

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



ANÁLISIS DE LAS RELACIONES GENÉTICAS ENTRE *Agave lechughilla*, *A lophantha* Y *A. lechuguilla* X *lophantha* POR MEDIO DE MARCADORES ISSR

Tesis

Que presenta: **JUAN ALEJANDRO ALCOCER BAUTISTA**

Como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila

Mayo de 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

ANÁLISIS DE LAS RELACIONES GENÉTICAS ENTRE *Agave lechughilla*, *A lophantha* Y *A. lechughilla X lophantha* POR MEDIO DE MARCADORES ISSR

Por:

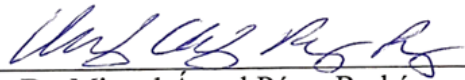
JUAN ALEJANDRO ALCOCER BAUTISTA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título profesional de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el comité de asesoría:



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Director principal



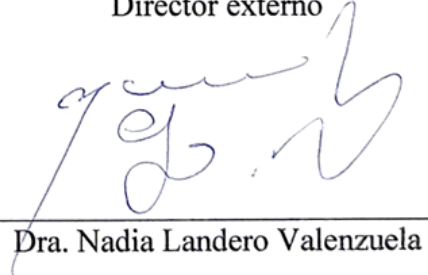
Dr. David Castillo Quiroz

Director externo



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Co-Asesora



Dra. Nadia Landero Valenzuela

Co-Asesora

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2026

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

ANÁLISIS DE LAS RELACIONES GENÉTICAS ENTRE *Agave lechughilla*, *A lophantha* Y *A. lechuguilla* X *lophantha* POR MEDIO DE MARCADORES ISSR

Por:

JUAN ALEJANDRO ALCOCER BAUTISTA

TESIS

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

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:

Dra. Sonia Noemi Ramírez Barrón

Presidenta

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Secretario

Dr. David Castillo Quiroz

Sinodal

Dra. Nadia Landero Valenzuela

Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez

Coordinador de la división de ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Mayo de 2026

Derechos de autor y declaración de no plagio

Todo el 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 verdad que no se incurrió en plagio ni en conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducir fragmentos o textos sin citar la fuente o al autor original (cortar y pegar); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto-plagio); comprar, robar o pedir prestados datos o la tesis para presentarlos como propios; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; emplear material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o la fuente. Asimismo, 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.



Juan Alejandro Alcocer

Bautista

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Ricardo Alcocer y María de los Ángeles Bautista, por ser mi pilar de apoyo en todo momento, por el amor incondicional que me dan y por ser mis mayores ejemplos en mi vida.

A mis hermanos, Ilse Alcocer, Ricardo Alcocer y Ana Alcocer, por brindarme maravillosas experiencias, apoyarme en este proceso y confiar en mí.

A mi Alma Terra Mater por darme las herramientas necesarias para realizar esta hazaña, por ser un lugar cálido y significativo en mi vida y por haberme regalado la experiencia de ser un universitario foráneo.

A mi asesor, el Dr. Miguel Ángel Pérez, por ser un gran guía, por compartirme mucho de sus conocimientos y por su gran apoyo dentro y fuera del ámbito estudiantil.

A mis abuelos, Inés Cuate, Silvano Bautista[†] y Rosalvina Espíritu, por su calidez y brindarme un amor sincero.

A mi familia, por el cariño, apoyo y aliento recibido por parte de ustedes, en especial de ustedes tíos: Minerva Reyes, Pedro Bautista, Petra Bautista, Verónica Espíritu y de ustedes primos: Pedro Bautista, Adilene Bautista, Edgar Bautista[†], y Julio Bautista.

A mi segunda familia, Angélica Alonso, Ximena Hernández y Vanesa Cruz, por cuidarme y apoyarme como lo hace la familia, hacer más amena la experiencia de ser foráneo e incluso por consolarme cuando solo nos tuvimos a nosotros mismos.

A mis amigos, por confiar en mí, regalarme bonitas experiencias y apoyarme cuando se ocupó, en especial a Alhelí Solano, Valeriano Carrillo, Alexander Pedraza, Valeria Cavazos, Karla González, Bryan Rivera, Ángel Castro y Carolina Herrera.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la ciencia.

Así también, se lo dedico a mi persona, a mis padres, hermanos y a las personas que siempre me apoyaron, porque gracias a eso hoy logro cumplir uno de mis más grandes sueños.

RESUMEN

El género *Agave* es de los más representativos de México, estas plantas se extienden por todo el territorio nacional. Aunque son reconocidas principalmente por la generación de grandes riquezas en la industria alcohólica, estas plantas últimamente han llamado la atención por sus diversas aplicaciones biotecnológicas. En algunas regiones áridas y semiáridas de México representan el único sustento de las comunidades, como es el caso de *Agave lechuguilla*, esta planta en algunas zonas sus poblaciones se sobreponen con la de *A. lophantha* la cual tiene un periodo reproductivo similar, dando como resultado plantas híbridas (*A. lechuguilla* X *lophantha*). El objetivo del presente estudio fue analizar mediante marcadores moleculares ISSR las relaciones genéticas entre colectas de *A. lechuguilla*, *A. lophantha* y una colecta de *Agave sp*, siendo ésta morfológicamente intermedia entre las otras dos especies. Para ello se utilizaron un total de 24 muestras de *Agave* (10 de *A. lechuguilla*, 10 de *A. lophantha* y 4 de *Agave sp*). Se realizaron reacciones de PCR con los siguientes cebadores ISSR: PR1:(GA)8C, PR2:(GA)8YC, PR3:(AG)8YC, PR4:(GA)8YG, PR5:G(AG)7AC y PR6:(GACA)3YR. De los geles ISSR-PCR se obtuvo una matriz binaria considerando 1 en presencia de banda y 0 para ausencia de esta, con dicha matriz se calcularon índices de variabilidad genética, y la creación de dendrogramas basados en el método (UPGMA) utilizando el coeficiente de Jaccard. Los cebadores utilizados en este estudio amplificaron un promedio de 21 loci, así mismo mostraron valores PIC entre e 0.368 a 0.320, un poder discriminativo promedio de 0.868, y un poder de resolución superior a 10 en cinco de los seis cebadores. En los dendrogramas generados puede observarse un clado derivado de las muestras de *Agave sp*. que no se atribuye como híbrido, un AMOVA refuerza esta interpretación, al mostrar que solo el 7 % de la variación genética se distribuye entre los tres grupos analizados, mientras que el 93 % ocurre dentro de los grupos y una interpretación mediante una gráfica PCoA muestra agrupamientos compactos y bien delimitados, sugiriendo que cada grupo analizado posee identidad genética propia.

