada
Buenvista	89	79	168	53	47	1.12	0.4873
El Novillo	67	38	106	63.8	36.2	1.76	0.0063
San Miguel	53	44	97	57.3	42.7	1.20	0.4073
San Lorenzo	19	11	30	63.33	36.67	1.73	0.1985
Total	228	172	400	57.64	42.36	1.32	0.0066
Chi cuadrada para heterogeneidad de proporciones de sexos entre localidades							0.283

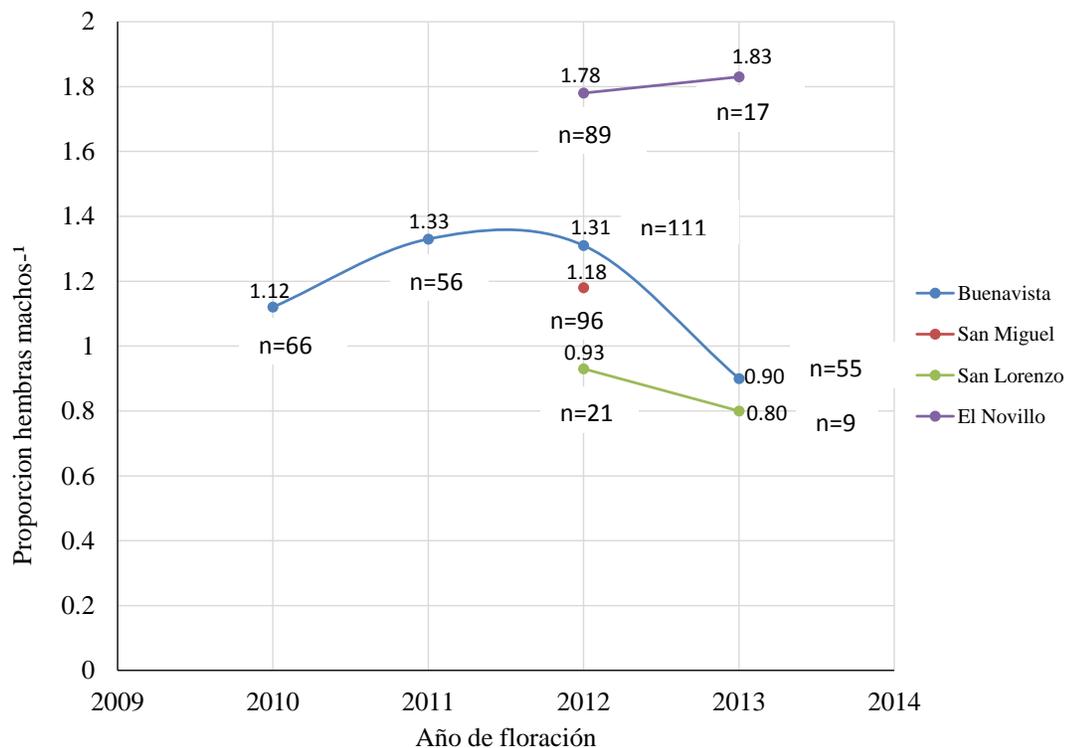
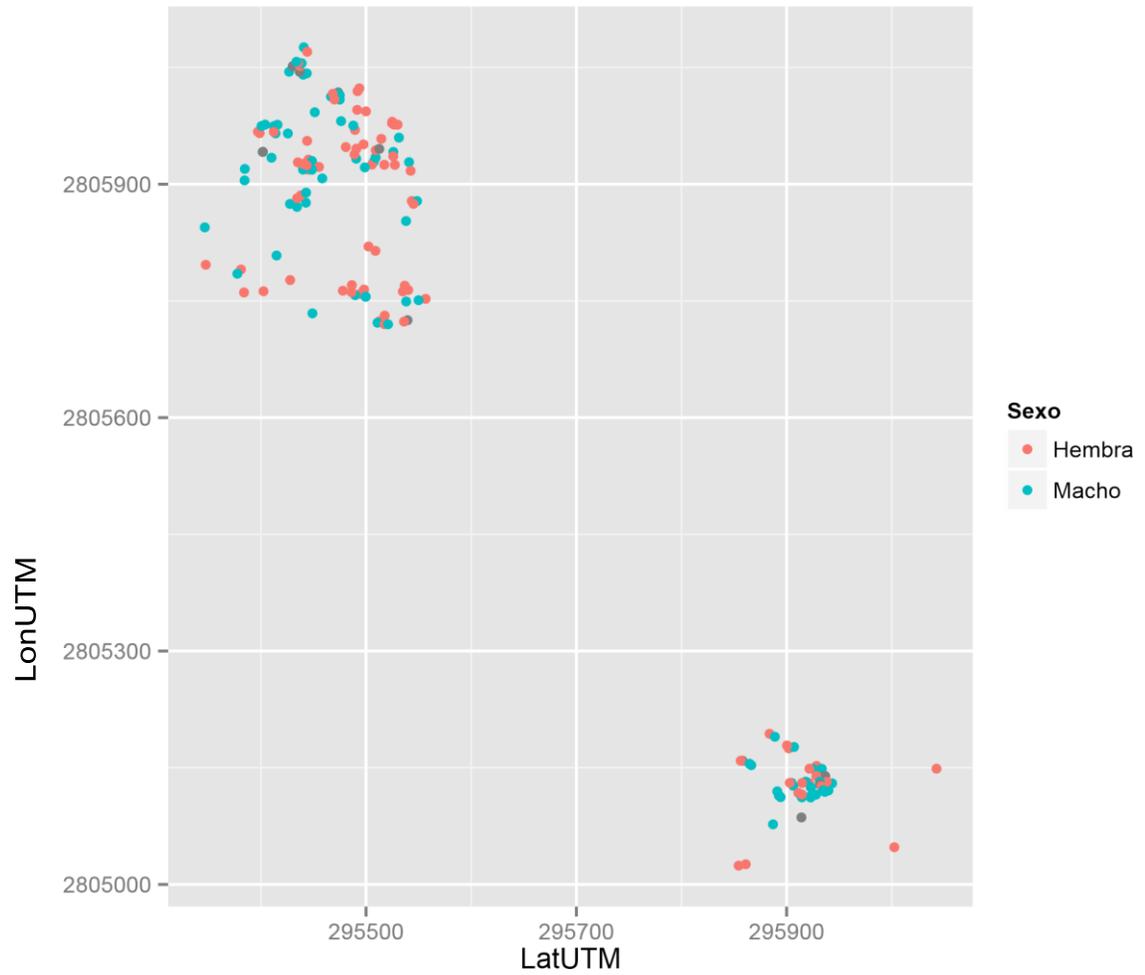


