

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Caracterización molecular de 13 especies de *Agave* L. utilizando como marcador un fragmento del gen *rbcL*

Por:

LUZ GRACIELA RAMOS MARÍN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización molecular de 13 especies de *Agave* L. utilizando como marcador un
fragmento del gen *rbcL*

Por:

LUZ GRACIELA RAMOS MARÍN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de asesoría:



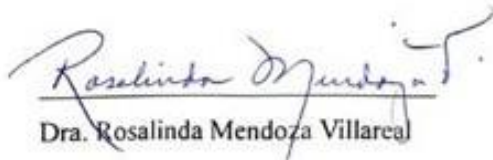
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor Principal Interno



Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes

Asesor Principal Externo



Dra. Rosalinda Mendoza Villareal

Co-asesor



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Co-asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Caracterización molecular de 13 especies de *Agave* L. utilizando como marcador un
fragmento del gen *rbcL*.

Por:

LUZ GRACIELA RAMOS MARÍN

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:



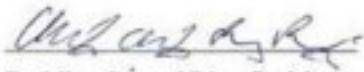
M.V. Silvia Patricia Acuña Álvarez

Presidente



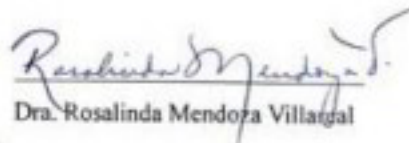
Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes

Secretario



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Sinodal



Dra. Rosalinda Mendoza Villalgal

Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre, 2025

DERECHOS DE AUTOR Y DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir la verdad que no se incurrió plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

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

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Luz Graciela Ramos Marin
Autor Principal

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, mi Alma Mater, mi baile inolvidable. Por permitirme vivir una de las mejores etapas de mi vida. Por proporcionarme todos los recursos necesarios para que mi formación fuese buena y brindarme todas las herramientas posibles para conocer mi pasión profesional. Por haberme permitido conocer un sinfín de personas que ahora son parte importante en mi vida.

Al **Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez**, por ser un excelente doctor y mentor. Por crear un excelente espacio de aprendizaje para todos aquellos que amamos la ciencia y por brindarnos todas las herramientas posibles para desarrollar habilidades para nuestro futuro.

A la **Dra. Flor Cristina Pacheco Reyes**, por todos sus conocimientos transmitidos, por su gran paciencia para guiarme en este camino y por ser una gran mentora.

Al **Ing. Froylan Meraz Saavedra**, por su apoyo técnico en la colecta de campo de las muestras de agave utilizadas en este trabajo.

A todos los que alguna vez formaron y forman el **Molecular Genetic Working Group**, por todo lo que me enseñaron pacientemente y por ser fuente de inspiración en mi desarrollo.

A **Johana Vergara López**, por ser la mejor compañera de trabajo que he podido tener y por brindarme tu amistad incondicional.

A **Bryan Ademir Rivera Hernández**, por ser mi compañero y amigo en días oscuros y acompañarme en los momentos más memorables de la vida universitaria. Gracias Bryan.

A **Johan Yaniel Vergara Alvarado**, por acompañarme durante estos grandes cinco años y por el apoyo mutuo que siempre ha habido. Te quiero bro.

A **Mireya Sánchez Salinas**. Por acompañarme en este camino. Por conocerme, aceptarme y quererme. Por estar en las buenas y en las malas. Por escucharme y apoyarme incondicionalmente. Por aconsejarme siempre que lo he necesitado. Por la amistad que hemos construido con paciencia y cariño. Te quiero gato.

A **Salma Neyra Hernández Jerónimo, Fátima Rojas Gutiérrez, Karol Valdespino Gutiérrez, José Alberto Guerrero Vaca y Julio Vicente García Reyes**. Por haberme permitido conocer un tipo de amistad único, un amor bonito e inocente, un amor que cura y da paz, un amor incondicional. Me enseñaron que aún existen almas bonitas. Se convirtieron en un lugar seguro al que siempre pude y podré recurrir incondicionalmente. Fueron lo más bonito que pudo ocurrir en mi etapa universitaria, y siempre tendrán un cacho de mi corazón por eso. Los quiero.

A **Saulo Florencio Cortez Ramírez**. Por todo tu amor, tu inspiración, tu motivación y tu apoyo incondicional. Por ser mi refugio en los momentos difíciles y mi cómplice en los más felices. Por aceptar lo que soy. Por todo lo que hemos construido y crecido juntos. Por recordarme, día con día, que no estoy sola. Gracias por caminar esta vida conmigo. Cor tuum in meo pectore habitat.

A **todos** los que fueron parte de mi vida en el camino universitario y llegaron a dejar huella en mi ser.

DEDICATORIA

A Gabriel Ramos Marín.

Mi hermano amado, mi acompañante en esta y todas las vidas. Eres mi mayor inspiración y motivación. Este trabajo es dedicado a ti porque eres la luz que guía mis pasos. Aspiro a ser la mejor hermana que puedas tener, y ser un lugar seguro donde puedas encontrar apoyo incondicional en las decisiones que tomes para el camino que construyas para ti. Deseo que seas todo lo que quieras ser, y espero que este trabajo sea un pequeño recordatorio y motivación para ti de que todo es posible, aún si se ve muy lejos. Te amo.

A mi madre, María Lusmar Marín Trinidad y a mi padre, José Gabriel Ramos Duarte.

Por todo su apoyo incondicional desde que habito esta tierra. Por brindarme todos los conocimientos y consejos que me han dado. Por inspirarme a ser mi mejor versión. Por permitirme abrir mis alas. Por confiar en mí en cada paso que he dado. Por motivarme y apoyarme a seguir el camino que mi corazón desea. Este trabajo se los dedico a ustedes, porque no es solo mío, ustedes fueron pilares para su culminación. Mi llegada a este punto no hubiese sido posible sin ustedes a mi lado. Gracias por todo. Los amo.

A Rosalba Marín Trinidad.

Su bendición acompaña mis pasos todos los días. Gracias por quererme tanto y por ser un apoyo incondicional para mí desde que tengo memoria. La quiero mucho.

A toda mi familia.

Por llenarme de amor y apoyo. Por motivarme siempre a ser lo mejor que puedo ser. Por confiar en mi camino y por inspirarme. Los llevo en mi corazón todos los días. Los quiero mucho.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	2
3.1. Objetivos específicos	2
4. HIPÓTESIS	2
5. REVISIÓN DE LITERATURA	3
5.1. Orden Asparagales	3
5.2. Familia Asparagaceae	3
5.3. Subfamilia Agavoideae	4
5.4. Género <i>Agave</i> L.	5
5.5. Subgéneros de <i>Agave</i> L.	7
5.6. Códigos de Barras de ADN	7
5.7. Características de los Códigos de Barras de ADN	8
5.8. Códigos de Barras de ADN centrales en plantas	9
5.9. Gen <i>rbcL</i>	12
5.10. Códigos de Barras de ADN en Asparagáceas	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17

6.1.	Colecta de material vegetal en campo.....	17
6.2.	Extracción de ADN genómico.....	17
6.3.	Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	18
6.4.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
6.5.	Secuenciación.....	19
6.6.	Análisis bioinformático	19
6.6.1.	Edición de electroferogramas	20
6.6.2.	Descarga de secuencias de referencia	20
6.6.3.	Creación de biblioteca con secuencias de consulta.....	20
6.6.4.	Alineamiento de secuencias.....	21
6.6.5.	Evaluación de la calidad de las secuencias.....	21
6.6.6.	BLAST.....	21
6.6.7.	Construcción del dendrograma	22
7.	RESULTADOS	23
7.1.	Colecta de material vegetal en campo.....	23
7.2.	Extracción de ADN genómico.....	24
7.3.	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	25
7.4.	Análisis bioinformáticos	26
7.4.1.	Corte de extremos	28
7.4.2.	Creación de bibliotecas (referencia y consulta) y alineamiento de secuencias	29
7.4.3.	Análisis de las propiedades de las secuencias de consulta	31
7.4.4.	Análisis BLAST.....	32
7.4.5.	Construcción del dendrograma	33
8.	DISCUSIÓN	34
8.1.	Extracción y amplificación de ADN genómico.....	34

8.2.	Propiedades de las secuencias de consulta y análisis BLAST	36
8.3.	Análisis del dendrograma.....	37
9.	CONCLUSIONES	39
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de agave en México en el periodo 2020-2023. Fuente: (SIAP (SAGARPA), 2025)	6
Tabla 2. Volúmenes y concentraciones de los componentes utilizados para la PCR (GoTaq Green Master Mix, Promega TM).	19
Tabla 3. Cebador <i>rbcL</i> y programa de PCR utilizado para la amplificación de ADN.	19
Tabla 4. Alícuotas de ADN genómico utilizadas para generar los productos de PCR.	25
Tabla 5. Secuencias de referencia obtenidas del repositorio BOLD Systems.	29
Tabla 6. Secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del NCBI.	30
Tabla 7. BLAST en NCBI.	32
Tabla 8. BLAST en BOLD Systems.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético presentado por la APG IV (2016) mostrando la clasificación subfamiliar aceptada actualmente.	5
Figura 2. Estados de la República Mexicana con mayor riqueza de especies de <i>Agave</i> reportadas. Imagen modificada de Eguiarte et al., (2021).	5
Figura 3. Locus comúnmente utilizados como Códigos de Barras de ADN y su rango de identificación taxonómica. Imagen modificada de Zhu et al., (2022).	10
Figura 4. Estructura de la proteína RuBisCo y su función en el proceso de fotosíntesis. Esquema creado a partir de imágenes modificadas de Amritkar et al., (2024) y Bracher et al., (2017).	13
Figura 5. Flujo de trabajo para la técnica de Código de Barras. Imagen creada en https://BioRender.com	14
Figura 6. Filogenia molecular del género <i>Agave</i> L. y otros taxones a partir de ITS (Jiménez-Barron et al., 2020).	16
Figura 7. Especies de <i>Agave</i> L. muestreadas en el Jardín Botánico "Gustavo Aguirre Benavidez". 1) <i>Agave salmiana</i> , 2) <i>Agave striata</i> , 3) <i>Agave lechuguilla</i> , 4) <i>Agave parrasana</i> , 5) <i>Agave bracteosa</i> , 6) <i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>	23
Figura 8. ADN genómico de especies de <i>Agave</i> . a) Carril 1 y 13: <i>Agave angustifolia</i> ; carril 2 y 14: <i>Agave tequilana</i> ; carril 3 y 15: <i>Agave americana</i> L.; carril 4 y 16: <i>Agave salmiana</i> ; carril 5 y 17: <i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i> ; carril 6 y 18: <i>Agave ovatifolia</i> ; carril 7 y 19: <i>Agave garciae-mendozae</i> ; carril 8 y 20: <i>Agave bracteosa</i> ; carril 9 y 21: <i>Agave striata</i> ; carril 10 y 22: <i>Agave lechuguilla</i> ; carril 11 y 23: <i>Agave mitis</i> ; carril 12 y 24: <i>Agave parrasana</i> . b) Carril 25, 26 y 27: <i>Agave obscura</i>	24
Figura 9. Productos de PCR obtenidos con el marcador <i>rbcL</i> . Carril 1: <i>Agave angustifolia</i> ; carril 2: <i>Agave tequilana</i> ; carril 3: <i>Agave americana</i> L.; carril 4: <i>Agave salmiana</i> ; carril 5: <i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i> ; carril 6: <i>Agave ovatifolia</i> ; carril 7: <i>Agave garciae-mendozae</i> ; carril 8: Marcador de peso molecular; carril 9: <i>Agave bracteosa</i> ; carril 10: <i>Agave striata</i> ; carril 11: <i>Agave lechuguilla</i> ; carril 12: <i>Agave mitis</i> ; carril 13: <i>Agave parrasana</i> ; carril 14: <i>Agave obscura</i>	26
Figura 10. Electroferograma de <i>Agave bracteosa</i>	27
Figura 11. Electroferograma de <i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>	27
Figura 12. Electroferograma de <i>Agave tequilana</i>	27

Figura 13. Electroferograma de <i>Agave lechuguilla</i>	28
Figura 14. Extremo 5' del electroferograma de <i>Agave americana</i> L.	28
Figura 15. Extremo 3' del electroferograma de <i>Agave americana</i> L.	29
Figura 16. Región del alineamiento con secuencias de consulta y secuencias de referencia de ambas bases de datos.	30
Figura 17. Región del alineamiento de las secuencias de consulta.	30
Figura 18. Sitios conservados derivados de la alineación de secuencias de consulta.	31
Figura 19. Sitios variables observados en la alineación de secuencias de consulta.	31
Figura 20. Dendrograma generado con secuencias de <i>Agave</i> obtenidas con el marcador <i>rbcL</i>	33

RESUMEN

Las plantas de agave son de gran relevancia en México debido a su estatus cultural, histórico y social, así como por sus diversas aplicaciones en la industria. No obstante, las técnicas de identificación y clasificación taxonómica clásicas no han logrado comprender la compleja diversidad y filogenia del género, por lo que, la aplicación de técnicas molecular como los “Códigos de Barras de ADN” son cada vez más indispensables. En este trabajo de investigación se utilizó esta técnica molecular aplicando una región del gen *rbcL* como marcador para analizar su capacidad de identificación y discriminación en 13 especies del género *Agave* L. Para ello se llevó a cabo la colecta de tejido vegetal y se realizó la extracción de ADN seguido de la amplificación por PCR de todas las muestras vegetales colectadas. Después, se analizaron las secuencias obtenidas (secuencias de consulta) con apoyo de los programas bioinformáticos SnapGene Viewer y MEGA X y se crearon dos bibliotecas en formato FASTA. Posteriormente se evaluó el poder discriminatorio de *rbcL* mediante el análisis BLAST para cada secuencia de consulta generada. Finalmente, con el método estadístico de unión de vecinos (neighbor-joining) se generó un dendrograma para 12 secuencias de consulta en el que se observó la formación de tres clados monofiléticos bien definidos, sin embargo, los clados no lograron agruparse de acuerdo con la clasificación de subgéneros propuesta en literatura. En conclusión, es necesario continuar con investigación relacionada con la capacidad discriminatoria del marcador *rbcL* en especies de *Agave* L.

Palabras clave: *Agave*, *rbcL*, BLAST, discriminatorio.

ABSTRACT

Agave plants hold great significance in Mexico due to their cultural, historical and social value, as well as their several applications in industry. Nevertheless, traditional taxonomic identification and classification techniques have not been enough to fully understand the complex diversity of the genus. Consequently, the application of other techniques, such as “DNA barcoding” has become essential. In this research study, the “DNA barcoding” technique was applied using a region of the *rbcL* gene as a molecular marker to assess its ability to identify and characterize 13 species of *Agave* L. Plant tissue was collected and DNA extraction was performed, followed by PCR amplification of all collected samples. The obtained sequences (query sequences) were then analyzed using the bioinformatic programs SnapGene Viewer and MEGA X, and two libraries were created in FASTA format. Subsequently, the discriminatory power of *rbcL* was evaluated through BLAST analyses for each generated query sequence. Finally, a dendrogram for 12 query sequences was generated using the neighbor-joining statistical method, revealing the formation of three well-defined monophyletic clades; however, the obtained clades did not align with the proposed subgenres classification. In conclusion, further research is needed regarding the discriminatory capacity of *rbcL* marker in *Agave* L. species.

Keywords: *Agave*, *rbcL*, BLAST, discriminatory.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Agave* L. comprende un extenso grupo de plantas ampliamente distribuidas en distintas regiones de América, siendo México su centro de origen. El uso y aplicación de estas especies por la sociedad mexicana ha sido fundamental, por lo que su importancia recae en lo económico, cultural, histórico y social. En la actualidad, los agaves son reconocidos por sus aplicaciones en la industria de bebidas, fibras, alimentos, productos medicinales y la producción de biocombustibles a partir de residuos (García-Mendoza et al., 2017). Asimismo, las plantas del género han suscitado gran interés puesto que cuentan con una gran capacidad de adaptación a climas adversos (Good-Avila et al., 2006). Por este motivo, en los últimos años se han presentado estrategias de conservación para los agaves (Camacho et al., 2023).

Sin embargo, la clasificación taxonómica del género sigue siendo compleja. Las categorizaciones de la taxonomía clásica se basan en la morfología de las plantas, las cuales pueden variar dependiendo de factores ambientales y los tiempos de reproducción. Aunado a esto, el descubrimiento de nuevas especies del género se traduce en una brecha de conocimiento sobre sus relaciones evolutivas. Por ello, es primordial establecer herramientas que permitan identificar con facilidad y precisión diferentes especies. Específicamente la caracterización molecular ha mostrado resultados eficaces en la identificación de un gran número de plantas.