ABSTRACT

The *Agave* genus is one of the most representative of Mexico, these plants are spread throughout the national territory. Although they are mainly recognized for the generation of great wealth in the alcohol industry, these plants have recently attracted attention for their diverse biotechnological applications. In some arid and semi-arid regions of Mexico they represent the only sustenance of communities such as the case of *Agave lechuguilla* which in some areas its populations overlap with that of *A. lophantha* which has a similar reproductive period, resulting in hybrid plants (*A. lechuguilla* X *lophantha*). The objective of the present study was to analyze by means of ISSR molecular markers the genetic relationships between collections of *A. lechuguilla*, *A. lophantha* and a collection of *Agave sp*, being this one morphologically intermediate between the other two species. A total of 24 *Agave* samples were used (10 of *A. lechuguilla*, 10 of *A. lophantha* and 4 of *Agave sp*). PCR reactions were performed with the following ISSR primers: PR1:(GA)8C, PR2:(GA)8YC, PR3:(AG)8YC, PR4:(GA)8YG, PR5:G(AG)7AC and PR6:(GACA)3YR. A binary matrix was obtained from the ISSR-PCR gels, considering 1 in the presence of a band and 0 for the absence of a band, with this matrix genetic variability indexes were calculated, and the creation of dendrograms based on the method (UPGMA) using Jaccard's coefficient. The primers used in this study amplified an average of 21 loci, and showed PIC values between 0.368 and 0.320, an average discriminative power of 0.868, and a resolution power higher than 10 in five of the six primers. In the dendrograms generated, a clade derived from the *Agave sp*. samples that is not attributed as a hybrid can be observed, an AMOVA reinforces this interpretation, showing that only 7% of the genetic variation is distributed among the three groups analyzed, while 93% occurs within the groups. An interpretation using a PCoA graph shows compact and well-defined clusters, suggesting that each group analyzed has its own genetic identity.

INDICE DE CONTENIDO

I	INTRODUCCIÓN	11
II	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo general	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
III	HIPÓTESIS.....	13
IV	REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
4.1	Familia Asparagaceae.....	14
4.2	Familia Agavaceae, hoy subfamilia Agavaideae: Asparagaceae	14
4.2.1	Características botánicas	16
4.2.2	Importancia	17
4.3	El género <i>Agave</i>	18
4.3.1	<i>Agave lechuguilla</i>	20
4.3.1.1	Descripción botánica.....	20
4.3.1.2	Distribución geográfica.....	21
4.3.1.3	Importancia ecológica y económica	21
4.3.2	<i>Agave lophanta</i>	22
4.3.2.1	Descripción botánica.....	23
4.3.2.2	Distribución geográfica.....	24
4.3.2.3	Importancia	24
4.3.3	<i>Agave lechuguilla</i> X <i>lophanta</i>	25
4.4	Marcadores moleculares	26
4.4.1	Marcadores ISSR	29
4.4.1.1	Metodología y desarrollo	30

4.4.1.2	Análisis de estudios con ISSR	32
4.4.1.3	Revisión de estudios con ISSR en <i>Agave</i>	32
V	MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1	Colecta y conservación del material vegetal	35
5.2	Extracción de ADN genómico y electroforesis	36
5.3	Cebadores utilizados.....	36
5.4	Amplificación de ADN con los cebadores	37
5.5	Electroforesis de la amplificación y construcción de matrices binarias.....	38
5.6	Análisis de resultados	38
5.6.1	Índices de diversidad genética	38
5.6.2	Análisis de Varianza Molecular	39
5.6.3	Análisis de Coordenadas Principales	39
5.6.4	Construcción de árboles filogenéticos	39
VI	RESULTADOS.....	41
6.1	Colecta.....	41
6.2	Extracción de ADN genómico	41
6.3	Geles electroforéticos de los ISSR-PCR	42
6.4	Índices de diversidad genética.....	45
6.5	Análisis de la varianza molecular.....	46
6.6	Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	47
6.7	Dendrogramas obtenidos	48
VII	DISCUSIÓN	50
VIII	CONCLUSIONES	55
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores moleculares basados en ADN.	27
Tabla 2. Cebadores ISSR utilizados.	37
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para las 24 muestras.	37
Tabla 4. Programa de PCR para la amplificación de las 24 muestras de ADN.	38
Tabla 5. Índices de diversidad genética de los seis cebadores utilizados.	45
Tabla 6. Análisis de varianza molecular	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la familia Agavaceae.....	15
Figura 2. Algunas especies pertenecientes a Agavoideae.....	16
Figura 3. Anatomía del agave	19
Figura 4. Ejemplares de <i>A. lechuguilla</i> Torr.....	20
Figura 5. Algunos productos hechos a partir del ixtle de lechuguilla.....	22
Figura 6. Plantas de <i>A. lophanta</i>	23
Figura 7. Ejemplar de <i>Agave lechuguilla</i> X <i>lophanta</i>	25
Figura 8. Proceso para realizar la técnica de marcadores moleculares de ADN	28
Figura 9. Esquema representativo de un patrón de bandeo de marcadores dominantes y codominantes.....	29
Figura 10. Representación esquemática de una misma secuencia de ADN amplificada con los 3 tipos de cebadores.....	31
Figura 11. Áreas de colecta de muestras vegetales.....	35
Figura 12. Especímenes analizados	41
Figura 13. ADN genómico de todas las muestras.....	42
Figura 14. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR1 (GA) ₈ C	42
Figura 15. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR2 (GA) ₈ YC.	43
Figura 16. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR3 (AG) ₈ YC.	43
Figura 17. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR5 (GA) ₈ YG.	44
Figura 18. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR5 G(AG) ₇ AC.	44
Figura 19. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR6 (GACA) ₃ YR.....	45

Figura 20. PCoA derivado de una matriz binaria.....47

Figura 21. Dendrogramas resultantes de los patrones de bandeo originados con los seis
cebadores.....49

I INTRODUCCIÓN

Los agaves son un grupo de plantas suculentas que prosperan en ambientes áridos o semiáridos, habiendo bastantes especies consideradas endémicas de México. A pesar de que estas plantas son principalmente conocidas por su uso en la industria de bebidas alcohólicas, cuentan con más usos tales como la producción de fibras textiles, alimentos, herbolaria y cosmética. La lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) ocupa grandes extensiones en las zonas áridas y semiáridas en México, donde su densidad de población es probablemente superior a todos los agaves nativos dentro del Desierto Chihuahuense. En algunas localidades la lechuguilla crece junto con *A. lophantha* donde, hablando morfológicamente, existen formas intermedias que son atribuibles como híbridos, tal es el caso de *Agave lechuguilla X lophantha* la cual se encuentra distribuida en el municipio de Jaumave, Tamaulipas (Gentry, 1982).