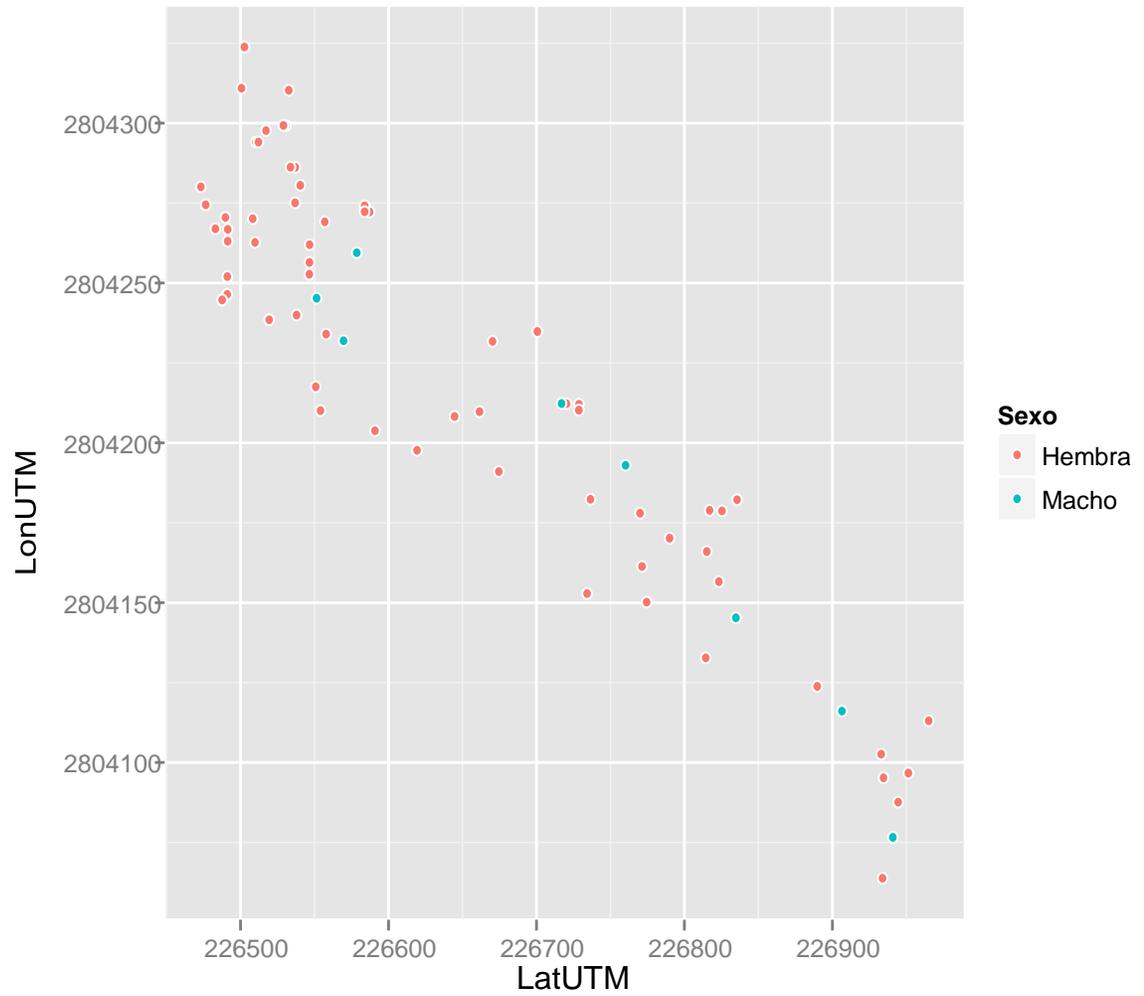
Figura 5.5 Proporción anual entre sexos en cuatro poblaciones de *Dasylyrion cedrosanum*.  $n$  = número de plantas en floración por año en la población.