Los “Códigos de barras de ADN” nacen como una técnica complementaria para esta necesidad, la cual involucra el empleo de secuencias pequeñas del genoma de un organismo con suficiente variabilidad entre especies, pero conservadas dentro de la misma especie. En plantas se estableció la combinación de los locus *rbcL* + *matK*, debido a que las limitaciones de uno contrarrestan al otro y esto resulta en porcentajes de amplificación, secuenciación y variabilidad suficientes para realizar una discriminación taxonómica adecuada (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

Actualmente, un gran número de especies de agaves no cuentan con una caracterización molecular, por ello, diferentes investigaciones se han concentrado en generar secuencias moleculares de estas especies con el fin de generar datos que permitan un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas de la familia Asparagaceae.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar y analizar la capacidad discriminativa taxonómica del locus *rbcL* aplicado en 13 especies de *Agave* L.

1. JUSTIFICACIÓN

La mayor diversidad de especies de *Agave* L. se encuentra en México, sin embargo, su identificación morfológica es limitada sin la presencia de caracteres vegetales efímeros, lo cual dificulta conocer el número real de especies distribuidas en el país. Asimismo, tampoco se han logrado discernir las relaciones taxonómicas del grupo, por lo que la caracterización molecular de un mayor número de especies ayudará a coadyuvar en gran parte dichos problemas.

2. OBJETIVOS

Caracterizar molecularmente utilizando el fragmento *rbcL* diferentes especies del género *Agave* L. distribuidas en el sureste de Coahuila, México, para determinar así el poder discriminatorio del marcador.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar las secuencias de ADN de especies de agave utilizando el marcador molecular *rbcL*.
- Determinar el poder discriminatorio del fragmento *rbcL*.

3. HIPÓTESIS

La aplicación del marcador *rbcL* en diferentes especies de *Agave* L. permitirá conocer las secuencias de ADN de diferentes especies de *Agave* L., así como su poder discriminatorio.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Orden Asparagales

El orden Asparagales fue propuesto por Huber en 1969 (Zayas, 1991). Siguiendo sus ideas, Dahlgren et al. (1985) consideraron a Asparagales como un orden separado en una de las obras literarias taxonómicas más reconocidas hasta hoy día: “Las familias de las Monocotiledóneas”. Sin embargo, el orden fue reconocido formalmente hace 35 años, esto debido a la falta de fundamento en las pruebas filogenéticas y morfológicas expuestas en su momento (Hernández-Sandoval et al., 2016; Seberg et al., 2012).

El número y clasificación de familias dentro del orden Asparagales y sus interrelaciones ha sido controversial a lo largo de los años (Seberg et al., 2012). El APG (Angiosperm Phylogeny Group), con el paso del tiempo, ha reconocido diferentes números y clasificaciones: 29 familias (APG, 1998); 14 familias, más 11 opcionales (APG II, 2003); y 14 familias (APG III, 2009).

Sin embargo, la más reciente clasificación filogenética sugiere que el orden Asparagales está compuesto por 14 familias: Amaryllidaceae, Asparagaceae, Asphodelaceae, Asteliaceae, Blandfordiaceae, Boryaceae, Doryanthaceae, Hypoxidaceae, Iridaceae, Ixioliriaceae, Lanariaceae, Orchidaceae, Tecophilaeaceae y Xeronemataceae; incluyendo alrededor de 1,122 géneros y 36,265 especies aproximadamente (APG IV, 2016).

4.2. Familia Asparagaceae

La familia Asparagaceae ha sido reconocida por diversos sistemas de clasificación (APG III, 2009; APG IV, 2016). Su primera descripción formal fue propuesta por Stephano Endlicher en el año 1841 con el nombre “Agavaceae”, aunque tuvo poco reconocimiento en la comunidad botánica (Bogler et al., 2006; Endlicher, 1841). Fue en 1934 cuando adquirió popularidad cuando Hutchinson (1934) volvió a proponerla.

El orden sistemático de la familia ha sido revisado y discutido a través de los años por diferentes autores y desde panoramas tanto filogenéticos (Bogler et al., 2006; Eguiarte et al., 1994, 2000), como ecológicos y de conservación (García-Mendoza & Galván-V, 1995), refiriéndose a esta con

el nombre de “Agavaceae”. Sin embargo, el nombre vigente para la familia es “Asparagaceae” (APG IV, 2016).

Las asparagáceas son plantas endémicas de América que se distribuyen desde en las zonas cálidas y secas del suroeste de Estados Unidos de América, México, la cuenca del Caribe, hasta Bolivia y Paraguay (Bogler et al., 2006; García-Mendoza et al., 2017). Constituyen una familia de plantas que forman rosetas, generalmente espinosas, de gran belleza, valor ornamental, significancia cultural e importancia económica (Bogler et al., 2006).

Actualmente, Asparagaceae se divide en 7 subfamilias: Agavoideae, Aphyllanthoideae, Asparagoideae, Brodiaeoideae, Lomandroideae, Nolinoideae y Scilloideae (APG IV, 2016).

4.3. Subfamilia Agavoideae

El esquema de subfamilias para la familia Asparagaceae fue presentado por Chase et al. (2009) con el objetivo de facilitar la interpretación y orden de los taxones. Sin embargo, en el año 2000, Fay et al. (2000) ya habían presentado un estudio filogenético en donde se muestra que las subfamilias presentadas por Chase et al. (2009) forman un clado bien sustentado.

Hoy en día, la clasificación subfamiliar es aceptada por el sistema de clasificación del APG IV (2016) (**Figura 1**), el cual sugiere 24 géneros para la subfamilia Agavoideae: *Agave* L., *Anemarrhena* Bunge, *Anthericum* L., *Behnia* Didrichsen, *Beschorneria* Kunth, *Camassia* Lindley, *Chlorogalum* Kunth, *Chlorophytum* Ker-Gawler, *Diamena* Ravenna, *Diora* Ravenna, *Echeandra* Ortega, *Furcraea* Ventenat, *Hagenbachia* Nees & Martius, *Hastingia* S. Watson, *Herreria* Ruiz & Pavón, *Herreriopsis* Perrier, *Hesperaloe* Engelman, *Hesperocallis* A. Gray, *Hesperoyucca* Baker, *Hosta*, *Leucocrinum* A. Gray, *Paradisea* Mazzuc, *Schoenolirion* E. M. Durand, y *Yucca* L.

Por su parte, la presencia de este grupo de plantas en México es sobresaliente ya que es el octavo género con mayor riqueza en el país en donde se han reportado 159 especies aproximadamente (**Figura 2**) (García-Mendoza et al., 2019). Asimismo, constituye un conjunto de monocotiledóneas de gran importancia económica social, ambiental y cultural (Colunga-GarcíaMarín & May-Pat, 1993; Eguiarte et al., 2021). De acuerdo con Gentry (1982), “la gran diversidad genética de un género rico en usos potenciales cayó en manos de los pueblos que desarrollaron el principal centro agrícola de las Américas”.

El aprovechamiento de las plantas de agave es extraordinario; tanto la planta, como los órganos de esta y sus derivados son ampliamente utilizados como alimento, bebida, combustibles, material de construcción, medicina y para la obtención de fibras (García-Mendoza et al., 2017). Un ejemplo de la presencia de este género de plantas desde épocas prehispánicas son los “mezcales”, un grupo de especies que representaban una fuente básica de alimentación para las poblaciones de México y Centroamérica (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007).

La historia de la diversificación de *Agave* L. se divide en tres periodos: (i) su uso como alimento; (ii) su uso en la elaboración de bebidas fermentadas (pulque); y, (iii) su uso en la elaboración de bebidas destiladas (mezcal y tequila) (Colunga-GarcíaMarín & Zizumbo-Villarreal, 2007). Actualmente, es inherente la importancia económica nacional que tiene la producción de bebidas destiladas, tales como el mezcal y el tequila (**Tabla 1**) (García-Mendoza et al., 2017; Trejo et al., 2018).

Tabla 1. Producción de agave en México en el periodo 2020-2023. Fuente: (SIAP (SAGARPA), 2025)

Año	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (ton)	Valor de la producción (miles de pesos)
2023	239,271.06	33,267.32	2,577,995.41	48,284,822.74
2022	143,866.69	26,561.68	2,036,474.88	35,631,941.56
2021	139,314.17	24,184.00	1,776,720.56	29,644,217.53
2020	129,981.60	25,741.38	1,913,025.96	33,403,629.49

Los estudios recientes en especies de agave van en función de la ecología y fisiología que guardan estas especies, así como en la importancia económica de las cuales se puede obtener alcohol para biocombustibles (Govea-Paz et al., 2024; Ortíz et al., 2024) y bebidas, sumado a la producción de fibras (García et al., 2022; Hulle et al., 2015), y oligofructanos (Ávila-Fernández et al., 2007;

Mellado-Mojica et al., 2017). La extensión de tales mercados ha ocasionado un incremento en el interés de este conjunto de plantas. debido a esto, a través de los años se han presentado diversos programas de mejoramiento genético alrededor del mundo para desarrollar especies de agave con características deseadas específicas (Flores-Benítez et al., 2007; Gao et al., 2014; García-Mendoza et al., 2017; Ruvalcaba-Ruíz et al., 2012).

Desde el punto de vista agroecológico y etnobiológico los agaves se caracterizan por sus múltiples usos, mismos que varían dependiendo de la región donde se encuentren (García-Herrera et al., 2010). Destaca la relación simbiótica mutualista entre las especies de *Agave* L. y las poblaciones humanas (García-Mendoza et al., 2017; Gentry, 1982).

4.5. Subgéneros de *Agave* L.

Los antecedentes más antiguos de la clasificación por subgéneros para el género *Agave* datan de 1859, cuando Salm-Dyck describió 59 especies que dividió en cinco secciones (Salm-Reifferscheidt, 1859). Asimismo, Berger (2006) escribió una monografía en la que describió 274 especies y reconoció tres subgéneros: *Manfreda*, *Littataeae* y *Euagave*. No obstante, en las clasificaciones que realizaban no incluían aspectos relevantes de las plantas (Gentry, 1982). Fue hasta 1982 cuando Gentry (1982) presentó “Agaves de Norteamérica Continental”, libro que significaría uno de los mayores aportes a la clasificación de las especies del género y en el cual organizó *Agave* L. de acuerdo a sus características florales y vegetativas (tipo de inflorescencia y disposición de las flores). De este modo, reconoció dos subgéneros: *Agave* y *Littataeae*.

4.6. Códigos de Barras de ADN

- Gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (COI)

El término de “Códigos de Barras de ADN” fue presentado por primera vez por el Dr. Paul Hebert y su grupo de trabajo de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá, en el año 2003 (Ramos et al., 2012).

Los Códigos de Barras de ADN constituyen una herramienta diseñada para identificar de forma rápida y precisa las especies a partir de una secuencia de ADN corta y estándar (Paz et al., 2011). Esta herramienta se basa en la premisa de que esta secuencia de ADN es capaz de distinguir

individuos de una especie porque el nivel de variación genética entre especies (interespecífica) es mucho más grande a la que se presenta dentro de una misma especie (intraespecífica) (Chase & Fay, 2009; Hajibabaei et al., 2007).

La metodología de códigos de barras de ADN se propuso inicialmente para la identificación de animales con el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (COI) (Hebert, et al., 2003; Paz et al., 2011). Dicho gen fue el punto de partida para la creación de un sistema de bioidentificación global de especies animales. De esta manera, Hebert, et al., (2003) realizaron el primer estudio de identificación biológica en especies del orden Lepidóptera, en el cual demostraron que el nivel de identificación del gen COI alcanzó el 100%. Consecuentemente, Remigio & Hebert (2003) realizaron un experimento en gasterópodos que mostró la utilidad de COI para identificar molecularmente a estos organismos. En el año 2004, en Ontario, Canadá, se realizó otro experimento que verificó la efectividad del gen COI en 260 especies de aves de Norte América (Hebert et al., 2004).

La efectividad del gen COI para identificar y discriminar especies con precisión en diferentes grupos taxonómicos ha sido ampliamente estudiada en algas rojas (Saunders, 2005); peces (Ward et al., 2005; Zemlak et al., 2009); aves (Kerr et al., 2007; Tavares & Baker, 2008); arañas (Barrett & Hebert, 2005; Tahir et al., 2019); y diversos organismos del orden de los insectos, como lepidópteros (Hajibabaei et al., 2006; Hebert, et al., 2004), efemerópteros (Ball et al., 2005), dípteros (Kumar et al., 2007); anfibios (Dang et al., 2016; Xia et al., 2012); moscas (Rivera & Currie, 2009), entre otros.

4.7. Características de los Códigos de Barras de ADN

Para que una región del genoma pueda ser utilizada como Código de Barras de ADN es necesario que esta permita distinguir entre variación interespecífica (entre especies estrechamente relacionadas) y variación intraespecífica (dentro de la misma especie) (Paz et al., 2011).

Además, según Kress & Erickson (2008), una región de ADN utilizada como Código de Barras debe cumplir con tres criterios:

- a) Contar con variabilidad y divergencia genética a nivel de especie.
- b) Contener regiones flanqueantes conservadas para crear cebadores universales para PCR en aplicaciones taxonómicas.

- c) Tener una longitud de secuencia relativamente corta que sea favorable para las técnicas actuales de extracción y amplificación de ADN.

4.8. Códigos de Barras de ADN centrales en plantas

Los diversos estudios realizados con el gen COI resultaron ser eficientes para la identificación biológica de organismos del reino animal. Sin embargo, con el paso del tiempo y las investigaciones, fue evidente que este gen no tenía la misma eficiencia en todos los grupos de organismos.

Cuando se hace referencia a grupos de organismos como las plantas superiores y hongos, la efectividad de identificación biológica del gen COI resultó ser deficiente por su baja tasa de sustitución de nucleótidos, es decir, presentaba una tasa de evolución muy baja (Chase et al., 2005, 2007; Chase & Fay, 2009), por lo que no fue posible utilizarlo como un Código de Barras de ADN universal (CBOL Plant Working Group et al., 2009; Fazekas et al., 2008; Kress et al., 2005). Debido a esto, fue necesario realizar más investigación y experimentos con la finalidad de encontrar un locus funcional para grupos vegetales (Hollingsworth, 2011).

Diversos locus específicos para plantas han sido estudiados y propuestos, incluyendo genes codificantes y espaciadores no codificantes plastidiales y nucleares (**Figura 3**) (Kress & Erickson, 2007). Hoy en día están establecidos dos locus centrales para el estudio de estos organismos: “*rbcL*” (ribulosa-1.5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) y “*matK*” (maturasa K). *rbcL* es el gen mejor caracterizado; además, la universalidad de los cebadores que amplifican esta región facilita su uso y por consiguiente permite una adecuada recuperabilidad de secuencias bidireccionales de alta calidad. Por otro lado, *matK* es uno de los locus codificantes plastidiales que evolucionan más rápido, por lo que permite obtener niveles más altos de discriminación de especies (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

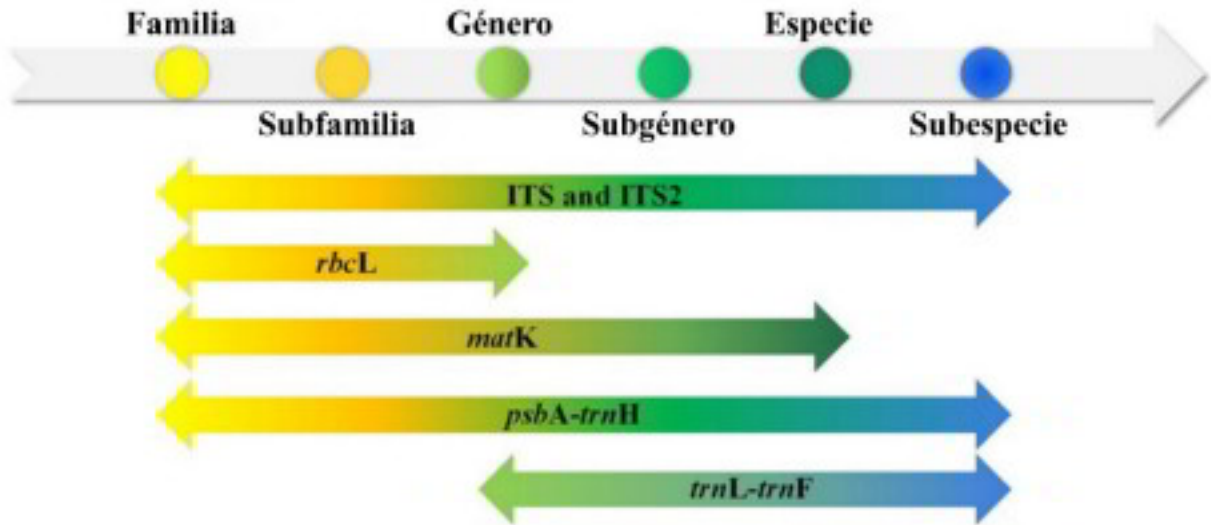


Figura 3. Locus comúnmente utilizados como Códigos de Barras de ADN y su rango de identificación taxonómica. Imagen modificada de Zhu et al., (2022).