La hibridación en agaves se presenta en especies que crecen en donde sus áreas de distribución se sobreponen y la floración de ambas especies se presenta en el mismo periodo, como resultado se presentan individuos con características morfológicas intermedias de sus parentales (García, 2007). La determinación de la hibridación inicialmente depende de caracteres morfológicos, utilizando la intermediación entre los parentales para inferir si los individuos considerados son de origen híbrido; sin embargo, muchas características morfológicas están bajo control genético complejo. En la actualidad, los desarrollos recientes en sistemática incluyen el uso de caracteres moleculares, basados en amplificación del ADN o en su secuenciación, para poder diferenciar entre dos individuos.

En este trabajo se utilizaron marcadores ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas) para analizar las relaciones genéticas entre colectas de *A. lechuguilla*, *A. lophantha* y una colecta de *Agave sp*, siendo esta morfológicamente intermedia entre las otras dos especies (*Agave lechuguilla X lophantha*).

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar las relaciones genéticas entre colectas de *A. lechuguilla*, *A. lophantha* y una colecta de *Agave sp*, siendo esta morfológicamente intermedia entre las otras dos especies (*Agave lechuguilla* X *lophantha*).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar la técnica de marcador molecular ISSR a las colectas de *Agave*.
- Construir dendrogramas a partir de matrices binarias provenientes de los ISSR-PCR.
- Analizar mediante un AMOVA de los datos de los ISSR los componentes de varianza y sus niveles de significancia.
- Calcular índices de variabilidad genética con los cebadores ISSR utilizados.

III HIPÓTESIS

Es posible determinar, mediante marcadores de tipo ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas), las relaciones genéticas entre diferentes muestras de *Agave sp.*, *A. lechuguilla* y *A. lophanta*.

IV REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Familia Asparagaceae

La familia Asparagaceae es un grupo muy amplio de plantas monocotiledóneas genéticamente relacionadas, pero bastante diversas, se trata de arbustos, subarbustos trepadores y de hierbas perennes erectas (Alberto-Hurrell & Delucchi, 2012) en el que se encuentran aproximadamente 150 géneros y más de 2,600 especies las cuales excepto por el Ártico están distribuidas alrededor de todo el mundo, aunque principalmente en zonas tropicales que presentan aridez estacional (Ortiz-Brunel et al., 2021).

La familia Agavaceae, en la que anteriormente se agruparon géneros como el *Agave* o *Yucca* (Guillot Ortiz & Van Der Meer, 2003), actualmente, junto con otras familias pasaron a ser parte de la familia Asparagaceae (Romo & Morrone, 2012). Hoy en día, Agavaceae ha sido recategorizada por el sistema de clasificación de angiospermas (APG; del inglés *Angiosperm Phylogenic Group*) a una subfamilia perteneciente a Asparagaceae (Britannica, 2023; Chase et al., 2009). A su vez Asparagaceae está integrada por siete subfamilias; Agavoideae, Aphyllanthoideae, Asparagoideae, Brodiaeoidae, Lomandroideae, Nolinoideae y Scilloideae (Ortiz-Brunel et al., 2021), de las cuales Agavoideae (antes tratada como familia Agavaceae) es una de las subfamilias más representativas de México, esto gracias a que aquí se incluyen algunas de las especies más emblemáticas del desierto norteamericano (Heyduk et al., 2023).

4.2 Familia Agavaceae, hoy subfamilia Agavaideae: Asparagaceae

Actualmente, Agavoideae es una subfamilia perteneciente a la familia Asparagaceae. Romo & Morrone (2012) mencionan que esta subfamilia anteriormente fue tratada como familia Agavaceae. Este es un grupo de plantas muy diversas las cuales tienen mecanismos fotosintéticos desde C3 hasta CAM (Heyduk et al., 2023). son nativas e icónicas del continente americano, abarcando 12 géneros y 445 especies (Eguiarte et al., 2021). Los géneros de esta subfamilia son plantas que predominan en climas desérticos, tropicales y templados, siendo los desiertos de América del Norte y Centro América el centro de diversidad de muchas de estas especies (Heyduk et al., 2016).

A. García-Mendoza & Galván-V (1995) reportaron la distribución de la familia Agavaceae desde el sur de Canadá, pasando por México, Centroamérica, y hasta el norte de Sudamérica, siguiendo principalmente la cadena montañosa de los Andes (Figura 1).



Figura 1. Distribución de la familia Agavaceae. Tomada y editada de (A. *García-Mendoza & Galván-V, 1995*).

En México, estas especies presentan un alto grado de endemismo, las cuales prevalecen en las zonas áridas y semiáridas, siendo el género *Agave* uno de los más destacados (Romo & Morrone, 2012). Estas especies incluyen plantas que suelen tener características bastante distintivas, que han desarrollado una impresionante adaptación a estas zonas y durante muchos años han sido de gran importancia para los pobladores de estas regiones del país (Eguiarte et al., 2021).

Dicha importancia proviene de los múltiples usos que se le da a estas plantas, Cabral-Cordero (2009) realizó un estudio donde en sus resultados reporta que el mayor uso que se le da a estas plantas es el ornamental, siendo el género *Manfreda* el cual tiene más especies dedicadas a esto, el segundo uso es la producción de fibras donde *Agave* y *Yucca* son los géneros más explotados para tal, incluso estos mismos figuraron igual para el tercer uso más común que es para material de construcción.

4.2.1 Características botánicas

Las plantas de la subfamilia Agavoideae suelen tener tallos cortos o en ocasiones presentar una forma arbolada pero no leñosa. Su tamaño varía, abarcando desde especies pequeñas hasta grandes ejemplares que pueden superar varios metros de altura (Figura 2) (Ortiz-Brunel et al., 2021).



Figura 2. Algunas especies pertenecientes a Agavoideae. Tomada de Agavoideae, Encyclopaedia Britannica, Inc. en octubre del 2024, a través de: <https://www.britannica.com/print/article/8859>

Cuando Agavaceae se trató como una familia aparte Lemus-Díaz et al. (2024) y Thiede & Eggli (2020) describieron botánicamente a esta familia como plantas perennes pequeñas a menudo grandes, hierbas a veces bulbosas, arbustos o árboles, ya sea ramificados o no ramificados, la mayoría son plantas monocárpicas, o policárpicas, terrestres y muy raramente epífitas, con tallos nulos, cortos o arborescentes, en parte con crecimiento secundario y engrosamiento, algunas especies con rizomas extendidos o gruesos y erguidos. Estas plantas pueden tener flores bisexuales o funcionalmente unisexuales, creando un espectáculo floral en el desierto norteamericano (Thiede & Eggli, 2020; Verhoek & William, 2003).