### 5.10 Análisis de distribución espacial entre sexos.

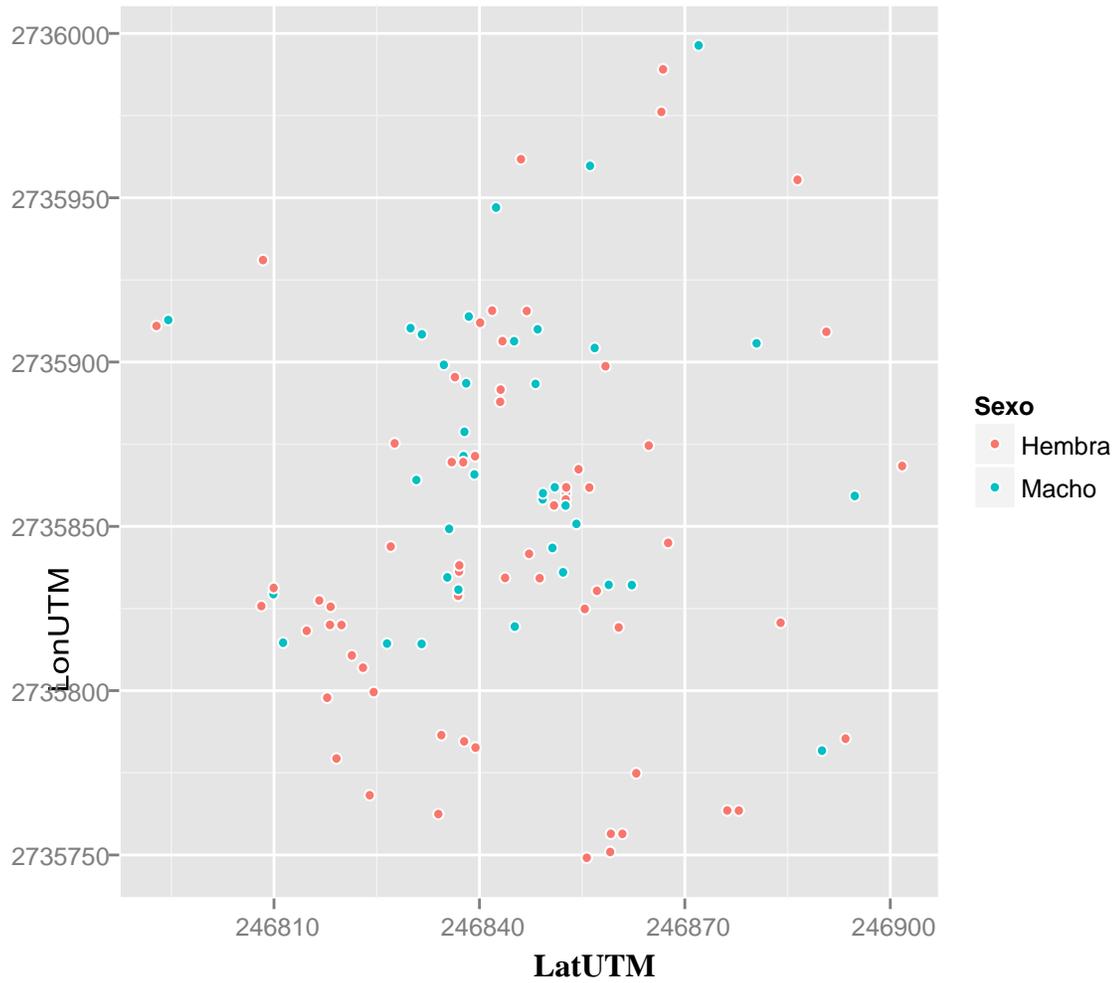
Con la exploración de las coordenadas de todas las plantas documentadas en las cinco poblaciones evaluadas, se logró generar cinco imágenes que revelan la distribución de los sexos en cada población (Figura 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10). No se revela un patrón específico de distribución, que revele una tendencia a agregación entre individuos del mismo sexo. Ya que esto requiere ser probado estadísticamente, estos datos son el punto de partida para que en estudios posteriores se realicen análisis matemáticos en búsqueda de relaciones implícitas en la distribución de los sexos en poblaciones naturales de sotol.