En 2005, Kress et al., (2005) realizaron un experimento que sugirió el uso de múltiples regiones de ADN que podrían ser utilizadas como Códigos de Barras en plantas: el espaciador transcrito interno (ITS) y el espaciador intergénico plastidial *trnH-psbA*, demostrando su potencial uso como Códigos de Barras en plantas con eficiencia de identificación a nivel de género. Gracias a esta investigación, Rubinoff et al., (2006) propusieron que la combinación de estas dos regiones de ADN plastidial podía ser el mejor candidato posible para su uso como Código de Barras de ADN en plantas.

En el transcurso del mismo año, Chase et al., (2005) realizaron un experimento en plantas del género *Moraea* y *Protea* para evaluar la capacidad real de discriminación biológica entre especies de los marcadores más utilizados en esos tiempos: *rbcL* y el espaciador transcrito interno de las subunidades del ADN ribosomal nuclear (ITS), demostrando que ambas regiones se desempeñan eficientemente como Códigos de Barras de ADN.

Un año después, Newmaster et al., (2006) realizaron una investigación en la que analizaron 10,300 secuencias de *rbcL* de diferentes grupos de especies publicadas en el GenBank, con lo cual demostraron que este locus era capaz de discriminar a nivel de especie, pero solo en algunos grupos específicos, mientras que en otros grupos su capacidad de discriminación resultó ser deficiente. Así determinaron que podía ser utilizado como base en un enfoque multigénico y escalonado para los Códigos de Barras de ADN de las plantas terrestres, es decir, como un enfoque que incluyera regiones codificantes, así como no codificantes. Siguiendo el hilo de esta investigación, Shaw

et al., (2007) concluyeron que podían existir regiones del genoma del cloroplasto que no se habían utilizado y que probablemente presentarían niveles de variabilidad mayores a los reportados hasta el momento. Por esto, presentaron una nueva investigación en donde realizaron un estudio de la variabilidad de diversas regiones no exploradas, comparando tres pares de secuencias de genomas del cloroplasto en tres diferentes linajes de angiospermas: Astéridas (*Atropa* vs. *Nicotiana*); Rosidae (*Lotus* vs. *Medicago*); y Monocotiledóneas (*Saccharum* vs. *Oryza*), concluyendo que nueve regiones no exploradas anteriormente mostraron mejores niveles de variabilidad (caracteres informativos) (*rpl32-trnL*, *trnQ-5'-rps16*, *3'trnV-ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *3'rps16-5'trnK*, *atpI-atpH*, y *petL-psbE*).

Chase et al., (2007) propusieron dos opciones de tres regiones en combinación de varias regiones del genoma plastidial: a) *rpoC1*, *rpoB* y *matK*; y b) *rpoC1*, *matK* y *psbA-trnH*. Demostraron que la primera combinación de regiones (a) mostraba un nivel de discriminación mucho mayor de especies, no así con la segunda combinación (b). Sin embargo, esta poseía características favorables para la obtención de buenos resultados de distancias evolutivas, por lo que también fue presentada como una combinación viable.

Por su parte, CBOL Plant Working Group et al., (2009) realizaron una evaluación del funcionamiento de las diferentes regiones de ADN plastidial reportadas hasta ese momento (el espaciador *atpF-atpH*, el gen *matK*, el gen *rbcL*, el gen *rpoB*, el gen *rpoC1*, el espaciador *psbK-psbI* y el espaciador *trnH-psbA*) para resumir y proveer a la comunidad con una recomendación verídica sobre cual locus funcionaba mejor como Código de Barras. La conclusión, basada en la recuperabilidad, calidad de las secuencias y los niveles de discriminación entre especies, determinó que la mejor combinación de locus era *rbcL* + *matK*.

De este modo, en el año 2011, Kesanahurti et al., (2011) realizaron un estudio dirigido a comprobar la efectividad de *rbcL* para discriminar especies a partir de tejidos de la raíz de distintas especies. Este locus tuvo una efectividad del 96% en la amplificación de las muestras. Además, la identificación de especies también fue exitosa (cerca del 85%), ya que se alcanzaron discriminaciones a nivel de familia, género e incluso a nivel de especie.

A pesar de la existencia de los locus establecidos, con los años se han realizado investigaciones centradas en locus diferentes que han presentado resultados útiles, pero que no son consideradas universalmente ya que no cumplen con los criterios establecidos para un Código de Barras, tales

como la recuperabilidad del locus con solo un par de cebadores; la posibilidad de obtener una secuencia bidireccional con poco requerimiento, y; que provea la máxima discriminación entre especies (CBOL Plant Working Group et al., 2009).

4.9. Gen *rbcL*

El gen *rbcL* se ubica en el cloroplasto y posee una importancia vital para la vida en la Tierra, ya que forma parte de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa o “RuBisCo”, la cual desempeña un rol central en la asimilación de CO₂ en todos los organismos fotosintéticos (**Figura 4**) (Parry et al., 2013; Pottier et al., 2018).

La RuBisCo es una holoenzima compuesta por dos subunidades: la subunidad grande (LSU, “large subunit”) y la subunidad pequeña (SSU, “small subunit”); cada una codificada por un gen diferente (*rbcL* y *rbcS*, respectivamente) (Berry et al., 2016; Patel & Berry, 2008). La subunidad grande (LSU) destaca porque es responsable de la actividad catalítica de la enzima, además, su eficiencia y especificidad están altamente influenciadas por la disposición de aminoácidos de la misma, dictada por la secuencia de nucleótidos de *rbcL*. Debido a esto, su secuencia ha sido ampliamente estudiada ya que cualquier variación, por mínima que sea, puede afectar la función de RuBisCo y la eficiencia fotosintética de la planta. Con esto se deduce que cualquier variabilidad genética que pueda presentarse es resultado de procesos evolutivos relacionados al hábitat, clima, entre otras condiciones a los que se han sometido las plantas a través de millones de años (Biology Insights Team, 2024).

El uso de *rbcL* es una alternativa viable para estudios de relaciones filogenéticas en niveles taxonómicos superiores por la baja tasa de sustitución de nucleótidos que presenta (poder discriminatorio moderado) (Hasebe et al., 1994; Hollingsworth, 2011). Al ser un gen ubicado en el genoma del cloroplasto, su naturaleza conservadora permite que las diferentes tasas de cambio de nucleótidos hagan que diferentes partes del genoma sean apropiadas para diferentes niveles de comparación (Raubeson & Jansen, 2005).

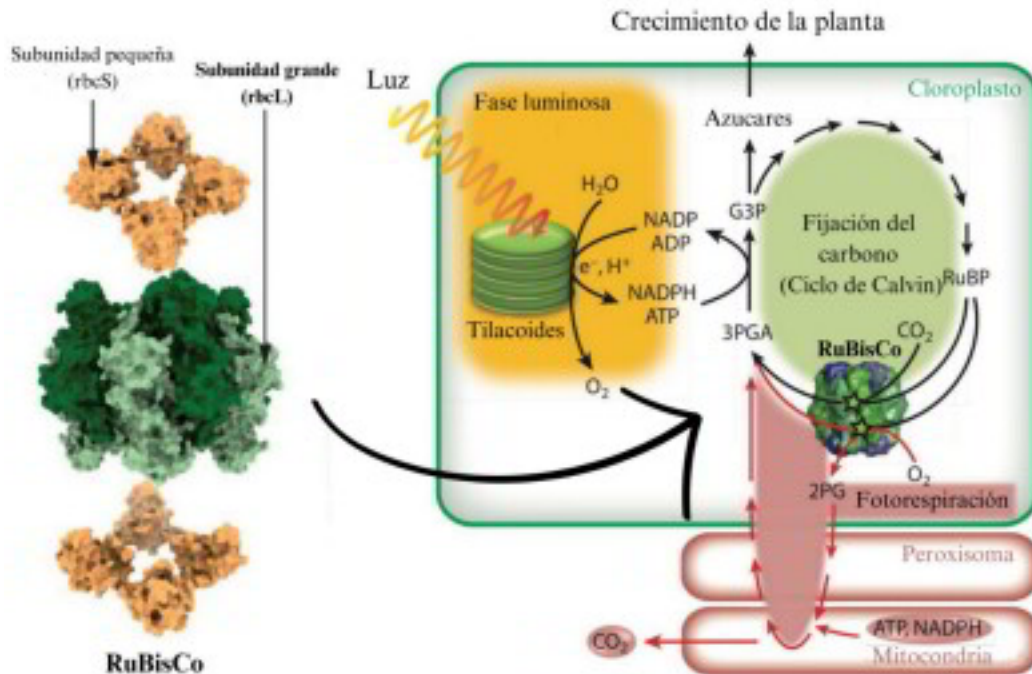


Figura 4. Estructura de la proteína RuBisCo y su función en el proceso de fotosíntesis. Esquema creado a partir de imágenes modificadas de Amritkar et al., (2024) y Bracher et al., (2017).

4.10. Códigos de Barras de ADN en Asparagáceas

En el caso específico de las asparagáceas, el uso de los Códigos de Barras de ADN ha sido aplicado a través de los años con diferentes propósitos (**Figura 5**). Según García-Mendoza et al., (2017), “la caracterización molecular y el conocimiento de los genomas de las Asparagáceas permitirán conocer las funciones codificadas por sus genomas y deducir sus relaciones de parentesco, esto es, una clasificación taxonómica más exacta. Estos conocimientos facilitarán la identificación de los parientes silvestres de los agaves cultivados, la caracterización de variedades, la identificación de genes asociados a adaptaciones locales, de fragmentos de plantas, de productos biotecnológicos novedosos, de enzimas, etc.”

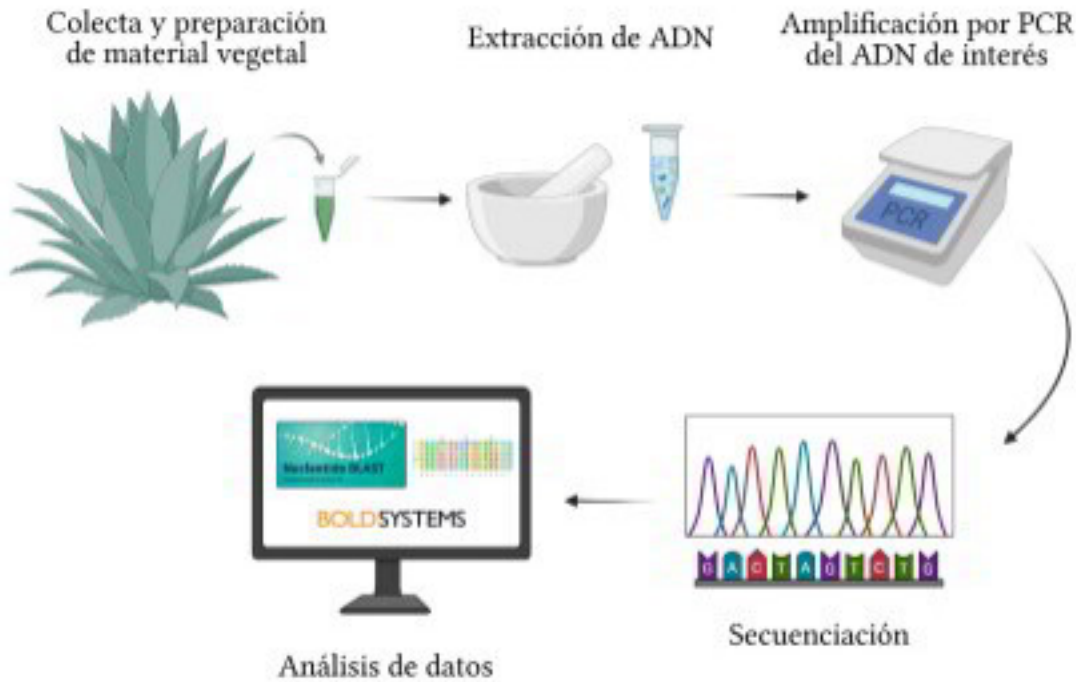


Figura 5. Flujo de trabajo para la técnica de Código de Barras. Imagen creada en <https://BioRender.com>

Uno de los antecedentes más antiguos sobre el uso de marcadores moleculares para construir las relaciones filogenéticas de la familia Asparagaceae fue la investigación realizada por Eguiarte (1995), quien analizó la ubicación de la familia (reportada como “Agavaceae”) dentro de las monocotiledóneas, así como la relación filogenética con otros géneros emparentados con la familia. Asimismo, realizó la estimación de un reloj molecular para tener una idea del origen de la familia y cuándo se separó de los grupos con los que se relacionaba. Eguiarte realizó un análisis de máxima verosimilitud, considerado el más poderoso para la reconstrucción filogenética en ese momento, esto le permitió mostrar las relaciones entre las diferentes Agaváceas. Por otro lado, el reloj molecular arrojó un tiempo promedio para el origen de la familia cercano a los 14 millones de años y una separación de las Nolinaceae hace aproximadamente 47 millones de años.

A su vez, Bogler et al., (2006) presentaron una investigación similar en la que mostraron que la combinación de los locus *ndhF*, *rbcL* e ITS resultaba en una discriminación filogenética más acertada para las especies dentro de la familia Asparagaceae. Además, sugirieron que la adición de más secuencias y taxones pudo haber mejorado la resolución y estabilidad de las relaciones presentadas en su estudio.

Más tarde, Good-Avila et al., (2006) analizaron un número mayor de secuencias de *Agave* de los locus *rbcL* y *trnL* + *trnL-trnF*, y concluyeron que el surgimiento de *Agave sensu lato* (incluidos *Polianthes*, *Manfreda* y *Prochnyanthes*) fue hace 7.9 – 9.8 millones de años, esto sugirió que el origen del género era mucho más joven que el surgimiento del orden Asparagales, el cual osciló entre 60 – 69 millones de años atrás.

En 2012, Rai et al., (2012) presentaron una investigación en donde realizaron la identificación taxonómica de dos especies de la familia de las Asparagáceas (*Asparagus gonoclados* y *Asparagus racemosus*), y dos especies de la familia Asclepiadaceae (*Decalepis hamiltonii* y *Hemidesmus indicus*). El objetivo de la investigación fue explorar la utilidad de los Códigos de Barras de ADN para evaluar las variaciones específicas entre las especies de cada familia, así como las divergencias específicas dentro de las especies de la misma familia. Así pues, mostraron que el locus ITS2 funcionaba correctamente como identificador en las especies de la familia Asclepiadaceae, no así con las especies de la familia Asparagaceae, lo cual sugirió que, para las especies de esta familia, el locus ITS2 no funcionaría como un marcador efectivo.

Meses después en la Universidad de Arkansas se presentó un estudio que evaluó la utilidad de los locus *matK* y *rbcL*, establecidos por el CBOL Plant Working Group et al., (2009), para esclarecer las relaciones taxonómicas de especies del género *Manfreda*. Sin embargo, se estableció que el desempeño de dichos locus fue insuficiente para inferir una filogenia significativa en especies del género. Asimismo, se propuso el uso de ITS como código de barras para la identificación de híbridos intergenéricos de *Agave* L., *Manfreda* y *Polianthes*, demostrando su ineficacia para utilizarse como Código de Barras en dichas plantas (Ritchie, 2012).

En 2015 se llevó a cabo una investigación dirigida a evaluar la capacidad de dos locus ampliamente utilizados como Códigos de Barras (*rbcL* y *matK*) para discriminar e identificar dos especies del género *Dasyllirion* (*D. cedrosanum* y *D. berlandieri*). Los resultados mostraron que ambos locus son de utilidad, sin embargo, se enfatizó que el locus *matK* fue más preciso en la discriminación (Jáuregui, 2015). Similarmente, Orozco-Sifuentes (2019) desarrolló un experimento en el que utilizó los locus *matK* y *rbcL* para caracterizar, identificar y construir árboles filogenéticos de especies del género *Dasyllirion*.

En 2016, McKain et al., (2016) utilizaron genomas completos del cloroplasto de 20 especies de *Yucca* y de géneros estrechamente relacionados para investigar las relaciones evolutivas entre estas especies.