4.2.2 Importancia

Estas plantas se encuentran distribuidas por todo el país, a nivel ecológico representan un importante recurso vegetal, sobre todo en las regiones áridas y semiáridas de México donde desempeñan un papel importante como especies clave en estos hábitats ya que producen abundantes recursos, principalmente durante la temporada reproductiva (Rocha et al., 2006), pues géneros como el *Agave*, *Yucca* y *Hesperoyucca* dominan los paisajes desérticos con sus vastas poblaciones las cuales favorecen a la fauna con su néctar y polen producto de su floración, además de que por medio de sus raíces impiden la erosión del suelo (Thiede & Eggli, 2020 Alcocer et al., 2018).

Actualmente el género *Agave* se considera el más importante, pues estas plantas han sido utilizadas, según reportes, desde hace 9,000 años y actualmente continúa sosteniendo más de 100 usos distintos (Esparza Ibarra et al., 2015), sin embargo, los otros géneros también son considerados como potencial recurso natural hoy en día, pues se aprovechan en gran parte del territorio nacional, bajo actividades productivas de gran importancia en la economía doméstica e industrial (Cabral-Cordero, 2009).

La producción de bebidas alcohólicas a partir de diferentes especies de *Agave* es una práctica común en la actualidad, y tanto las bebidas no destiladas como las destiladas han ganado reconocimiento a nivel nacional e internacional. Aunque en la actualidad las bebidas destiladas son las más populares, históricamente no siempre fue así, pues bebidas como el pulque; bebida alcohólica no destilada, jugaron un papel fundamental en la vida

diaria de las comunidades indígenas y además de tener un impacto significativo en los rituales religiosos y bélicos de la época (Lappe-Oliveras et al., 2008).

Yucca es el segundo género más grande después de *Agave*, sus flores, frutos y el pedúnculo floral son un alimento común en varias regiones de la República, sus hojas se usan para techar casas y con sus fibras son elaborados diversos utensilios (Rocha et al., 2006; Eloy et al., n.d.). De forma resumida, esta familia representa una gran importancia por su contribución a la economía, la salud, la ornamentación y por su gran rol ecológico en los ecosistemas donde habitan estas plantas (Verhoek, 1998).

4.3 El género *Agave*

El género *Agave* es uno de los más representativos de México, siendo este país su centro de origen, aunque también se distribuye en el suroeste de Estados Unidos, Centroamérica y en el Caribe (Barrientos Rivera et al., 2019).

Estas plantas son un grupo de suculentas, monocotiledóneas y hermafroditas, de cutícula gruesa morfológicamente con forma de roseta, que tienen hojas suculentas caducifolias o a veces perennes, muy rígidas en forma lanceolada y marginada más ancha cerca de la base o de la mitad del cuerpo y adelgazándose gradualmente hacia la punta terminando en espina, (Figura 3) de metabolismo fotosintético tipo CAM (Barrientos Rivera et al., 2019; Esparza Ibarra et al., 2015; Rosales et al., 2008; Thiede & Egli, 2020).

La roseta suele producir una sola y muy grande inflorescencia que, generalmente producen néctar durante varios días, y luego muere después de producir las semillas, esta inflorescencia es una de las más espectaculares y biológicamente costosas del reino vegetal (Eguiarte et al., 2021; Scheinvar G., 2018).

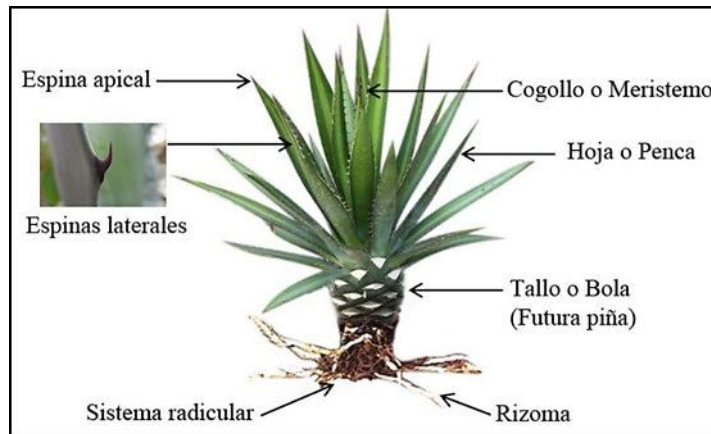


Figura 3. Anatomía del agave

Los agaves son principalmente conocidos por la producción de bebidas alcohólicas ya sean destiladas como el tequila o no destiladas como el pulque llegando a generar grandes riquezas en la industria tequilera (Lappe-Oliveras et al., 2008; Rosales et al., 2008).

Sin embargo, estas plantas pueden satisfacer otras necesidades humanas que van desde fuente de alimento, bebidas, medicina, ornato, fibras como ixtle o henequén y hasta combustibles y fertilizantes (Barrientos Rivera et al., 2019). Por lo cual se han convertido en el soporte económico de múltiples comunidades de México, e incluso representan una riqueza cultural de estas zonas (Rosales et al., 2008).

Recientemente, estas plantas se han convertido en un gran atractivo para la investigación gracias a sus aplicaciones biotecnológicas como son: la producción de bebidas alcohólicas, sirven como sustrato para producción de biopolímeros y/o combustibles, obtención de prebióticos, saponinas, azúcares, compuestos fenólicos y enzimas (Lemus-Díaz et al., 2024).

Taxonómicamente hablando el género *Agave* junto con *Yucca* y otros parientes actualmente el APG (*Angiosperm Phylogeny Group*) en su tercera edición los clasificó dentro de la subfamilia Agavoideae, familia Asparagaceae (Scheinvar G., 2018), de las cerca de 210 especies que se conocen para *Agave*, en México están presentes 159, de las cuales 129 son endémicas (Giraldo-Cañas, 2020).

4.3.1 *Agave lechuguilla*

La lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) es una de las especies más representativas del género *Agave* y la más representativa del desierto chihuahuense (Narcia Velasco et al., 2012), es una de las dos especies con mayor densidad de distribución dentro del continente americano dominante en laderas rocosas de pendiente suave, siendo así una de las especies más recolectadas para su venta en el altiplano mexicano, ya que esta planta contiene una fibra dura que ha sido ampliamente recolectada en el campo para su uso en sacos y esteras, cojines, cepillos. (Nobel & Quero, 1986; Reyes-Agüero et al., 2000).

4.3.1.1 Descripción botánica

Es una planta monocárpica, se trata de un arbusto pequeño (Figura 4) de 30 a 40 cm de ancho y de entre 20 a 70 cm de alto, aunque también pueden encontrarse algunos ejemplares con alturas superiores a 85 cm (Ulises et al., 2011), con 11 a 30 hojas en forma linear-lanceolada de color verde claro a amarillo verdoso con borde córneo y una espina terminal muy fuerte de color grisáceo (Reyes-Agüero et al., 2000).



Figura 4. Ejemplares de *A. lechuguilla* Torr. Fotografía tomada en el Jardín botánico de la UAAAN.