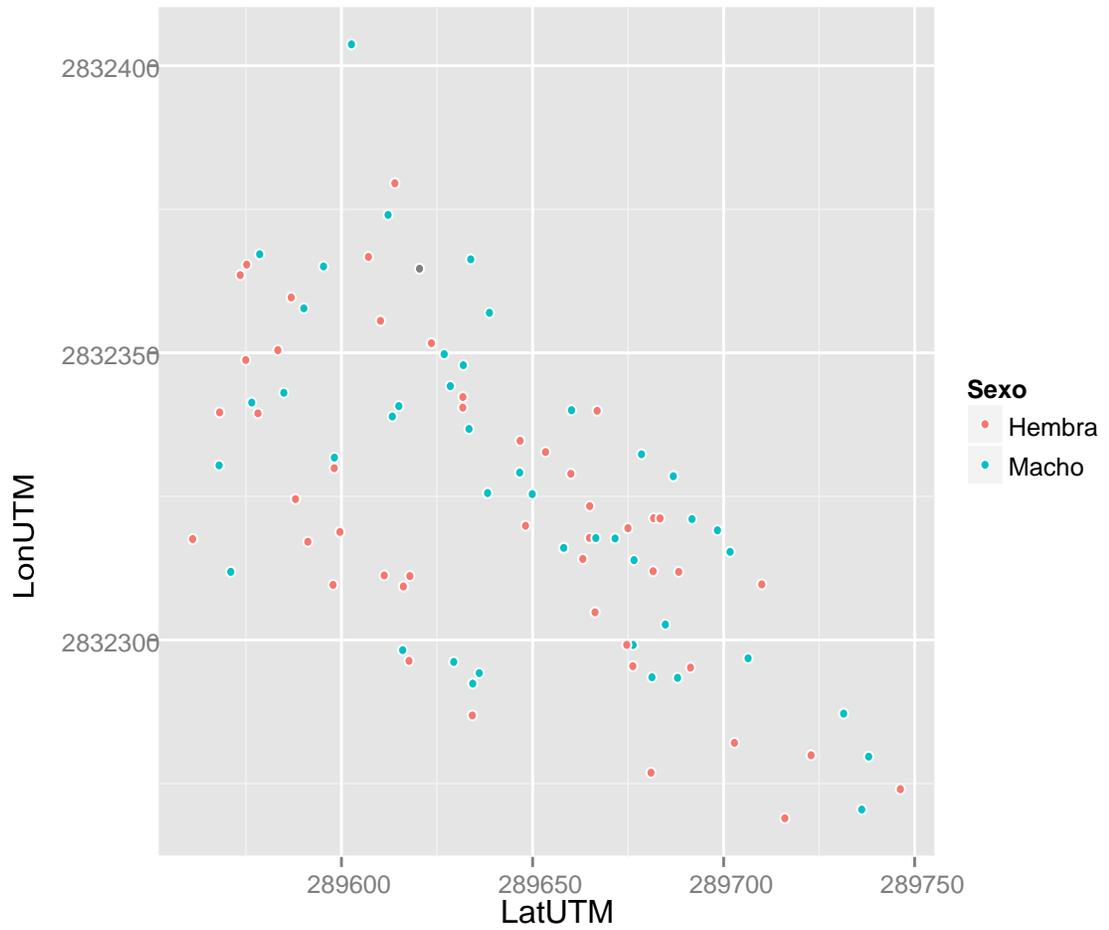
**Figura 5.6** Distribución de plantas hembras y machos en la población de Buenavista.