Estudios filogenéticos más recientes muestran la gran utilidad de los Códigos de Barras de ADN en especies del género *Agave* L. En 2020, Jiménez-Barron et al., (2020) realizaron un análisis filogenético de 107 secuencias del género *Agave* L. para reconstruir las relaciones filogenéticas del género (**Figura 6**). También demostraron que el locus ITS sobresalió por proveer con resoluciones mayores y mejores valores de soporte. Sumado a lo anterior, también se han presentado resultados favorables en la discriminación entre especies del género *Agave* y *Dasyliirion* con el uso de los locus *rbcL* y *matK* (Márquez, 2022; Ortiz-Covarrubias et al., 2022).

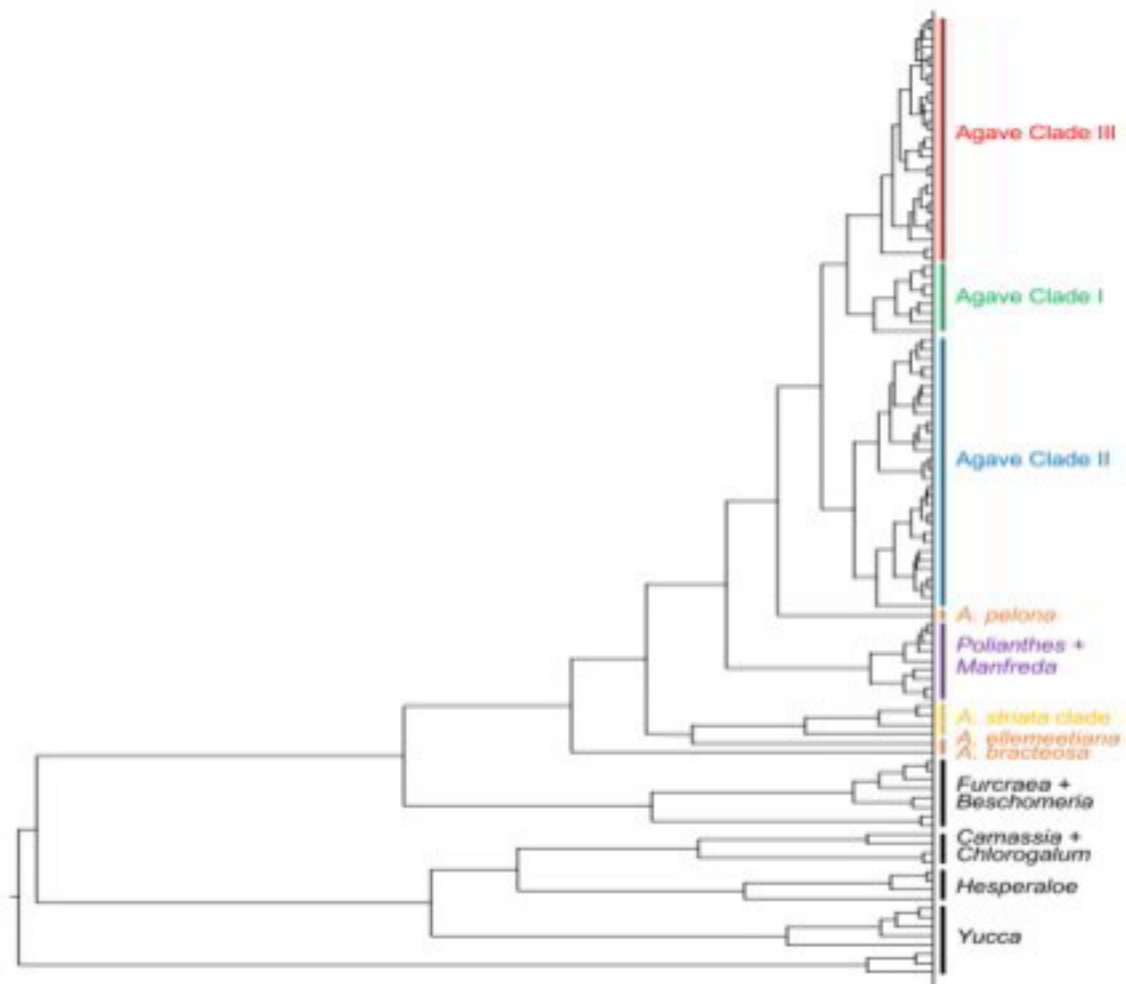


Figura 6. Filogenia molecular del género *Agave* L. y otros taxones a partir de ITS como marcador según Jiménez-Barron et al., (2020). Imagen de Eguiarte et al., (2021).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Colecta de material vegetal en campo

La colecta de material vegetal se realizó en las instalaciones del Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavidez” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), debido a que alberga gran diversidad de especies del género *Agave*. En dicho jardín se colectaron 12 especies, las cuales se enlistan a continuación: *Agave angustifolia*, *Agave tequilana*, *Agave americana* L., *Agave salmiana*, *Agave americana* var. *marginata*, *Agave ovatifolia*, *Agave garciae-mendozae*, *Agave bracteosa*, *Agave striata*, *Agave lechuguilla*, *Agave mitis* y *Agave parrasana*. La especie *Agave obscura* se colectó del Parque Ecológico “El Chapulín”, ubicado en Saltillo, Coahuila, México. Se eligieron hojas sanas y se tomó un fragmento de aproximadamente 3 x 3 cm, los cuales se colocaron en un tubo de plástico de 15 ml que contenía 5 ml de alcohol al 96% para su conservación y análisis posteriores.

5.2. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo la metodología establecida en el protocolo de extracción de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) “modificado”, propuesto por Sharma et al., (2003), el cual se describe a continuación:

Se tomó un fragmento de 1 x 1 centímetros (cm) del tejido vegetal colectado y con la ayuda de un mortero se realizó la molienda agregando 100 microlitros (μ l) de CTAB a temperatura ambiente hasta obtener un producto fino y homogéneo. Posteriormente, la mezcla obtenida se transfirió a un microtubo de 1.5 mililitros (ml) con ayuda de una espátula y se adicionaron 600 μ l de CTAB a temperatura ambiente. Seguido a esto, la mezcla se incubó a 60° centígrados ($^{\circ}$ C) /50 revoluciones por minuto (rpm)/30 minutos en un incumix ThermoMixer (Select Bioproducts, México). Una vez cumplido el tiempo de incubación se añadieron 0.6 volúmenes de la solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inmersión durante 15 min. Después se centrifugó a 14000 rpm/10 min con la ayuda de una microcentrífuga (Spectrafue 16M, Labnet International, USA). Cuidadosamente se transfirieron 300 – 400 μ l de la fase acuosa resultante a un microtubo de 1.5 ml y se añadieron dos volúmenes de alcohol absoluto con el objetivo de precipitar el ADN. A

continuación, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm/5 min para sedimentar el ADN. Posteriormente, se decantó el sobrenadante cuidando la pastilla obtenida. Por último, se realizaron dos lavados utilizando etanol al 70% (400 µl y 300 µl respectivamente) y centrifugando a 14000 rpm/ 5 min entre cada lavado. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C para análisis posteriores.

Nota: en algunos casos, las alícuotas de ADN resultantes se incubaron durante 15 min a 65°C/50 rpm y se agitaron con vórtex por dos minutos con el objetivo de obtener una alícuota totalmente homogénea para los análisis posteriores.

5.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para comprobar la calidad y la concentración del ADN extraído se utilizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa, utilizando un gel al 0.8% a 90 voltios, durante 1:40 h, para la carga de muestras se utilizaron 3 µl de ADN + 1.5 µl de buffer de carga (5x Green GoTaq Buffer + Diamond Nuclei Acid Dye, ambos de Promega™). El gel resultante se visualizó mediante el Sistema de Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA).

5.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de la región *rbcL* se utilizó el estuche comercial GoTaq Green Master Mix, 2X™ (Promega, USA), según las especificaciones del fabricante.

La metodología para la amplificación del ADN consistió en la preparación de una mezcla de componentes con un volumen total de 25 µl para cada una de las 13 muestras analizadas (**Tabla 2** y **Tabla 3**).

La verificación de los productos de PCR (amplicones) obtenidos se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 90 voltios durante 1:40 h, y se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb (Axygen, USA). Para la carga de muestras se mezclaron 4 µl de ADN + 2 µl de buffer de carga. El gel se visualizó mediante el Sistema de Documentación Gel Axygen (Axygen GD-1000, USA).

Tabla 2. Volúmenes y concentraciones de los componentes utilizados para la PCR (GoTaq Green Master Mix, Promega™).

Componente	Volumen	Concentración final
<i>GoTaq Green Master Mix, 2X™</i>	12.5 µl	1 X
Cebador F (inicial)	1 µl	0.1 – 1.0 µM
Cebador R (reverso)	1 µl	0.1 – 1.0 µM
ADN templado	1 µl	<250 ng
Agua ultra pura estéril	9 µl	N.A.

Tabla 3. Cebador *rbcL* y programa de PCR utilizado para la amplificación de ADN.

Fragmento	Cebadores (5' – 3')	Programa de PCR	Referencia
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> -F:	94 °C, 5 min; 35 × (94 °C, 30 s; 50 °C, 40 s; 72 °C, 40 s); 72 °C, 10 min; ∞4 °C	(Kress et al., 2009)
	ATGTCACCACAAACAGAGACTA		
	AAGC		
	<i>rbcL</i> -R:		
	GTAAAATCAAGTCCACCRG		

5.5. Secuenciación

Para la secuenciación de los productos de PCR se enviaron 300 ng de cada amplicón y 20 µl de cebador F (inicial) al servicio de secuenciación en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV, Irapuato, México.

5.6. Análisis bioinformático

Para el análisis y la edición de los electroferogramas obtenidos se utilizaron los programas bioinformáticos MEGA X (Tamura et al., 2021), Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) y SnapGene Software (www.snapgene.com).

5.6.1. Edición de electroferogramas

Para realizar la edición de las secuencias generadas en esta investigación (secuencias de consulta) se analizó la calidad de las mismas con base en el concepto de las curvas de fluorescencia que constituyen un electroferograma. Una vez determinada la calidad, se realizaron los cortes de ambos extremos de todas las secuencias, esto con el objetivo de eliminar las bases de baja calidad no reconocidas claramente. Así se determinó una región de óptima calidad para análisis posteriores.

5.6.2. Descarga de secuencias de referencia

Las secuencias de referencia de especies del género *Agave* se recopilaron de dos bases de datos: BOLD Systems (Barcode of Life Data System) (<https://v4.boldsystems.org/>), la cual es una plataforma encargada de almacenar y analizar datos basados en la identificación de especies a través de secuencias de ADN y; NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), repositorio que proporciona acceso a un gran conjunto de recursos computacionales que permiten el conocimiento de diversos sistemas biológicos (NCBI, 2013).

De cada plataforma se analizaron y seleccionaron 10 secuencias correspondientes al locus *rbcL* contemplando que tuvieran una cantidad de nucleótidos cercana (± 100 pares de bases) a las secuencias de consulta y que no presentaran bases ambiguas (N). Posteriormente se descargaron en formato FASTA con el objetivo de realizar un alineamiento con las secuencias de consulta. Cabe resaltar que estas secuencias fueron utilizadas únicamente para realizar un alineamiento comparativo y no se incluyeron en análisis posteriores.

5.6.3. Creación de biblioteca con secuencias de consulta

Un total de 12 secuencias de consulta previamente editadas correspondientes a 12 especies del género *Agave* L. constituyeron un nuevo archivo en formato FASTA, el cual correspondió a la biblioteca de datos generada en este trabajo.

5.6.4. Alineamiento de secuencias

El alineamiento de secuencias múltiples es considerado como una de las herramientas más útiles en la biología molecular ya que representa de forma compacta los caracteres conservados o variables dentro de los organismos de una misma familia o grupo de secuencias (Gotoh, 1999). Para realizar el alineamiento de las secuencias de referencia y las secuencias de consulta se utilizó la herramienta de “Clustal W” del programa MEGA X (Tamura et al., 2021).

Se realizaron dos alineamientos: uno creado con las secuencias de consulta junto con las secuencias de referencia para comparar las secuencias obtenidas en este estudio con otras secuencias reportadas para especies de *Agave* L. y; otro alineamiento con las secuencias de consulta.

5.6.5. Evaluación de la calidad de las secuencias

La evaluación de la calidad de las 12 secuencias se realizó en el programa MEGA X (Tamura et al., 2021) a partir de la biblioteca de datos creada en formato FASTA que contenía las secuencias de consulta alineadas y editadas.

Con ayuda de la herramienta “Exploración de datos de secuencia” se obtuvieron los siguientes parámetros: sitios conservados (C), aquellos nucleótidos que no varían dentro del grupo de secuencias, es decir, que no han sufrido cambios a través del tiempo y, por lo tanto, no cambian en su árbol filogenético, y; sitios variables (V), aquellos nucleótidos que difieren respecto a los nucleótidos de las demás secuencias, lo cual indica una variación a través de la evolución y el tiempo y como resultado se obtiene un árbol filogenético con diferencias. Finalmente se buscaron los sitios informativos/indels (Pi).

5.6.6. BLAST

El BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es una herramienta bioinformática que permite la comparación de secuencias de manera rápida y sencilla en bases de datos y, a su vez, permite encontrar similitudes entre estas para relacionar taxonómicamente las especies (Kerfeld & Scott, 2011).

En este trabajo, se utilizó esta herramienta para evaluar el poder de identificación del marcador *rbcL*. Para esto se realizaron dos protocolos de comparación: el primero se realizó con la ayuda de la herramienta “BLASTn”, del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2024), tomando en cuenta aciertos máximos de 98 – 100% con una especie o género; el segundo se realizó con la herramienta de identificación BOLD (IDS) de BOLD Systems, que es una herramienta de identificación para códigos de barras de plantas que acepta secuencias de los genes *rbcL*, *matK* e ITS (Ratnasingham et al., 2024).

5.6.7. Construcción del dendrograma

Con ayuda del programa MEGA X (Tamura et al., 2021), las secuencias de consulta se utilizaron para construir un dendrograma basado en el método de 2 parámetros de Kimura (K2P) (Kimura, 1980) eliminando las posiciones ambiguas para cada secuencia. Las especies que formaron clados monofiléticos se consideraron identificadas con éxito. El dendrograma fue utilizado para verificar la monofilia de las especies y no para establecer un análisis filogenético.

6. RESULTADOS

6.1. Colecta de material vegetal en campo

Se llevó a cabo exitosamente la colecta de material vegetal de 12 especies del género *Agave* L. (Figura 7) en el Jardín Botánico "Gustavo Aguirre Benavidez" de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ubicada en la ciudad de Saltillo, Coahuila, México. Mientras que la especie *Agave obscura* se colectó en el Parque Ecológico "El Chapulín" situado en la misma ciudad.