Sus hojas se forman a partir de una sola yema apical la cual es un cumulo de hojas jóvenes que están enrolladas en un mismo eje central y, que comúnmente se conoce como cogollo (Reyes-Agüero et al., 2000), es de este brote central de hojas sin abrir que se extrae la fibra comercialmente viable conocida como ixtle (Nobel & Quero, 1986), ya maduras

las hojas pueden llegar a medir de entre 20 a 50 cm de largo y de 2.5 a 6 cm de ancho (Narcia Velasco et al., 2012).

La forma de reproducción de la lechuguilla puede presentarse de dos formas; asexual donde se reproduce de forma vegetativa a partir de brotes jóvenes que se producen a partir de los rizomas de la planta madre, en la forma sexual alcanza su madurez desde los cuatro hasta los 15 o 20 años siendo los meses de mayo y junio cuando florece, si la planta no se cosecha, el cogollo se convierte en un tallo de dos a tres metros de altura con flores de color amarillo claro, es considerada monocárpica al tener un único episodio reproductivo, pues muere después de florecer y fructificar como muchas otras especies del género (Nobel & Quero, 1986; Reyes-Agüero et al., 2000).

4.3.1.2 Distribución geográfica

A. lechuguilla es una especie nativa del noreste de México y sur de Estados Unidos (Castillo Quiroz et al., 2020), en México se encuentra distribuida principalmente en los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas y en menor proporción en los estados de Puebla, Hidalgo y Oaxaca, teniendo una cobertura total en el territorio nacional de 20 millones de hectáreas (Carmona et al., 2017; Ortiz-Brunel et al., 2021).

4.3.1.3 Importancia ecológica y económica

La lechuguilla es predominante en el matorral desértico rosetófilo y no enfrenta problemas de conservación, ya que se reproduce tanto por semillas como de manera vegetativa, formando colonias densas que pueden bloquear el paso. Además, es resistente a condiciones extremas del ambiente y a plagas y enfermedades por lo que se considera una especie indicadora del Desierto Chihuahuense además de ser endémica y tener una amplia distribución natural. (A. J. García-Mendoza, 2018; López-Serrano et al., 2021)

En algunas de regiones áridas y semiáridas de México la lechuguilla ha sido considerado como la única fuente de recursos que tienen los habitantes para generar ingresos económicos, aproximadamente 52,000 hogares en estas áreas tienen a la lechuguilla como su principal medio de sustento, lo que la convierte en un elemento clave para la economía local y el bienestar de estas comunidades (López-Serrano et al., 2021).

La lechuguilla es una fuente principal de fibras duras en el norte de México ya que posee propiedades de resistencia y maleabilidad en su principal producto conocido como ixtle, ésta se trabaja principalmente en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Zacatecas, (López-Serrano et al., 2021), dicha fibra se exporta a Europa, Asia y Norteamérica como material industrial en la elaboración de cepillos para pulir metales; relleno de muebles, asientos, alfombras, filtros automotrices; al mezclarse con resinas se usa para fabricar puertas, techos y además de estar a prueba como refuerzo en mezclas de concreto en el sector construcción, mientras que los materiales procesados en México obtenidos a través de estas fibras (Figura 5) se exportan a algunos países de Sudamérica principalmente a Brasil, Argentina, Chile y Uruguay (Cabral-Cordero, 2009).



Figura 5. Algunos productos hechos a partir del ixtle de lechuguilla.

4.3.2 Agave lophantha

El *Agave lophantha* se trata de una planta suculenta originaria de los desiertos de Chihuahua, Sonora y el suroeste de los Estados Unidos (Gentry, 2004), en algunas literaturas se puede encontrar como *Agave univittata*, este nombre de la especie significa que tiene una sola raya longitudinal en el centro de la hoja, pues esta es muy característica de la especie (Walker, 2019), dicha planta se considera una muy versátil ya que prospera con luz solar directa, pero también tolera la sombra parcial y puede soportar temperaturas de frío extremo de hasta $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (University of Florida, n.d.; Walker, 2019).

Esta planta anteriormente se trató como un taxón diferente de *A. univittata* Haw, un agave muy parecido morfológicamente sin embargo Thiede et al. (2021) demostraron que se trata del mismo taxón, neotipificando así ambas en la misma especie.

4.3.2.1 Descripción botánica

Agave lophantha es una planta suculenta perenne que forma rosetas desde 60 hasta 90 cm de alto y de aproximadamente 60 cm de diámetro, sus hojas córneas grisáceas prominentes, en forma lineal lanceolada tienen dientes afilados sobresalientes en los márgenes, espinas terminales y con un color verde oscuro, resaltadas con una raya central de color dorado cremoso a lo largo de cada hoja que se ilumina en primavera y principios del verano. Su pico de flor es de hasta 4,5 m de altura (University of Florida, n.d.; Walker, 2019).

Aunque el follaje puede ser distinto en algunos ejemplares dependiendo el cultivar, como es el caso de la conocida *A. lophantha* “quadricolor” (Figura 6) la cual tiene hojas de color verde oscuro, con bordes amarillos y una franja verde pálido en el medio; las hojas también están acentuadas con dientes de color rojo oscuro que bordean sus márgenes (Gentry, 1982; McNeill et al., 2018).



Figura 6. Plantas de *A. lophantha*. a) ejemplares de *A. lophantha*, b) *A. lophantha* “Quadricolor”

Esta planta requiere de varios años para florecer, sus flores son de un color amarillo verdoso en un tallo que puede llegar hasta los 3,6 metros de altura. Al igual que otros agaves, florece solo una vez en su vida y muere poco después. Sin embargo, cuenta también con una reproducción vegetativa, pues alrededor de la base de la planta crecen los hijuelos que continuarán su crecimiento (Gentry, 1982).

4.3.2.2 Distribución geográfica

De acuerdo con los registros conocidos de esta especie, se distribuye desde el sur de los Estados Unidos, y dentro del territorio mexicano, en los estados de Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz, extendiéndose su distribución conocida hasta el estado de Chiapas (Beutelspacher Baigts, 2017). Es frecuente en calizas, como en acantilados y afloramientos rocosos con elevaciones de entre 30 hasta los 1,500 metros (Gentry, 2004).

4.3.2.3 Importancia

A pesar de que esta planta no es muy aprovechada para usos alimenticios o de bebidas, Cabral-Cordero (2009) menciona que este agave ha sido utilizado para producir una bebida alcohólica destilada conocida como “mezcal”, dado que sus savias se pueden fermentar para obtener bebidas alcohólicas como el mencionado mezcal o el pulque, sin embargo, su principal uso potencial es el ornamental.