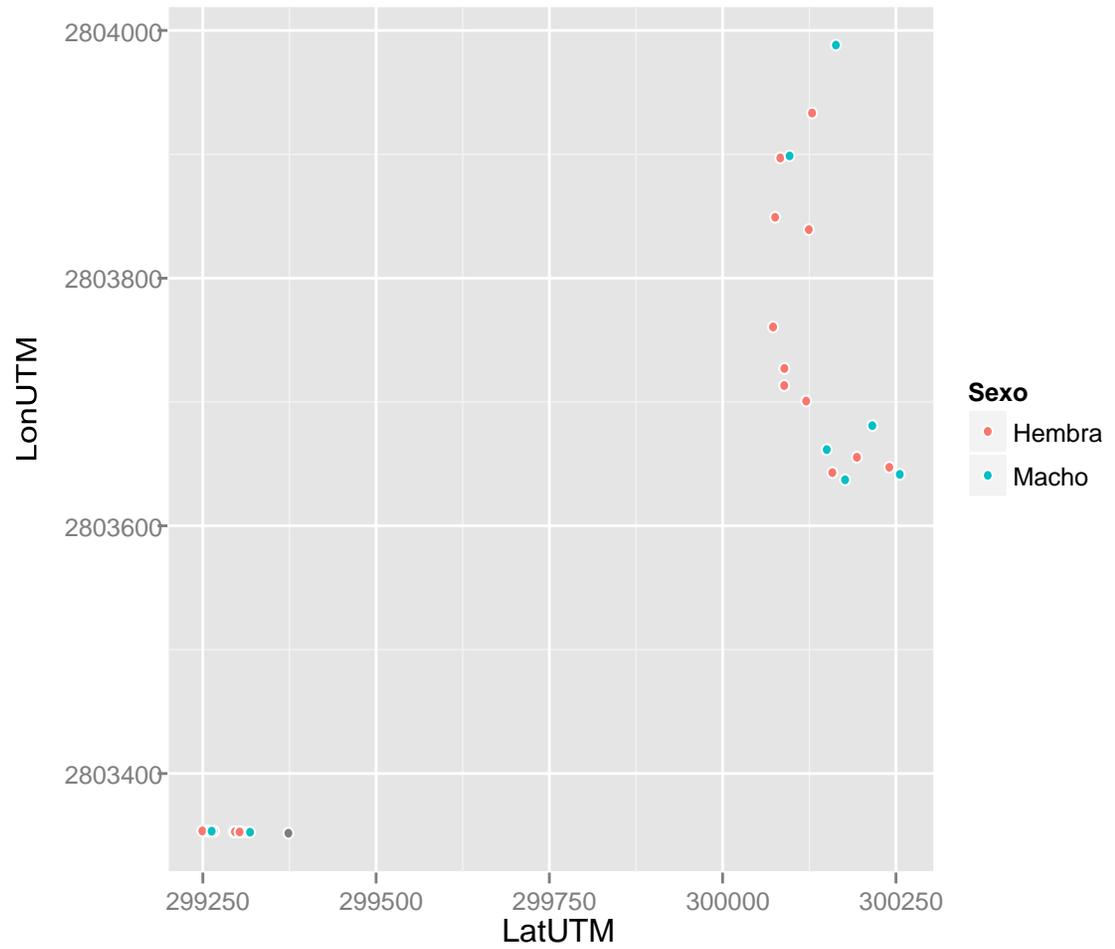
**Figura 5.7** Distribución de plantas hembras y machos en la población de General Cepeda.



**Figura 5.8** Distribución de plantas hembras y machos en la población El Novillo.



**Figura 5.9** Distribución de plantas hembras y machos en la población de San Miguel.



**Figura 5.10** Distribución de plantas hembras y machos en la población de El Cañón de San Lorenzo.

## VI. CONCLUSIONES

La diversidad genética de las poblaciones silvestres de sotol evaluadas presenta valores que van desde 0.01476 en El Novillo hasta un máximo de 0.10502 en Buenavista, con estos datos se podría definir donde coleccionar más o menos individuos por poblaciones en futuros programas de conservación de la especie.

Debido a que no se encontró estructura o subdivisión genética entre las cuatro poblaciones de sotol evaluadas, se considera que todas ellas pudieran formar parte de una gran población, por lo cual es factible establecer programas de reforestación de una localidad intercambiando material genético como semillas o plantas de cualquiera de las otras tres poblaciones consideradas en este estudio, sin el riesgo de cambiar o insertar nuevas frecuencias génicas, conservando así la capacidad adaptativa de la población en dicha localidad.

No se encontraron polimorfismos genéticos asociados con el sexo de las plantas en este estudio, por lo que se requiere continuar probando con más loci marcadores.

Los ISSR son marcadores moleculares técnicamente factibles para hacer estudios de diversidad genética en sotol.

Hay tendencia a una mayor proporción de hembras en la población general de *D. cedrosanum*, sin evidencia de heterogeneidad de las mismas entre localidades, lo cual soporta la ausencia de efecto de localidades en la determinación del sexo.