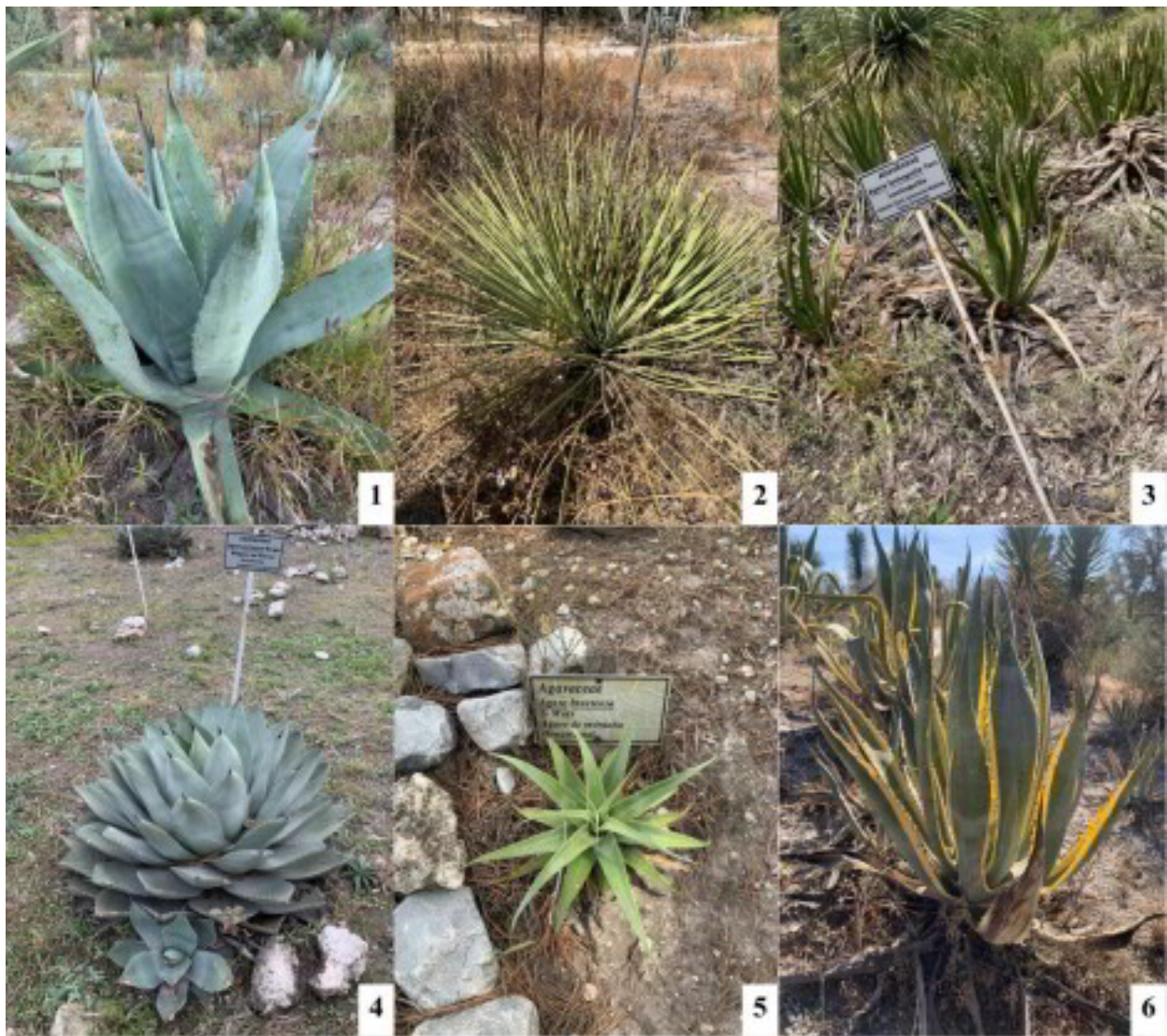


Figura 7. Especies de *Agave* L. muestreadas en el Jardín Botánico "Gustavo Aguirre Benavidez". 1) *Agave salmiana*, 2) *Agave striata*, 3) *Agave lechuguilla*, 4) *Agave parrasana*, 5) *Agave bracteosa*, 6) *Agave americana* var. *marginata*.

6.2. Extracción de ADN genómico

El protocolo de extracción de ADN utilizado permitió obtener ADN genómico de buena calidad en el 50% (aproximadamente) de las muestras vegetales analizadas. Cabe mencionar que se realizaron extracciones por duplicado para cada especie, lo cual permitió contar con al menos una muestra de ADN genómico por especie y agilizar análisis posteriores. En los casos específicos de las especies *Agave americana* var. *marginata* y *Agave obscura* se requirió realizar un mayor número de extracciones (6 y 3 respectivamente) ya que fue más complicado obtener ADN genómico de calidad en las primeras dos extracciones.

La **Figura 8** muestra las bandas de ADN genómico del total de extracciones realizadas en este trabajo. Si bien, algunos carriles no presentan una banda visible de ADN, todas las alícuotas fueron probadas posteriormente para comprobar la calidad del ADN extraído.

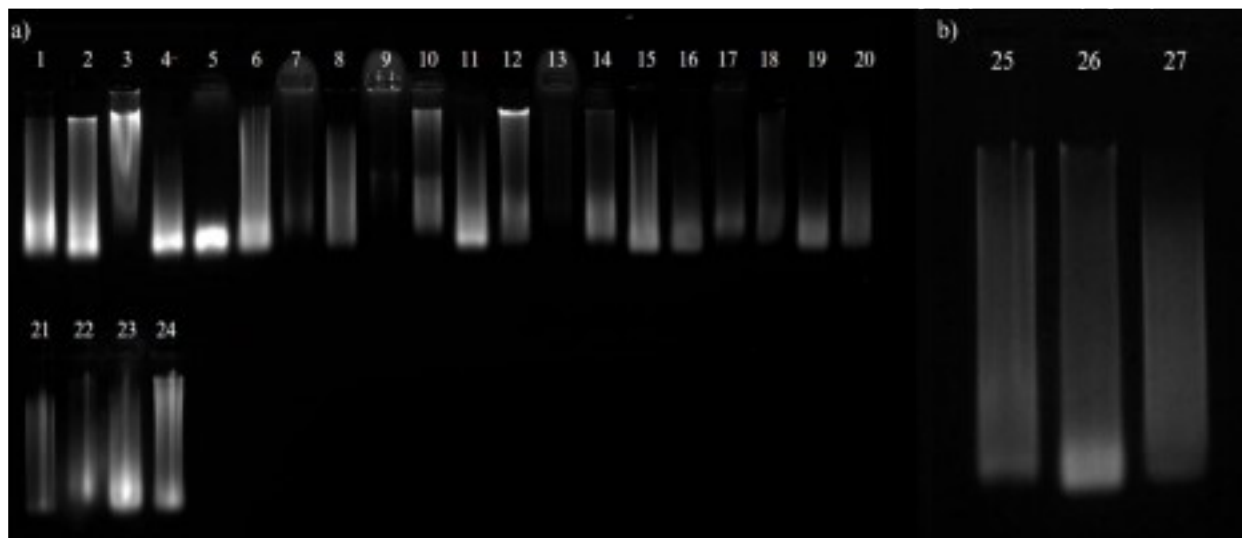


Figura 8. ADN genómico de especies de *Agave*. a) Carril 1 y 13: *Agave angustifolia*; carril 2 y 14: *Agave tequilana*; carril 3 y 15: *Agave americana* L.; carril 4 y 16: *Agave salmiana*; carril 5 y 17: *Agave americana* var. *marginata*; carril 6 y 18: *Agave ovatifolia*; carril 7 y 19: *Agave garciae-mendozae*; carril 8 y 20: *Agave bracteosa*; carril 9 y 21: *Agave striata*; carril 10 y 22: *Agave lechuguilla*; carril 11 y 23: *Agave mitis*; carril 12 y 24: *Agave parrasana*. b) Carril 25, 26 y 27: *Agave obscura*.

6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El análisis de PCR se realizó para todas las alícuotas de ADN genómico generadas. Sin embargo, únicamente fueron enviadas a secuenciación aquellas que generaron un amplicon de PCR de buena calidad. La **Tabla 4** muestra los datos de las alícuotas utilizadas para lograr la obtención exitosa de productos de PCR. Asimismo, se presenta la **Figura 9** que muestra la generación de amplicones correspondientes al fragmento *rbcL* de las 13 especies analizadas. El tamaño del amplicon oscilo entre los 500 – 600 pb.

Tabla 4. Alícuotas de ADN genómico utilizadas para generar los productos de PCR.

Especie	Dilución	Número de extracción
<i>Agave angustifolia</i>	1:10	1 ^a
<i>Agave tequilana</i>	1:10	1 ^a
<i>Agave americana</i> L.	1:20	1 ^a
<i>Agave salmiana</i>	1:20	1 ^a
<i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>	1:10	6 ^a
<i>Agave ovatifolia</i>	1:20	2 ^a
<i>Agave garciae-mendozae</i>	1:20	1 ^a
<i>Agave bracteosa</i>	1:10	2 ^a
<i>Agave striata</i>	1:20	2 ^a
<i>Agave lechuguilla</i>	1:10	1 ^a
<i>Agave mitis</i>	1:10	1 ^a
<i>Agave parrasana</i>	1:10	1 ^a
<i>Agave obscura</i>	1:10	3 ^a

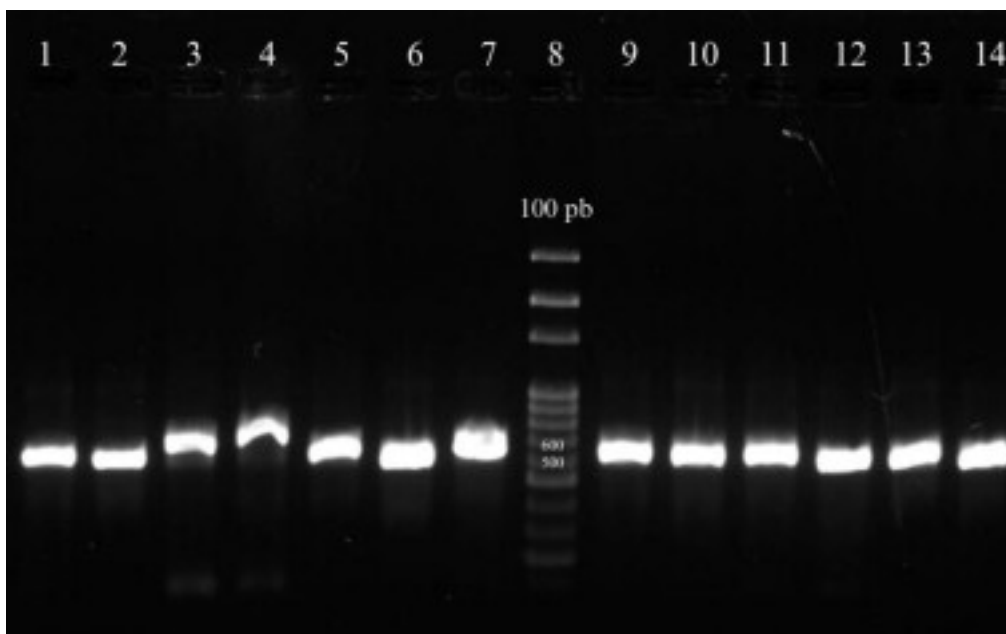


Figura 9. Productos de PCR obtenidos con el marcador *rbcL*. Carril 1: *Agave angustifolia*; carril 2: *Agave tequilana*; carril 3: *Agave americana* L.; carril 4: *Agave salmiana*; carril 5: *Agave americana* var. *marginata*; carril 6: *Agave ovatifolia*; carril 7: *Agave garciae-mendozae*; carril 8: Marcador de peso molecular; carril 9: *Agave bracteosa*; carril 10: *Agave striata*; carril 11: *Agave lechuguilla*; carril 12: *Agave mitis*; carril 13: *Agave parrasana*; carril 14: *Agave obscura*.

6.4. Análisis bioinformáticos

De acuerdo con los resultados de la secuenciación, se obtuvo una recuperabilidad de secuencias del 92.3%, correspondiente a un total de 12 secuencias de buena calidad. Las **Figuras 10, 11 y 12** muestran algunos ejemplos de secuencias de alta calidad. Por otro lado, las curvas de fluorescencia del electroferograma de la especie *Agave lechuguilla* mostró picos poco definidos, lo cual es indicativo de una secuenciación de baja calidad, por ello dicha especie no fue incluida en análisis posteriores (**Figura 13**).

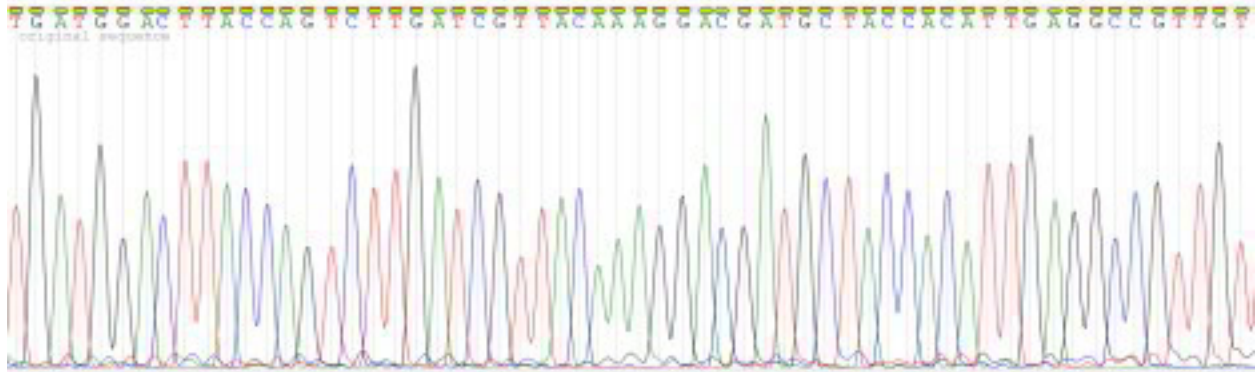


Figura 10. Electroferograma de *Agave bracteosa*.

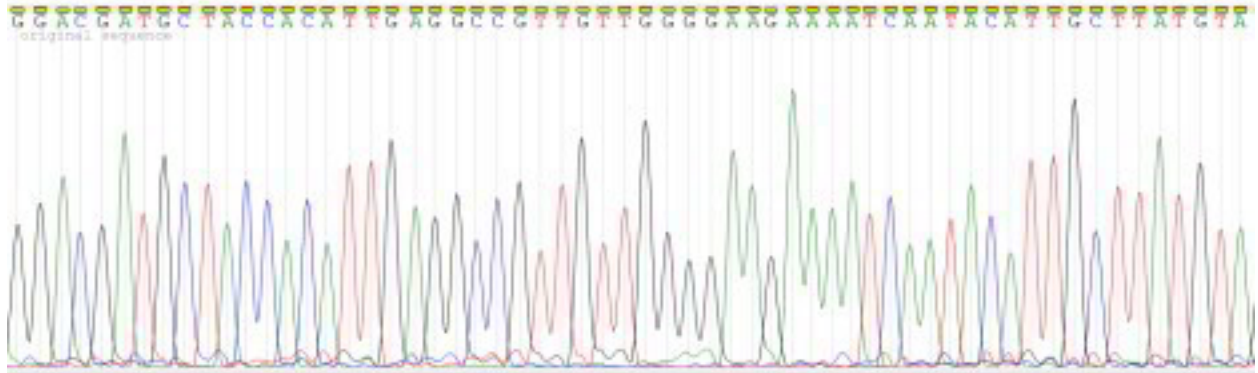


Figura 11. Electroferograma de *Agave americana* var. *marginata*.

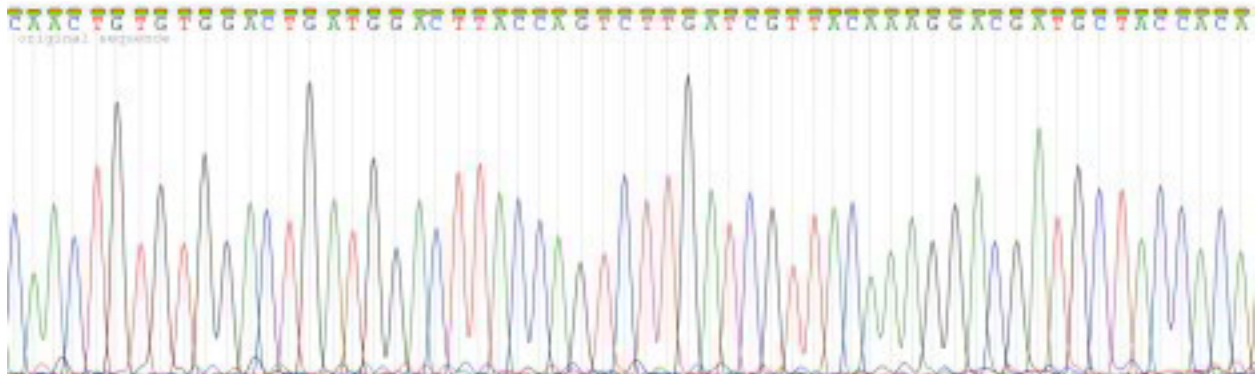


Figura 12. Electroferograma de *Agave tequilana*.

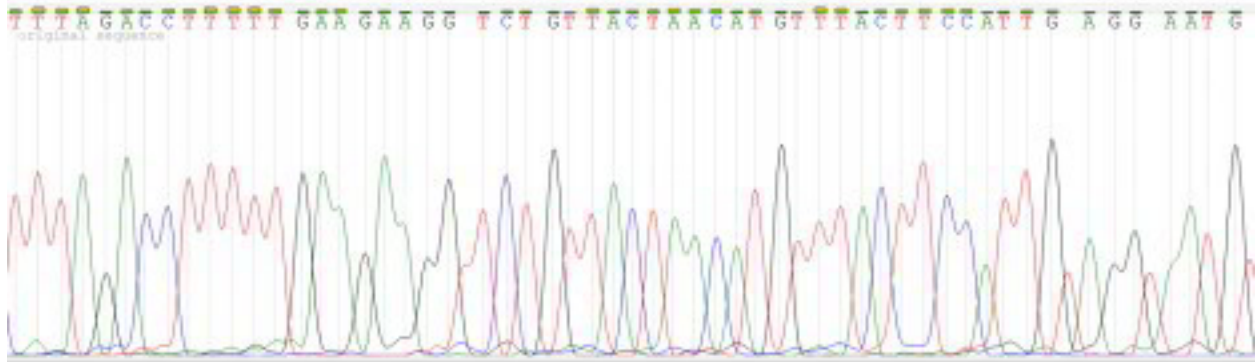


Figura 13. Electroferograma de *Agave lechuguilla*.