Esta planta originaria de México se ha introducido a otras regiones del mundo, donde ha ganado gran aprecio por su valor ornamental, ya que brinda un toque exótico y tropical a los jardines (Viveros Shangai, n.d.). Algunos pobladores de las regiones áridas y semiáridas de México también la utilizan como material de construcción, para la obtención de fibras ya que estas se pueden emplear para fabricar textiles, cuerdas o papel, y sus hojas se pueden usar como forraje para el ganado o como abono orgánico, sus flores se pueden consumir como alimento o como endulzante natural (Van Der Meer & Puche, 2014).

Este recurso vegetal está siendo un foco de atención entre los investigadores, pues muchos compuestos extraídos a partir de esta planta tienen usos potenciales en distintas áreas, un ejemplo lo tenemos con El-Sayed et al. (1991), que realizaron un estudio en el cual demostraron el potencial moluscicida del polvo seco y diferentes extractos butanólicos de *A. lophantha* contra *Biomphalaria alexandrina*.

Esta planta también tiene gran importancia en el área de la salud, otro ejemplo el estudio realizado por Abdel-Khalik et al. (2002) en el que se evaluaron las actividades farmacológicas de saponinas extraídas a partir de esta planta, proponiéndolas como

alternativas farmacológicas como esteroides. Incluso investigadores de la universidad Autónoma de Nuevo León han llegado a patentar un extracto metanólico de la planta *A. lophantha* con actividad anticancerígena sobre distintas líneas celulares cancerosas como HeLa, HT29 y Caco-2 (Leos Rivas et al., 2015).

4.3.3 *Agave lechuguilla* X *lophantha*

A. lophantha está más estrechamente relacionado con el *Agave lechuguilla*, una especie común y ampliamente distribuida en México, con la que muy frecuentemente se confunde, hibrida, e incluso se integra en su hábitat natural para crear poblaciones juntos (Gentry, 2004; Walker, 2019).

El tamaño de la planta resultante en esta hibridación (*Agave lechuguilla* X *lophantha*) (Figura 7) es de 77 cm aproximadamente, contiene características morfológicas de ambos progenitores, combina la forma de roseta de *A. lophantha*, que suele tener un color verde oscuro con bordes más claros, y las espigas de ambas especies, se han encontrado poblaciones naturales en el ejido Independencia, Jaumave, Tamaulipas en un matorral submontano con una pendiente de entre 4 a 6% y en suelos sin pedregosidad, a diferencia de las poblaciones naturales en el estado de Coahuila que se encuentran en el matorral desértico necrófilo con alta pedregosidad.



Figura 7. Ejemplar de *Agave lechuguilla* X *lophantha* municipio de Jumave Tam.

4.4 Marcadores moleculares

México alberga una gran variedad genética de especies, esta diversidad da lugar a que un determinado taxón pueda evolucionar momentáneamente a cambios ambientales, los mecanismos de reproducción y entrecruzamiento son la principal causa de esta variabilidad genética en las especies vegetales (Bueno et al., 2018). Para estudiar esta diversidad genética se ha hecho el uso de distintas herramientas como son los marcadores genéticos ya sean morfológicos, o mediante el análisis directo al ADN o de sus productos bioquímicos como son las proteínas o enzimas (Muñoz, 2005; Wong Chia, 2009) los cuales se describen a continuación (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015; Bueno et al., 2018; Ríos et al., 2009; Wong Chia, 2009).

- Marcadores morfológicos: dependen de la observación visual y la medición para caracterizar especies basándose en atributos visibles o cuantificables como pueden ser características botánicas, fenológicas y agronómicas, siempre tratando de elegir aquellos que son de alta heredabilidad.
- Marcadores bioquímicos: se basan principalmente en el uso de isoenzimas; variantes alélicas de un mismo gen, debido a la diferencia de migración ya sea por su peso molecular o punto isoeléctrico, así es posible distinguir variantes alélicas en un patrón electroforético.
- Marcadores basados en ADN: podemos definirlos como secuencias de ADN de la cual conocemos su ubicación dentro del cromosoma, pudiendo ser o no un gen y que además su efecto puede ser cuantificable u observable, este tipo de marcador se consideran los más confiables.

Gill-Langarica & Mayek-Pérez, (2008) mencionan que tanto los marcadores bioquímicos como morfológicos son controlados en su mayoría por un solo locus y pueden expresarse de distinta forma dependiendo de los factores ambientales. Por el contrario, los marcadores moleculares basados en ADN presentan mayor confiabilidad, rentabilidad y sensibilidad ya que estos no se ven afectados por factores ambientales como lo harían los otros tipos de marcadores (Bisht et al., 2024).

Para Alcántara, (2007) un buen argumento de utilizar los marcadores moleculares sobre los morfológicos o bioquímicos es que son universales y pueden brindar la

información filogenética necesaria para estudios realizados en edades tempranas donde no es posible el uso de marcadores morfológicos.

Hoy en día con el gran avance de la biología molecular existe un gran interés por estudiar los marcadores basados en el ADN, esto debido a que son capaces de revelar un alto grado de polimorfismo (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015), gracias a ello se cuenta con un extenso catálogo de diferentes marcadores moleculares los cuales varían dependiendo su capacidad para detectar diferencias entre individuos, costos de la técnica, nivel de dificultad, consistencia y reproducibilidad (Wong Chia, 2009), y dependiendo el método de identificación podemos agruparlos en tres categorías principalmente: los que se basan en hibridación, los basados en amplificación del ADN y los que combinan ambas técnicas (González, 2008), estos se resumen en el Tabla 1.

Cuando hablamos de los marcadores moleculares basados en hibridación, es importante tener en cuenta que estos marcadores son capaces de revelar polimorfismos en todo el genoma del organismo bajo estudio (González, 1998). En estas técnicas, primero se realiza una digestión del ADN con enzimas de restricción, seguida de una separación electroforética. Finalmente, los patrones polimórficos se detectan mediante hibridación con una secuencia de ADN marcada, lo que permite su visualización.

Tabla 1. Marcadores moleculares basados en ADN.

Tipo de marcador	Ejemplos
Hibridación	RFLP: Polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción. VNTR: Repeticiones en tándem de número variable.
Amplificación de ADN	RAPD: Fragmentos polimórficos amplificados aleatoriamente. SSR: Secuencias simples repetidas. ISSR: Inter secuencias simples repetidas. CAPS: Digestión de secuencias polimórficas amplificadas.
Mixtos	AFLP: Polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado

Se utilizan acrónimos en inglés seguidos de la traducción en español, debido a que así se maneja en la literatura.

Por otro lado, los marcadores basados en la amplificación del ADN utilizan fragmentos cortos de ADN, los cuales son producto de una amplificación mediante la

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Figura 7). Estos marcadores pueden emplear cebadores arbitrarios, semi-arbitrarios o específicos (Wong Chia, 2009).