## VII. LITERATURA CITADA

Bogler D J (1994) Taxonomy and phylogeny of *Dasyvirion* (Nolinaceae). Ph. D. Dissertation. The University of Texas at Austin. 583 p.

Cabrero J, J P M Camacho (2002) Fundamentos de genética de poblaciones. Evolución La base de la Biología. Proyecto Sur de Ediciones, S.L. 83-126 p.

CONABIO (2009) Diversidad Genética. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. URL.  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/divgenetica.html>

FAO (2014) Glosario. Semilla, Diversidad y Desarrollo. URL.  
<http://www.fao.org/economic/esa/seed2d/glossary/es/>

Abarca A C, E Cuevas y C A Domínguez (2010) Es la Evolución de la Dioecia un Callejón sin Salida. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp: 11-13.

González A, X Aguirre (2007) Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). Herramientas Moleculares. In: Ecología Molecular. L E Eguiarte, V Souza y X Aguirre (comps). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. pp:567-569.

Hernández J D (2012) Estudio cromosómico y de la estructura de la proporción de sexos en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*). Tesis Maestría. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Herrera E B, R Rodríguez-Herrera, C N Aguilar, J C Contreras-Esquivel, H de la Garza-Toledo (2006) El sotol una planta con pasado presente y futuro. Cienciacierta. Departamento de divulgación científica de la coordinación general de estudios de postgrado e investigación. Universidad Autónoma de Coahuila. pp:21-22.

Lewontin R C (1974) The Genetic Basis of Evolutionary Change. Columbia University Press. 112 p.

Lynch M y B G Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology (1994) 3: pp 91 – 99.

Lopes M A, K Takasaki, D E Bostwick, T Helentjaris, and BA Larkins (1995) Identification of two opaque2 modifier loci in Quality Protein Maize. Molecular and General Genetics 247, 603-613.

Olhagaray R E (1994) Diagnóstico de la actividad forestal en la región lagunera.

Avances de investigación. CIFAP-RASPA. INIFAP. 22 p.

Ortiz-Covarrubias Y D C (2013) Estudios comparativos de marcadores moleculares y

valores C de DNA entre plantas estaminadas y pistiladas de sotol (*Dasyilirion*

*cedrosanum*). Tesis Maestría en Ciencias en Fitomejoramiento. Universidad

Autónoma Agraria Antonio Narro. 57 p.

Pradeep M, N Sarla and E A Siddiq (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR)

polymorphism and its application in plant breeding. Euphytic. 128:9 p.

R Torices (2009) Evolución de los sistemas sexuales no hermafroditas en Asteraceae.

Ecosistemas 18(2):109-115.

Sánchez B M (1984) Estudio de la germinación de diferentes especies amenazadas de

extinción. Informe de actividades del laboratorio de semillas. Programa forestal

del estado de Durango/SARH. 9 p.

Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. In: Ecological Genetics, Editado

por L. Real. Princeton. URL.

<http://evolucion.fcien.edu.uy/Lecturas/Slatkin1994.pdf>

Sica M, G Gamba, S Montieri, L Gaudio and S Aceto (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. BMC Genetics. 6:17 doi: 10.1186/1471-2156-617. URL.

<http://www.biomedcentral.com/1471-2156/6/17>.

Vekemans X (2002) *AFLP-SURV* 1.0. A program for genetic diversity analysis with AFLP (and RAPD) population data. URL.

[http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/fichiers/manual\\_AFLPsurv.pdf](http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/fichiers/manual_AFLPsurv.pdf)

Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijan, T Lee, M Hornes, A Fritjers, J Pot, J Peleman, M Kuiper y M Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. Oxford University Press. 23: 4407- 4414.

World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://apps.kew.org/wcsp/>Retrieved 2012-12-02.

Zietkiewicz E, A Rafalski and D Labuda (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20:176-183.