6.4.1. Corte de extremos

Con la finalidad de mantener las secuencias de nucleótidos bien determinadas y homogéneas se procedió a realizar el corte de los extremos 5' y 3' (**Figura 14** y **15** respectivamente). Una vez realizados los cortes, la longitud de las secuencias osciló entre los 500 – 525 pb, lo cual corresponde con el rango del marcador utilizado.

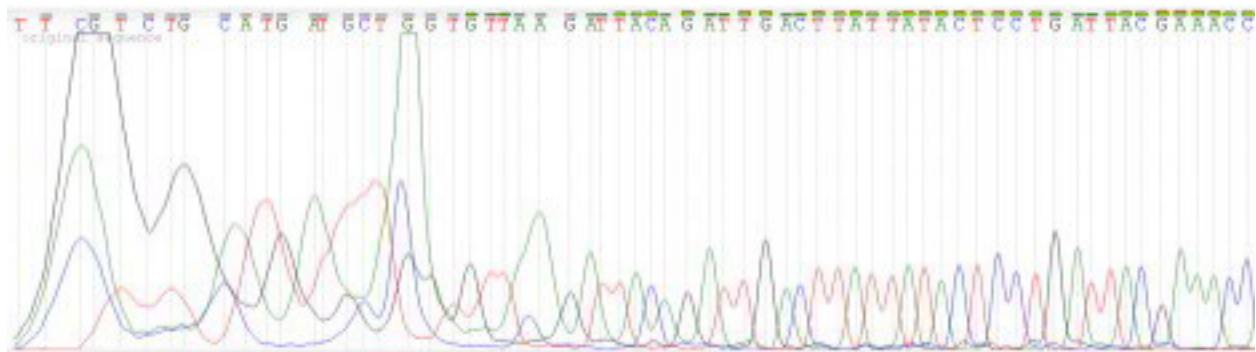


Figura 14. Extremo 5' del electroferograma de *Agave americana* L.

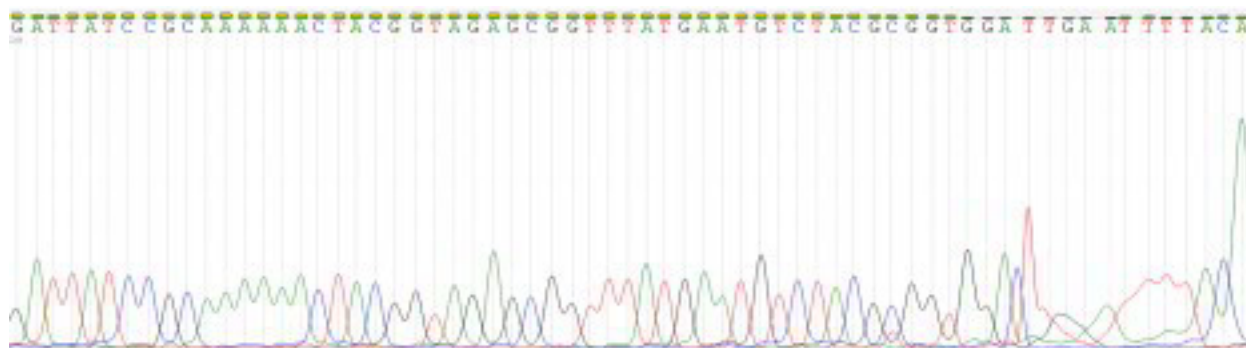


Figura 15. Extremo 3' del electroferograma de *Agave americana* L.

6.4.2. Creación de bibliotecas (referencia y consulta) y alineamiento de secuencias

Se descargaron un total de 20 secuencias de referencia del género *Agave* correspondientes al locus *rbcL* de los repositorios BOLD Systems y NCBI (**Tabla 5** y **6**). Se creó un archivo FASTA que contenía las secuencias de referencia y las secuencias de consulta previamente editadas, el cual sirvió para realizar un alineamiento múltiple comparativo. La **Figura 16** muestra una región alineada homogénea del grupo de secuencias analizadas, esto demuestra que las secuencias de consulta se alinean de manera consistente con secuencias de *Agave* reportadas en ambas bases de datos. También se presenta una región del alineamiento de las secuencias de consulta en donde se observan algunos sitios variables entre especies (**Figura 17**).

Tabla 5. Secuencias de referencia obtenidas del repositorio BOLD Systems.

Identificador (BOLD Systems)	Marcador	Especie
GENG1180-15	<i>rbcL</i>	<i>Agave</i> sp.
GENG1819-17	<i>rbcL</i>	<i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>
GENG1821-17	<i>rbcL</i>	<i>Agave americana</i>
GENG281-14	<i>rbcL</i>	<i>Agave</i>
MHPAC1941-12	<i>rbcL</i>	<i>Agave wercklei</i>
MHPAF1657-11	<i>rbcL</i>	<i>Agave angustifolia</i>
SDH2150-14	<i>rbcL</i>	<i>Agave americana</i>
SDH2889-15	<i>rbcL</i>	<i>Agave deserti</i> <i>deserti</i>
SDH2152-14	<i>rbcL</i>	<i>Agave shawii</i> var. <i>shawii</i>
SAFH2516-11	<i>rbcL</i>	<i>Agave</i> sp.

Tabla 6. Secuencias de referencia obtenidas de la base de datos del NCBI.

Identificador (NCBI)	Marcador	Especie
NC_032696.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave attenuata</i>
NC_059876.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave angustifolia</i>
NC_059875.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave sisalana</i>
NC_059874.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave fourcroydes</i>
NC_058311.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave amaniensis</i>
NC_045534.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave hybrid cultivar</i>
NC_032053.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave americana</i>
NC_032707.1	<i>rbcL</i>	<i>Manfreda virginica</i>
NC_072313.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave durangensis</i>
NC_070107.1	<i>rbcL</i>	<i>Agave cantula</i>

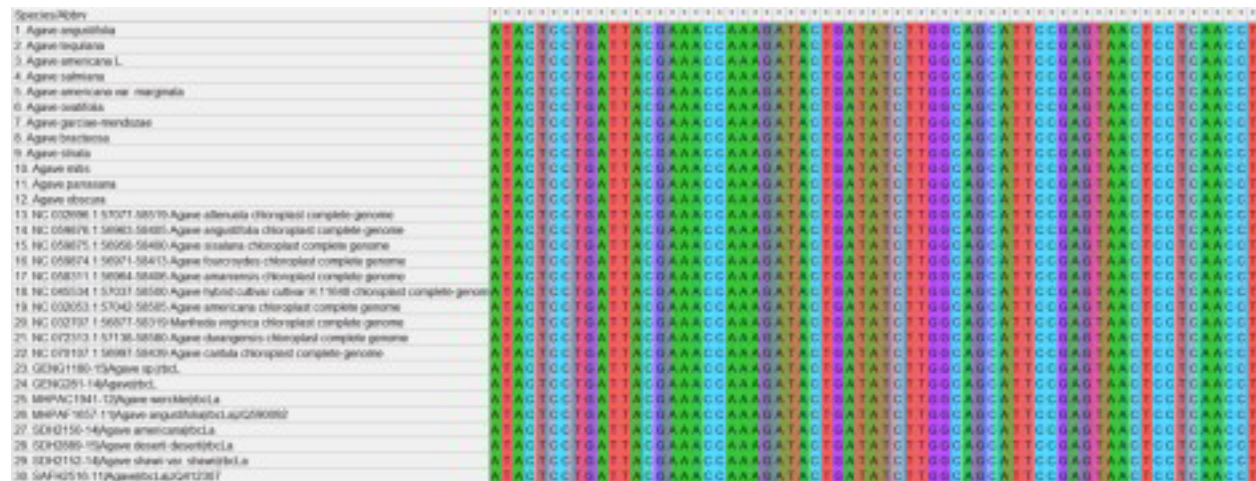


Figura 16. Región del alineamiento con secuencias de consulta y secuencias de referencia de ambas bases de datos.

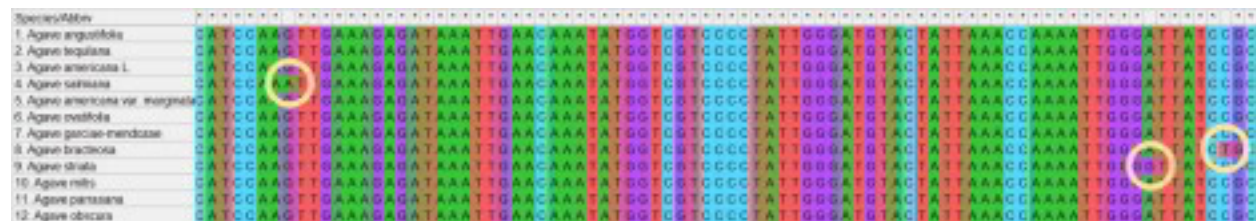


Figura 17. Región del alineamiento de las secuencias de consulta.

6.4.4. Análisis BLAST

Con ayuda de las bases de datos NCBI y BOLD Systems se realizó un análisis BLAST correspondiente para cada secuencia de consulta. Los resultados arrojaron un 100% de identificaciones ambiguas utilizando la base de datos del NCBI (**Tabla 7**). Por su parte, la herramienta de identificación de BOLD Systems logró obtener una identificación a nivel de especie (*Agave bracteosa*) (**Tabla 8**).

Tabla 7. BLAST en NCBI.

Nombre	Identificación		
	Especie	Género	Ambigua
<i>Agave angustifolia</i>	×	×	✓
<i>Agave tequilana</i>	×	×	✓
<i>Agave americana</i> L.	×	×	✓
<i>Agave salmiana</i>	×	×	✓
<i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>	×	×	✓
<i>Agave ovatifolia</i>	×	×	✓
<i>Agave garciae-mendozae</i>	×	×	✓
<i>Agave bracteosa</i>	×	×	✓
<i>Agave striata</i>	×	×	✓
<i>Agave mitis</i>	×	×	✓
<i>Agave parrasana</i>	×	×	✓
<i>Agave obscura</i>	×	×	✓

Tabla 8. BLAST en BOLD Systems.

Nombre	Identificación		
	Especie	Género	Ambigua
<i>Agave angustifolia</i>	×	×	✓
<i>Agave tequilana</i>	×	×	✓
<i>Agave americana</i> L.	×	×	✓
<i>Agave salmiana</i>	×	×	✓
<i>Agave americana</i> var. <i>marginata</i>	×	×	✓
<i>Agave ovatifolia</i>	×	×	✓
<i>Agave garciae-mendozae</i>	×	×	✓
<i>Agave bracteosa</i>	✓	×	×

<i>Agave striata</i>	×	×	✓
<i>Agave mitis</i>	×	×	✓
<i>Agave parrasana</i>	×	×	✓
<i>Agave obscura</i>	×	×	✓

6.4.5. Construcción del dendrograma

El dendrograma obtenido muestra la división de las 12 especies analizadas en tres clados monofiléticos bien definidos, con lo cual se puede deducir la estrecha relación entre las especies de cada clado (**Figura 20**). Asimismo, se aprecia la ramificación inicial de la especie *Agave bracteosa* a partir del nodo basal del árbol, lo que indica su probable ancestralidad.

Adicionalmente, la clasificación morfológica de subgéneros propuesta por Gentry (1982) no está totalmente clara en este estudio basado en la caracterización molecular, debido a que no se observa la formación de ninguna agrupación homogénea de acuerdo con la literatura.

Por otro lado, se observa una “subdivisión” de especies del subgénero *Agave* y del subgénero *Littaeae* dentro de los clados. Por ejemplo, se aprecia la cercanía en el árbol entre *Agave striata* y *Agave mitis*, que comparten un mismo ancestro común lo que infiere su estrecha relación evolutiva.

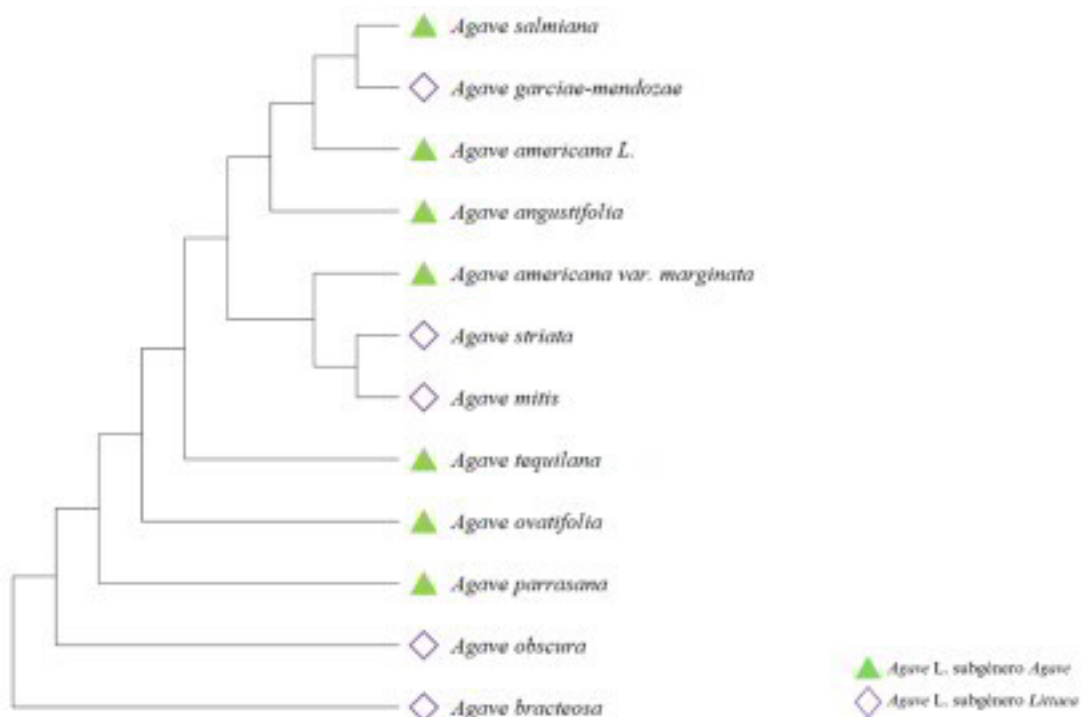


Figura 20. Dendrograma generado con secuencias de *Agave* obtenidas con el marcador *rbcL*.

7. DISCUSIÓN

La invención de la técnica de “Códigos de Barras de ADN” ha revolucionado el mundo de la clasificación biológica, taxonómica y del conocimiento de la biodiversidad ya que brinda un método confiable y rápido para la identificación de diferentes organismos (Letsiou et al., 2024; Mampang et al., 2023). La idea detrás de esta metodología es establecer una secuencia estandarizada de ADN que pueda ser fácilmente aislada y caracterizada en diferentes especies (Hebert, et al., 2003; Kress & Erickson, 2012; Li et al., 2015; Savolainen et al., 2005). Actualmente, existen locus estandarizados para diferentes organismos: COI para animales, *rbcL* y *matK* para plantas (Coissac et al., 2016).

La aplicación de esta herramienta en especies de la familia Asparagaceae se ha realizado a través de los años con propósitos distintos, siendo la clasificación e identificación taxonómica una finalidad principal (Bogler et al., 2006; Bogler & Simpson, 1995; Eguiarte et al., 1994, 2000, 2021; Jiménez-Barron et al., 2020). Dentro de esta familia, el género *Agave* L. es un conjunto de especies extenso que compone la flora mexicana (Eguiarte et al., 2013; García-Mendoza et al., 2019). Además, conforma uno de los grupos de plantas más importantes desde el punto de vista cultural y económico, pues han sido aprovechados por el hombre durante un largo periodo de tiempo (García-Mendoza et al., 2017).

A pesar de esto, los agaves se encuentran pobremente caracterizadas dado que su identificación se basa principalmente en la morfología (primordialmente caracteres de la roseta, hojas, flor o inflorescencias), sin embargo, al ser plantas perennes puede resultar difícil e incluso imposible la identificación de especies sin la presencia de dichos caracteres efímeros (flores e inflorescencia) (García-Mendoza et al., 2017; Gentry, 2004). Por ello, la implementación de técnicas moleculares como los Códigos de Barras de ADN se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la clasificación taxonómica y el entendimiento de las relaciones filogenéticas del género.