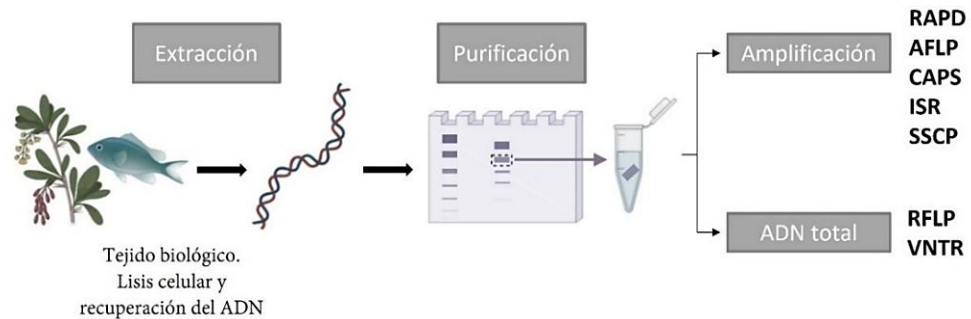


Figura 8. Proceso para realizar la técnica de marcadores moleculares de ADN. Se parte de la extracción del ADN, purificación y las dos vías por la que se puede revelar los polimorfismos. Editado de (González, 1998).

Siguiendo las leyes de segregación de Mendel, dependiendo del tipo de alelos que es capaz de detectar el marcador, estos pueden ser de carácter dominante o codominante, diferenciándose porque los dominantes tienen dos alelos, es decir, se manifestará como banda amplificada si existe el alelo homocigoto dominante o heterocigoto y ausente si está presente el alelo homocigoto recesivo, mientras que los codominantes pueden tener varios alelos detectando los heterocigotos de forma independiente (Figura 8). La existencia de estos dos tipos de marcadores es importante porque permite obtener información más detallada sobre la variabilidad genética y las relaciones entre diferentes organismos (Amiteye, 2021; Delgado & Neyra, 2019).

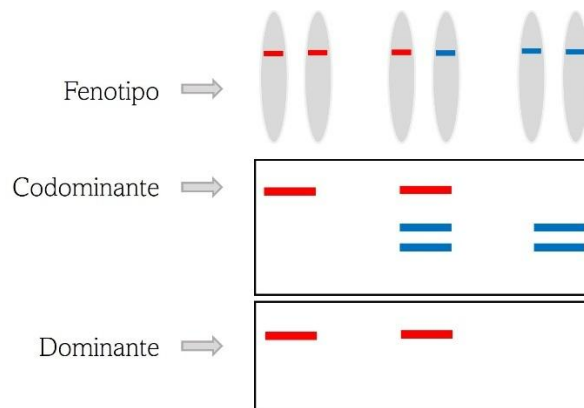


Figura 9. Esquema representativo de un patrón de bandeo de marcadores dominantes y codominantes. Se muestran ambos casos para los alelos homocigotos dominantes (rojo) y recesivos (azul), así como para los heterocigotos.

4.4.1 Marcadores ISSR

Dentro del genoma de los organismos eucariontes se encuentran secuencias cortas de ADN repetidas en tándem, las cuales están ampliamente distribuidas, tanto en regiones codificantes como no codificantes. Estas secuencias son conocidas como microsatélites y presentan un grado de variabilidad entre los organismos, debido principalmente a errores durante la replicación del ADN (Bornet & Branchard, 2001; Fernández-Galindo et al., 2022). Estas variaciones dan como resultado una gran cantidad de alelos para cada locus (microsatélite), los cuales se heredan siguiendo las leyes de Mendel, lo que los hace ideales para estudios en diagnóstico de enfermedades, análisis de parentesco y genética de poblaciones (Amiteye, 2021).

Entre los marcadores que se enfocan en los microsatélites se encuentran: Repeticiones de Secuencia Simple (SSR), Repeticiones Cortas en Tándem (STR), Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR), Repeticiones en Tándem de Secuencia Simple (SSTR) y Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTR), entre otros. (Cotsapas et al., 2018; A. González, 2008; Marwal & Gaur, 2020).

Los ISSR, o “*Inter Simple Sequence Repeats*” (Inter Secuencias Simples Repetidas), son una técnica de marcador molecular basada en PCR de carácter dominante, que permite detectar las variaciones alélicas dentro de los microsatélites dispersos por el genoma (Medrano-Hernández et al., 2017; Pradeep Reddy et al., 2002). Esta técnica fue

desarrollada por Zietkiewicz et al. (1994), y desde entonces, hasta los últimos años, ha sido ampliamente utilizada en estudios de genética de poblaciones. Una de las principales razones de su popularidad es que su aplicación no requiere información previa sobre el genoma estudiado (Garro-Monge et al., 2014; Li et al., 2006).

4.4.1.1 Metodología y desarrollo

Esta técnica se realiza mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la amplificación, se utilizan cebadores semi-arbitrarios, es decir, un único iniciador con di o trinucleótidos repetidos en tándem, que comúnmente se extiende a 14 nucleótidos o más (Garro-Monge et al., 2014). Este iniciador es complementario a las regiones microsatélites. Lo que se busca con este método es realizar una hibridación entre el iniciador y dos regiones microsatélites complementarias al iniciador, que además se encuentren a una distancia aproximada de 100 a 2,500 nucleótidos. De este modo, se obtiene la amplificación de las regiones entre dos microsatélites (Wong Chia, 2009).

Los cebadores utilizados en esta metodología pueden ser anclados o no anclados (Figura 9). Los cebadores no anclados solo cuentan con los nucleótidos complementarios al microsatélite. Por otro lado, los cebadores anclados, además de poseer los nucleótidos complementarios al microsatélite, contienen de una a cuatro bases adicionales, conocidas como nucleótidos degenerados, que flanquean la secuencia, ya sea en dirección 5' o 3', permitiendo el anclaje del iniciador a un sitio específico del microsatélite (Pradeep Reddy et al., 2002; Wong Chia, 2009).

Los productos resultantes de la amplificación de microsatélites inter (ISSR-PCR) se separan mediante electroforesis, ya sea en geles de agarosa o de poliacrilamida. Según Pradeep Reddy et al. (2002), una electroforesis en gel de poliacrilamida combinada con radiactividad es mucho más sensible y precisa que una realizada en gel de agarosa. A pesar de ello, se han detectado altos niveles de polimorfismo en los productos ISSR-PCR revelados en geles de agarosa. Por lo que se considera que el uso de estos geles sigue siendo bastante efectivo para revelar los patrones de bandas ISSR (Sankar & Moore, 2001).

4.4.1.2 Análisis de estudios con ISSR

Los marcadores moleculares ISSR se han consolidado como una herramienta eficaz en estudios de diversidad genética, caracterización de germoplasma y relaciones filogenéticas en una amplia variedad de especies vegetales (Bornet & Branchard, 2001).