7.1. Extracción y amplificación de ADN genómico

El método de extracción de ADN utilizado fue elegido con base en reportes de resultados positivos de extracción en asparagáceas y otros grupos de plantas (Bogler & Simpson, 1995, 1996; Porebski et al., 1997). Sin embargo, algunas muestras de agaves analizadas presentaron dificultades durante

el proceso de extracción, por lo que la obtención de ADN fue del 50% del total de muestras. A pesar de ello, la extracción por duplicado de cada especie aseguró la obtención exitosa de por lo menos una muestra de ADN con la calidad óptima para análisis subsecuentes. Según Keb-Llanes et al., (2002), el aislamiento de ADN de agaves es compleja por la alta presencia de fibras, polisacáridos, fenoles y otros compuestos orgánicos que pueden actuar como inhibidores. De igual forma, Varma et al., (2007) mencionan que los procesos de lisis física para la obtención de ADN en especies con paredes celulares rígidas se vuelven menos efectivos porque la fuerza física necesaria para romper las paredes celulares es suficiente para romper el ADN de alto peso molecular. Por otro lado, la exitosa amplificación del marcador *rbcL* en todas las especies de agave analizadas y la alta recuperabilidad de secuencias (92.3%) son resultados esperados para dicho marcador. Los cebadores utilizados en este trabajo fueron implementados por Kress et al., (2009), quienes utilizaron un conjunto de tres locus aplicados en 296 especies de árboles leñosos, arbustos y palmeras, para reconstruir relaciones evolutivas entre ellas, demostrando un éxito de amplificación y secuenciación del 93% con el marcador *rbcL*. Adicionalmente, Kress et al., (2010) utilizaron los mismos cebadores en 143 especies de plantas leñosas de Puerto Rico para generar comunidades filogenéticas moleculares, obteniendo altos porcentajes de amplificación (90.3%) con una recuperabilidad de secuencias del 90.2%. Con esto se aprecia la universalidad de dichos cebadores para la amplificación de ADN en distintos grupos de plantas.

La tasa de recuperabilidad de secuencias en este estudio fue cercana a un 100%. Múltiples publicaciones muestran que la tasa de recuperabilidad de secuencias para este locus es muy variable de acuerdo con el taxon analizado. Kesanahurti et al., (2011) llevaron a cabo un estudio de identificación de especies distribuidas en Ontario, Canadá utilizando el marcador *rbcL*, con una recuperabilidad de secuencias del 84.6%. Del mismo modo, en otro estudio realizado en 436 especies de plantas ubicadas en la Reserva Científica Koffler (Koffler Scientific Reserve), Burgess et al., (2011) alcanzaron una recuperabilidad de secuencias para *rbcL* del 91.4%. Mientras que, Thakur et al., (2016) realizaron la caracterización molecular de especies de *Mentha* utilizando el mismo locus, obteniendo un 100% de recuperabilidad de secuencias.

7.2. Propiedades de las secuencias de consulta y análisis BLAST

Durante el alineamiento de secuencias se observó un alto porcentaje de secuencias conservadas (99.2 %) y un bajo porcentaje de sitios variables (0.8 %). Estudios previos reportaron índices similares de sitios variables (0.4 - 0.9%) en diferentes angiospermas aplicando marcadores *rbcL* (Chen et al., 1999; Les et al., 1997). Diversos reportes muestran que las tasas de variación nucleotídica de *rbcL* son bajas, pese a ello, este locus continúa siendo utilizado por su facilidad de amplificación, secuenciación y alineación (Hollingsworth et al., 2011). En un estudio realizado en especies del orden Asparagales llevado a cabo por Chen et al., (2013) muestran a *rbcL* como el gen que menos sitios informativos reveló, pero el alineamiento de secuencias fue relativamente fácil, además, las secuencias generadas se conservaron en longitud y no mostraron gaps. Aunado a esto, generalmente se recomienda utilizar este locus en conjunto con otro locus que cuente con una tasa evolutiva más alta y que proporcione una mejor discriminación, por su parte CBOL Plant Working Group et al., (2009) proponen la combinación de *rbcL* + *matK* como código de barras central, mientras que Kress & Erickson (2007) propusieron la combinación de *rbcL* + *trnH-psbA*. Por su parte, el análisis de identificación con BLAST mostró porcentajes bajos ya que prácticamente el total de las identificaciones fueron ambiguas debido a que las secuencias mostraron una coincidencia del 100% con especies del género *Manfreda* y *Polianthes*, únicamente una especie (*Agave bracteosa*) fue identificada a nivel de especie. Esto muestra que aún con la poca variabilidad que manifiesta el locus *rbcL*, sigue teniendo la capacidad de discriminar especies en diferentes niveles, incluso a nivel especie. Braukmann et al., (2017) demostraron la gran variabilidad de discriminación taxonómica que expone *rbcL* en especies de 25 familias. Los valores que presentaron variaron en los tres niveles (familia: 92.61% - 100%; género: 77.97% - 100%; especie: 12.24% - 77.59%). Estos datos sugieren que la capacidad de discriminación de este locus u otros marcadores depende totalmente del taxon estudiado (Fazekas et al., 2008).

La escasa identificación de las especies analizadas en este trabajo no supone una mala praxis, existen diferentes teorías que podrían “justificar” los resultados generados. La principal y evidente razón es el gen utilizado en este trabajo, ya se ha mencionado anteriormente las limitantes que conlleva su aplicación en la caracterización de especies. Además, se debe considerar que a pesar de que el NCBI y BOLD Systems son bases de datos con miles de organismos registrados, existe la gran posibilidad de que las especies analizadas en este experimento no se encuentren

previamente reportadas con el marcador en cuestión (*rbcL*), lo cual representa una gran limitante en la obtención de resultados positivos en el análisis BLAST.

7.3. Análisis del dendrograma

Finalmente, el árbol filogenético generado logró la separación de especies en tres clados monofiléticos, por lo que ofreció información sobre las relaciones evolutivas entre las especies estudiadas, sin embargo, el marcador aplicado no logró una separación clara de acuerdo a los subgéneros analizados (*Agave* y *Littaea*) pertenecientes al grupo *Agave sensu stricto* (*Agave* s.s). Diferentes publicaciones basadas en análisis moleculares han demostrado que la delimitación taxonómica del género sigue siendo tema de conflicto por la notable similitud molecular que existe entre especies e incluso con otros géneros del grupo *Agave sensu lato* (*Manfreda*, *Polianthes* y *Prochryanthes*).

Heyduk et al., (2016) analizaron especies de la subfamilia Agavoideae y realizaron la reconstrucción filogenética con el genoma del cloroplasto con la cual mostraron que todas las especies del género *Agave*, *Manfreda* y *Polianthes* tienen un mismo ancestro común. Además, mencionan que todas las especies de los géneros *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochryanthes* están anidados en el grupo *Agave sensu lato* (*Agave* s.l.). Sumado a esto, otros autores mencionan que es imposible separar molecularmente las especies de *Agave* s.s. y *Agave* s.l. (Rocha et al., 2006; Thiede & Eggli, 2020).

Diferentes reportes respaldan el uso de *rbcL* para estudios filogenéticos en agaves (Bogler & Simpson, 1995; Eguiarte et al., 1994). Sin embargo, recientemente Eguiarte et al., (2021) ofrecieron un compendio de estudios filogenéticos relevantes sobre los agaves en el que se aprecia que en la mayoría de análisis realizados en los últimos años se aplicaron marcadores con mayor poder discriminatorio. Aunado a esto, las especies que se han descubierto y los análisis que se han desarrollado al día de hoy continúan dejando una brecha en el conocimiento de las especies de *Agave* L. (García-Mendoza et al., 2019; García-Mendoza & Chávez-Rendón, 2013; Giraldo-Cañas, 2020; Jiménez-Pérez et al., 2021).

Una probable causa que justifica resultados generados con datos moleculares por diferentes autores fue descrita por Doebley (1992) quien sugiere que la domesticación de las plantas ha traído como consecuencia una pérdida de variación genética. En el caso de los agaves, su uso en México se

remonta al hombre prehispánico y sus aplicaciones se han extendido ampliamente hasta nuestros días, por lo que la domesticación de especies ha sido constante a través de los años. Diferentes investigaciones apoyan esta cuestión (Colunga-GarcíaMarín et al., 1999; Figueredo-Urbina et al., 2017, 2021; Vargas-Ponce et al., 2009). En el presente trabajo algunas especies analizadas han sido reportadas como especies domesticadas, entre ellas *Agave americana* L. y *Agave tequilana*, plantas conocidas por ser utilizadas en la producción de bebidas alcohólicas como el pulque, mezcal y tequila, por lo que la nula variabilidad genética reportada fue un factor previsto. Del mismo modo, la mayoría de sitios variables fueron reportados en especies correspondientes al subgénero *Littaeae* (*Agave bracteosa* y *Agave striata*), clasificación reconocida por comprender las especies salvajes o ancestros de especies que hoy en día se consideran cultivadas o domésticas.

Existe la posibilidad de que los resultados de esta investigación hayan sido limitados debido a la cantidad de especímenes estudiados. Otros estudios sugieren que entre mayor número de secuencias y taxones se añadan en un análisis, mejores resoluciones se obtienen (Bogler et al., 2006; Ritchie, 2012).

8. CONCLUSIONES

- La extracción de ADN genómico se realizó exitosamente en todas las especies colectadas. Asimismo, la amplificación por PCR utilizando marcadores *rbcL* permitió generar los amplicones necesarios para la secuenciación. Además, la recuperabilidad de secuencias fue alta (92.3%) utilizando dichos marcadores.
- El análisis de la calidad y alineamiento de las secuencias de consulta mostraron regiones altamente conservadas y un bajo porcentaje de sitios variables. Por su parte, el análisis BLAST no permitió la identificación de especies a nivel de género o especie en el 91.6% de las especies, demostrando que el poder discriminatorio de *rbcL* aplicado en especies de agaves fue bajo, sin embargo, no se descarta su aplicación en futuras investigaciones.
- El dendrograma generado mostró tres agrupaciones monofiléticas definidas, sin embargo, no se observaron clados homogéneos por subgéneros del grupo taxonómico en cuestión.
- Adicionalmente, es importante mencionar que en las bases de datos BOLD Systems y NCBI únicamente se encuentran registradas dos y tres secuencias (respectivamente) del total de especies aquí analizadas. Este trabajo permitió la caracterización molecular de 10 especies de *Agave* con el marcador *rbcL* que no existen en estas bases de datos.
- Finalmente, la discusión presentada incita a reflexionar sobre el desafío constante respecto a las clasificaciones taxonómicas establecidas para el género y la necesidad de establecer nuevas herramientas que aborden la complejidad molecular de este grupo de plantas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amritkar, K., Cuevas-Zuviría, B., & Kaçar, B. (2024). Evolutionary Dynamics of RuBisCO: Emergence of the Small Subunit and its Impact Through Time. *bioRxiv*, 2024.06.06.597628. <https://doi.org/10.1101/2024.06.06.597628>
- APG. (1998). An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 85(4), 531–553. <https://doi.org/10.2307/2992015>
- APG II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141(4), 399–436. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.t01-1-00158.x>
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105–121. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Ávila-Fernández, Á., Olvera-Carranza, C., Rudiño-Piñera, E., Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J., & López-Munguía, A. (2007). Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Plant Science*, 173(4), 478–486. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.07.009>
- Ball, S. L., Hebert, P. D. N., Burian, S. K., & Webb, J. M. (2005). Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(3), 508–524. <https://doi.org/10.1899/04-142.1>
- Barrett, R. D. H., & Hebert, P. D. N. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 83(3), 481–491. <https://doi.org/10.1139/z05-024>
- Berger, A. (2006). *Die Agaven: Beiträge zu einer Monographie*. Fischer. <http://publikationen.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/docId/9060>

- Berry, J. O., Mure, C. M., & Yerramsetty, P. (2016). Regulation of Rubisco gene expression in C4 plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 31, 23–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.004>
- Biology Insights Team. (2024, octubre 21). *rbcL Gene: Key to Photosynthesis and Evolutionary Insights*. Biology Insights. <https://biologyinsights.com/rbcl-gene-key-to-photosynthesis-and-evolutionary-insights/>
- Bogler, D. J., Pires, J. C., & Francisco-Ortega, J. (2006). Phylogeny of Agavaceae Based on *ndhF*, *rbcL*, and its Sequences. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, 22(1), 313–328.
- Bogler, D. J., & Simpson, B. B. (1995). A Chloroplast DNA Study of the Agavaceae. *Systematic Botany*, 20(2), 191–205. <https://doi.org/10.2307/2419449>
- Bogler, D. J., & Simpson, B. B. (1996). Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *American Journal of Botany*, 83(9), 1225–1235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb13903.x>
- Bracher, A., Whitney, S. M., Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2017). Biogenesis and metabolic maintenance of Rubisco. *Annual review of plant biology*, 68(1), 29–60.
- Braukmann, T. W. A., Kuzmina, M. L., Sills, J., Zakharov, E. V., & Hebert, P. D. N. (2017). Testing the Efficacy of DNA Barcodes for Identifying the Vascular Plants of Canada. *PLOS ONE*, 12(1), e0169515-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169515>
- Burgess, K. S., Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Husband, B. C... (2011). Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL+matK* DNA barcode. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4), 333–340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00092.x>
- Camacho, R. M., Gutiérrez, A., & Gschaedler, A. C. (Eds.). (2023). *Los agaves y sus derivados: Tendencias científicas, uso sostenible y patrimonio* (1a ed.). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S... (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>

- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madriñán, S... (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *TAXON*, 56(2), 295–299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/tax.562004>
- Chase, M. W., & Fay, M. F. (2009). Barcoding of Plants and Fungi. *Science*, 325(5941), 682–683. <https://doi.org/10.1126/science.1176906>
- Chase, M. W., Reveal, J. L., & Fay, M. F. (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 132–136. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00999.x>
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P... (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889–1895. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1720>
- Chen, S., Kim, D.-K., Chase, M. W., & Kim, J.-H. (2013). Networks in a Large-Scale Phylogenetic Analysis: Reconstructing Evolutionary History of Asparagales (Lilianaes) Based on Four Plastid Genes. *PLOS ONE*, 8(3), e59472-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059472>
- Chen, Z. D., Manchester, S. R., & Sun, H.-Y. (1999). Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany. *American Journal of Botany*, 86(8), 1168–1181. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2656981>
- Coissac, E., Hollingsworth, P. M., Lavergne, S., & Taberlet, P. (2016). From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 25(7), 1423–1428. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.13549>
- Colunga-GarcíaMarín, P., Coello-Coello, J., Eguiarte, L. E., & Piñero, D. (1999). Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany*, 86(1), 115–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2656960>

- Colunga-GarcíaMarín, P., & May-Pat, F. (1993). *Agave* Studies in Yucatan, Mexico. I. Past and Present Germplasm Diversity and Uses. *Economic Botany*, 47(3), 312–327. <http://www.jstor.org/stable/4255528>
- Colunga-GarcíaMarín, P., & Zizumbo-Villarreal, D. (2007). El tequila y otros mezcales del centro-occidente de México: domesticación, diversidad y conservación de germoplasma. *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, 113–131.
- Dahlgren, R. M. T., Clifford, H. T., & Yeo, P. F. (1985). *The families of the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy*. Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-61663-1>
- Dang, N.-X., Sun, F.-H., Lv, Y.-Y., Zhao, B.-H., Wang, J.-C... (2016). DNA barcoding and the identification of tree frogs (Amphibia: Anura: Rhacophoridae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(4), 2574–2584. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1041113>
- Doebley, J. (1992). Molecular Systematics and Crop Evolution. En P. S. Soltis, D. E. Soltis, & J. J. Doyle (Eds.), *Molecular Systematics of Plants* (pp. 202–222). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3276-7_9
- Eguiarte, L. E. (1995). Hutchinson (Agavales) vs. Huber and Dahlgren (Asparagales): Molecular analyses of the phylogeny and evolution of the Agavaceae family sensu Hutchinson in the monocotyledons. *Botanical Sciences*, 0(56). <https://doi.org/10.17129/botsci.1463>
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Planter, E., Aguirre, X., Colín, R., González, A., Rocha, M., Scheinvar, E., Trejo, L., & Souza, V. (2013). From Isozymes to Genomics: Population Genetics and Conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review*, 79(4), 483–506. <https://doi.org/10.1007/s12229-013-9123-x>
- Eguiarte, L. E., Duvall, M. R. R., Learn Jr, G. H., & Clegg, M. T. (1994). El estudio sistemático de Agavaceae y Nolinaceae, y Asparagales relacionados en las Monocotiledóneas: un análisis basado en la secuencia del gen *rbcL*. *Botanical Sciences*, 54, 35–56. <https://doi.org/10.17129/botsci.1427>
- Eguiarte, L. E., Jiménez-Barrón, O. A., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gámez, N... (2021). Evolutionary ecology of *Agave*: distribution patterns, phylogeny, and coevolution (an homage

- to Howard S. Gentry). *American Journal of Botany*, 108(2), 216–235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ajb2.1609>
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Silva-Montellano, A. (2000). Evolution of the Agavaceae family: Phylogeny, reproductive biology and population genetics. *Botanical Sciences*, 0(66). <https://doi.org/10.17129/botsci.1618>
- Endlicher, S. L. (1841). *Enchiridion botanicum exhibens classes et ordines plantarum: accedit nomenclator generum et officinalium vel usualium indicatio*. Viennae.
- Fay, M. F., Rudall, P. J., Sullivan, S., Stobart, K. L., de Bruijn, A. Y... (2000). Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions. En K. L. Wilson & D. A. Morrison (Eds.), *Monocots: Systematics and Evolution* (pp. 360–371). CSIRO PUBLISHING.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G... (2008). Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLOS ONE*, 3(7), e2802-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
- Figueredo-Urbina, C. J., Álvarez-Ríos, G. D., García-Montes, M. A., & Octavio-Aguilar, P. (2021). Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLOS ONE*, 16(7), 24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254376>
- Figueredo-Urbina, C. J., Casas, A., & Torres-García, I. (2017). Morphological and genetic divergence between *Agave inaequidens*, *A. cupreata* and the domesticated *A. hookeri*. Analysis of their evolutionary relationships. *PLOS ONE*, 12(11), e0187260-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187260>
- Flores-Benítez, S., Jiménez-Bremont, J. F., Rosales-Mendoza, S., Argüello-Astorga, G. R., Castillo-Collazo, R., & Alpuche-Solís, Á. G. (2007). Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(3), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9287-3>
- Gao, J., Yang, F., Zhang, S., Li, J., Chen, H... (2014). Expression of a hevein-like gene in transgenic *Agave* hybrid No. 11648 enhances tolerance against zebra stripe disease. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 119(3), 579–585. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0557-6>

- García, F. P., Méndez, J. P., Muñoz, E. J., Sandoval, O. A. A., & Laguna, R. R. (2022). Taxonomic, physical and morphological characterization of four species of agave with potential for the production of cellulose fibers from the leaves. *South Florida Journal of Development*, 3(1), 1277–1301. <https://doi.org/https://doi.org/10.46932/sfjdv3n1-099>
- García-Mendoza, A., Nieto-Sotelo, J., Sánchez-Teyer, L., Tapia, E., Gómez-Leyva, J... (2017). *Los Agaves* (pp. 15–53).
- García-Mendoza, A. J., & Chávez-Rendón, C. (2013). *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo Striatae), una especie nueva de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(4), 1070–1076. <https://doi.org/https://doi.org/10.7550/rmb.35241>
- García-Mendoza, A. J., Franco Martínez, I. S., & Sandoval Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta botánica mexicana*, 126. <https://doi.org/https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- García-Mendoza, A. J., & Galván-V, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Sociedad Botánica de México*, 56(56), 7–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.17129/botsci.1461>
- García-Herrera, E. J., Méndez-Gallegos, S. J., & Talavera-Magana, D. (2010). El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Special Ed*, 5, 109–129.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1t4m2h4>
- Gentry, H. S. (2004). *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press.
- Giraldo-Cañas, D. (2020). Una especie nueva de *Agave* (Asparagaceae: Agavoideae) de Colombia. *Revista mexicana de biodiversidad*, 91.
- Good-Avila, S. V, Souza, V., Gaut, B. S., & Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9124–9129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603312103>

- Gotoh, O. (1999). Multiple sequence alignment: Algorithms and applications. *Advances in Biophysics*, 36, 159–206. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-227X\(99\)80007-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-227X(99)80007-0)
- Govea-Paz, Y., Arellano-García, L., & Aguilar-Juárez, Ó. (2024). Simultaneous hydrogen and methane production by tequila vinasses dark fermentation in series with anaerobic digestion. *Bioresource Technology Reports*, 25, 101779. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101779>
- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 968–971. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510466103>
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M., & Iwatsuki, K. (1994). *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5730–5734. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5730>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96–S99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>

- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLOS Biology*, 2(10), e312-. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hernandez-Sandoval, L., Martínez, M., & Gómez-Sánchez, M. (2016). *Análisis florístico del orden Asparagales en Querétaro*.
- Heyduk, K., McKain, M. R., Lalani, F., & Leebens-Mack, J. (2016). Evolution of a CAM anatomy predates the origins of Crassulacean acid metabolism in the Agavoideae (Asparagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 102–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.08.018>
- Hollingsworth, P. M. (2011). Refining the DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), 19451–19452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116812108>
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLOS ONE*, 6(5), e19254-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>
- Hulle, A., Kadole, P., & Katkar, P. (2015). *Agave Americana* leaf fibers. *Fibers*, 3(1), 64–75.
- Hutchinson, J. (1934). *The families of flowering plants. Vol. I. Dicotyledons*.
- Jáuregui González, M. de J. (2015). *Código de barras de la vida y análisis filogenético en *Dasyilirion cedrosanum* y *D. berlandieri* con base en secuencias de DNA citoplasmático* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro] <http://repositorio.uaaan.mx:8080/handle/123456789/6983>.
- Jiménez-Barron, O., García-Sandoval, R., Magallón, S., García-Mendoza, A., Nieto-Sotelo, J., Aguirre-Planter, E., & Eguiarte, L. E. (2020). Phylogeny, Diversification Rate, and Divergence Time of *Agave sensu lato* (Asparagaceae), a Group of Recent Origin in the Process of Diversification. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2020.536135>
- Jiménez-Pérez, N. del C., Hernández-Jiménez, O. A., & García-Mendoza, A. J. (2021). *Agave guadarramae* (Asparagaceae: Agavoideae), una especie nueva del sureste de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 92.

- Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B., & Infante, D. (2002). A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(3), 299–300.
- Kerfeld, C. A., & Scott, K. M. (2011). Using BLAST to Teach “E-value-tionary” Concepts. *PLOS Biology*, 9(2), e1001014-. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001014>
- Kerr, K. C. R., Stoeckle, M. Y., Dove, C. J., Weigt, L. E. E. A., Francis, C. M., & Hebert, P. D. N. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 535–543. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x>
- Kesanahurti, P. R., Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Percy, D. M., Newmaster, S. G... (2011). Spatial patterns of plant diversity below-ground as revealed by DNA barcoding. *Molecular Ecology*, 20(6), 1289–1302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04989.x>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLOS ONE*, 2(6), e508-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2012). DNA Barcodes: Methods and Protocols. En W. J. Kress & D. L. Erickson (Eds.), *DNA Barcodes: Methods and Protocols* (pp. 3–8). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N. G., Perez, R., Sanjur, O., & Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(44), 18621–18626. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106>

- Kress, W. J., Erickson, D. L., Swenson, N. G., Thompson, J., Uriarte, M., & Zimmerman, J. K. (2010). Advances in the Use of DNA Barcodes to Build a Community Phylogeny for Tropical Trees in a Puerto Rican Forest Dynamics Plot. *PLOS ONE*, 5(11), e15409-. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015409>
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369–8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Kumar, N. P., Rajavel, A. R., Natarajan, R., & Jambulingam, P. (2007). DNA Barcodes Can Distinguish Species of Indian Mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 44(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jmedent/41.5.01>
- Les, D. H., Philbrick, C. T., & Alejandro Novelo, R. (1997). The phylogenetic position of riverweeds (Podostemaceae): Insights from *rbcL* sequence data. *Aquatic Botany*, 57(1), 5–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(96\)01117-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3770(96)01117-5)
- Letsiou, S., Madesis, P., Vasdekis, E., Montemurro, C., Grigoriou, M. E... (2024). DNA Barcoding as a Plant Identification Method. *Applied Sciences*, 14(4), 1415.
- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 90(1), 157–166. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/brv.12104>
- Mampang, R., Auxtero, K., Caldito, C. J., Abanilla, J., Santos, G., Caipang, C. M., & Mondana, mhar jo. (2023). DNA Barcoding and Its Applications: A Review. *UTTAR PRADESH JOURNAL OF ZOOLOGY*, 44, 69–78. <https://doi.org/10.56557/UPJOZ/2023/v44i203646>
- Márquez Segundo, J. S. (2022). *Uso de marcadores matK y rbcL para discriminar cuatro especies de Agave L. (Asparagaceae)* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro] <http://repositorio.uaaan.mx:8080/handle/123456789/48627>.
- McKain, M. R., McNeal, J. R., Kellar, P. R., Eguiarte, L. E., Pires, J. C., & Leebens-Mack, J. (2016). Timing of rapid diversification and convergent origins of active pollination within Agavoideae (Asparagaceae). *American Journal of Botany*, 103(10), 1717–1729. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.1600198>

- Mellado-Mojica, E., González de la Vara, L. E., & López, M. G. (2017). Fructan active enzymes (FAZY) activities and biosynthesis of fructooligosaccharides in the vacuoles of *Agave tequilana* Weber Blue variety plants of different age. *Planta*, 245(2), 265–281. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2602-7>
- National Center for Biotechnology Information (US). (2013). *The NCBI Handbook* (J. Beck, D. Benson, J. Coleman, M. Hoepfner, M. Johnson, D. Maglott, I. Mizrachi, R. Morris, J. Ostell, K. Pruitt, W. Rubinstein, E. Sayers, K. Sirotkin, & T. Tatusova, Eds.; Second edition).
- National Library of Medicine (US), & National Center for Biotechnology Information. (1988). *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.
- Newmaster, S. G., Fazekas, A. J., & Ragupathy, S. (2006). DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Canadian Journal of Botany*, 84(3), 335–341. <https://doi.org/10.1139/b06-047>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & team, the U. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Orozco Sifuentes, M. M. (2019). *Código de barras de la vida y análisis filogenético en las especies de dasylirion del Noreste de México* [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro] <http://repositorio.uaaan.mx:8080/handle/123456789/46940>.
- Ortíz, I., Valdez-Vazquez, I., Hernández-Vázquez, A., Olivares-Hernández, R., Carrillo-Reyes, J... (2024). Process design and economic evaluation for methane and electricity production from *Agave* bagasse using different pretreatments. *Energy Conversion and Management*, 306, 118319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.118319>
- Ortiz-Covarrubias, Y. C., Orozco-Sifuentes, M. M., Mendoza-Rodríguez, D. V, Villarreal-Quintanilla, J. A., Martínez, O... (2022). Phylogeny, origin and diversification of the *Dasyliirion* genus based on *matK* and *rbcL* sequences. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 20(2), 108–115. <https://doi.org/DOI:10.1017/S1479262122000181>

- Parry, M. A. J., Andralojc, P. J., Scales, J. C., Salvucci, M. E., Carmo-Silva, A. E., Alonso, H., & Whitney, S. M. (2013). Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, *64*(3), 717–730. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers336>
- Patel, M., & Berry, J. O. (2008). Rubisco gene expression in C4 plants. *Journal of Experimental Botany*, *59*(7), 1625–1634. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm368>
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta biológica colombiana*, *16*(3), 161–176. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-548X2011000300011&script=sci_arttext
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Pottier, M., Gilis, D., & Boutry, M. (2018). The Hidden Face of Rubisco. *Trends in Plant Science*, *23*(5), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.006>
- Rai, P. S., Bellampalli, R., Dobriyal, R. M., Agarwal, A., Satyamoorthy, K., & Narayana, D. B. A. (2012). DNA barcoding of authentic and substitute samples of herb of the family Asparagaceae and Asclepiadaceae based on the ITS2 region. *Journal of Ayurveda and Integrative medicine*, *3*(3), 136. <https://doi.org/https://doi.org/10.4103%2F0975-9476.100177>
- Ramos, C. M. B., Martínez, L. I. C., Escobar, P. R., Pliego, P. E., Olivera, M. D. los Á. G., & Pérez, N. D. C. J. (2012). Códigos de barras de ADN: una nueva herramienta para la sistemática. *Kuxulkab'*, *18*(35). <https://doi.org/https://doi.org/10.19136/kuxulkab.a18n35.260>
- Ratnasingham, S., Wei, C., Chan, D., Agda, J., Agda, J... (2024). BOLD v4: A Centralized Bioinformatics Platform for DNA-Based Biodiversity Data. En R. DeSalle (Ed.), *DNA Barcoding: Methods and Protocols* (pp. 403–441). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3581-0_26
- Raubeson, L. A., & Jansen, R. K. (2005). Chloroplast genomes of plants. En R. J. Henry (Ed.), *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants*. (pp. 45–68). CABI Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1079/9780851999043.0000>

- Remigio, E. A., & Hebert, P. D. N. (2003). Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 641–647. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00140-4](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00140-4)
- Ritchie, W. D. (2012). *Taxonomy and DNA Barcoding in the Genus Manfreda (Salisb.) Asparagaceae*. [Tesis de maestría, Universidad de Arkansas] <https://scholarworks.uark.edu/etd/576/>.
- Rivera, J., & Currie, D. C. (2009). Identification of Nearctic black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology Resources*, 9(s1), 224–236. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02648.x>
- Rocha, M., Good-Ávila, S. V, Molina-Freaner, F., Arita, H. T., Castillo, A... (2006). Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, 22(1), 329–344.
- Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.019>
- Ruvalcaba-Ruiz, D., Palomino, G., Martínez, J., Méndez, I., & Rodríguez-Garay, B. (2012). In vitro induction of a trisomic of *Agave tequilana* Weber var. Azul (Agavaceae) by para-fluorophenylalanine treatment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(1), 144–152. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9405-0>
- Salm-Reifferscheidt, J. (1859). *Bemerkungen über die Gattungen Agave und Fourcroya: nebst Beschreibung einiger neuen Arten*. August Grimpe.
- Saunders, G. W. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical transactions of the Royal Society B: Biological sciences*, 360(1462), 1879–1888. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1719>
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805–1811. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1730>

- Seberg, O., Petersen, G., Davis, J. I., Pires, J. C., Stevenson, D. W... (2012). Phylogeny of the Asparagales based on three plastid and two mitochondrial genes. *American Journal of Botany*, 99(5), 875–889. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.1100468>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SAGARPA). (2025). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sharma, R., Mahla, H. R., Mohapatra, T., Bhargava, S. C., & Sharma, M. M. (2003). Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, 43–50.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.94.3.275>
- Tahir, H. M., Summer, M., Mehmood, S., Ashraf, S., & Naseem, S. (2019). DNA barcoding of spiders from agricultural fields. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(2), 4144–4151. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1693283>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11 (11).
- Tavares, E. S., & Baker, A. J. (2008). Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-81>
- Thakur, V. V., Tiwari, S., Tripathi, N., Tiwari, G., & Sapre, S. (2016). DNA barcoding and phylogenetic analyses of *Mentha* species using *rbcL* sequences. *Ann. Phytomed*, 5(1), 59–62.
- Thiede, J., & Eggli, U. (2020). Agavaceae. En U. Eggli & R. Nyffeler (Eds.), *Monocotyledons* (pp. 9–19). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56486-8_112
- Trejo, L., Limones, V., Peña, G., Scheinvar, E., Vargas-Ponce, O... (2018). Genetic variation and relationships among agaves related to the production of Tequila and Mezcal in Jalisco. *Industrial Crops and Products*, 125, 140–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.072>

- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., & Colunga-GarcíaMarín, P. (2009). Diversity and structure of landraces of Agave grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany*, *96*(2), 448–457. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.0800176>
- Varma, A., Padh, H., & Shrivastava, N. (2007). Plant genomic DNA isolation: An art or a science. *Biotechnology Journal*, *2*(3), 386–392. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/biot.200600195>
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *360*(1462), 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Xia, Y. U. N., Gu, H.-F., Peng, R. U. I., Chen, Q. I. N., Zheng, Y.-C... (2012). COI is better than 16S rRNA for DNA barcoding Asiatic salamanders (Amphibia: Caudata: Hynobiidae). *Molecular Ecology Resources*, *12*(1), 48–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03055.x>
- Zayas, A. A. (1991). Patrones de la incrustación fitomelánica de la cubierta seminal en algunos miembros del Orden Asparagales. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, *12*, 81–96. <http://www.jstor.org/stable/42596934>
- Zemlak, T. S., Ward, R. D., Connell, A. D., Holmes, B. H., & Hebert, P. D. N. (2009). DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, *9*(s1), 237–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02649.x>
- Zhu, S., Liu, Q., Qiu, S., Dai, J., & Gao, X. (2022). DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chinese Medicine*, *17*(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00655-y>