A lo largo de los últimos años, los ISSR han sido empleados con éxito en estudios de diversidad genética en especies como *Vitis vinifera* (Tessier et al., 1999), *Capsicum spp.* (Zietkiewicz et al., 1994), y múltiples especies del género *Agave* (Ángeles-Espino et al., 2020; Vega-Ramos et al., 2022). En estas investigaciones, los marcadores ISSR han demostrado una alta reproducibilidad, generación de un número considerable de bandas polimórficas y buena resolución genética entre accesiones.

4.4.1.3 Revisión de estudios con ISSR en *Agave*

Un estudio reciente realizado por Vega-Ramos et al. (2022) evaluó la eficacia de seis iniciadores ISSR en la diferenciación genética de *A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum* y *A. karwinskii*, utilizando hijuelos como material biológico. Se logró un 70 % de loci polimórficos, mostrando patrones de amplificación claros y consistentes entre especies. Adicionalmente, el análisis de componentes principales con variables morfológicas coincidió con los agrupamientos genéticos obtenidos mediante ISSR, reforzando la validez de estos marcadores como herramienta complementaria en la identificación de especies de *Agave*.

Este tipo de abordaje no sólo apoya a los productores en la correcta selección de material vegetal, sino también a organismos reguladores en el cumplimiento de las normativas de calidad y autenticidad de productos derivados del agave.

En contextos de mejoramiento genético, los ISSR también han demostrado ser útiles. En un experimento realizado por Ángeles-Espino et al. (2020) con *A. tequilana* irradiado con rayos gamma, se logró identificar variantes genéticas con mayor contenido de fructooligosacáridos y con diferencias significativas en sus perfiles genéticos, lo cual puede favorecer la selección clonal,

En un gel de ISSR se observan bandas que representan loci amplificados, el coeficiente Jaccard, es una medida de similitud genética entre dos individuos o especies, basada en la presencia o ausencia de estos fragmentos de ADN amplificados, cada una de estas bandas se codifica como: 1 = presente y 0 = ausente, estas bandas se comparan par a par entre individuos o muestras, considerando únicamente las coincidencias de presencia como evidencia de similitud genética. Su valor oscila entre 0 y 1 donde 1 significa mayor evidencia de similitud, a partir de la matriz de Jaccard, se construyen dendrogramas mediante métodos de agrupamiento como UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, o en el español; Método de Agrupamiento de Pares No Ponderados con Media Aritmética), lo que permite visualizar las relaciones genéticas y establecer agrupamientos entre accesiones o especies de interés (Vega-Ramos et al., 2022; Wolfe & Liston, 1998).

En estudios de diversidad genética, los dendrogramas constituyen una representación gráfica de las relaciones de similitud entre individuos o especies, basados en coeficientes de similitud como el de Jaccard. Estos diagramas en forma de árbol permiten visualizar el grado de proximidad genética entre las muestras analizadas, agrupándolas jerárquicamente en función de sus patrones de bandas moleculares. Para su construcción es común emplear algoritmos de agrupamiento como el método UPGMA el cual genera una estructura filogenética donde la distancia de las ramas refleja el nivel de similitud genética. En el caso de los agaves, los dendrogramas derivados de ISSR han demostrado ser herramientas efectivas para diferenciar especies utilizadas en la producción de mezcal y tequila, así como para detectar posibles relaciones de parentesco

y patrones de variabilidad genética (Queiroz et al., 2015; Vega-Ramos et al., 2022; Wolfe & Liston, 1998).

El método UPGMA es un algoritmo de agrupamiento jerárquico que se utiliza en estudios de genética para construir dendrogramas a partir de matrices de similitud o distancia, Este método asume una tasa de evolución constante (reloj molecular) y agrupa de manera progresiva a los individuos o especies más semejantes, calculando en cada paso el promedio aritmético de las distancias entre los grupos formados (Queiroz et al., 2015).

El resultado es un árbol filogenético donde la longitud de las ramas refleja el nivel de similitud genética. Debido a su sencillez, reproducibilidad y claridad gráfica este método es ampliamente empleado en estudios de diversidad genética de plantas (Queiroz et al., 2015; Wolfe & Liston, 1998).

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta y conservación del material vegetal

Se colectaron muestras de tres especies distintas de *Agave*, tales muestras se tomaron de la parte más tierna de la planta e inmediatamente después del corte se conservaron en alcohol absoluto en tubos de polipropileno de fondo cónico de 15 mL previamente esterilizados. La selección de las localizaciones se realizó en función a la existencia de poblaciones de *Agaves* en cada locación y la cercanía con el área de estudio, estas se describen a continuación:

- *Agave sp.* (Un supuesto híbrido entre *Agave lechuguilla* y *A. lophantha*)

Cuatro especímenes presuntamente híbridos fueron donados por parte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) C.E. Saltillo.

- *Agave lechuguilla*

Se colectaron un total de 15 muestras de material vegetal de *A. lechuguilla* en el jardín botánico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Buenavista Saltillo, Coahuila (25° 21' 21.5562" N, -101° 1' 59.0592" W) (Figura 10).

- *Agave lophantha*

Se colectaron un total de 20 muestras de material vegetal de *A. lophantha* en la comunidad de los Chorros municipio de Arteaga, Coahuila (25° 23' 40.164" N, -100° 47' 41.0604" W) (Figura 10).



Figura 11. Áreas de colecta de muestras vegetales. (a: Jardín botánico UAAAN, b: comunidad de Los Chorros, Arteaga).

5.2 Extracción de ADN genómico y electroforesis

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio, se seleccionaron 10 muestras de material vegetal para el caso de *A. lechuguilla* y *A. lophantha*, así como las cuatro muestras de *Agave* sp. donadas por el INIFAP. Con estas muestras, se procedió a la extracción de ADN genómico utilizando el método CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

Un gramo de tejido de cada muestra fue macerado en un mortero. A estas muestras se les añadieron 700 μ L de buffer CTAB y se incubó la mezcla a 60 °C durante 30 minutos, mezclando ocasionalmente. Luego, se agregaron 0.6 volúmenes de una mezcla de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión durante 15 minutos. La mezcla se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, y posteriormente se transfirieron 400 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL. Al sobrenadante se le añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló suavemente cuatro veces y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación, se decantó el líquido.

A continuación, se realizaron dos lavados de la pastilla con etanol al 70% (400 μ L y 200 μ L, respectivamente), centrifugando a 14,000 rpm durante 5 minutos en cada lavado y decantando el líquido. Finalmente, se dejó secar la pastilla durante toda la noche.

Al día siguiente, las muestras se resuspendieron en 100 μ L de agua Milli-Q estéril y se incubaron a 60 °C durante 30 minutos, mezclando ocasionalmente. Una vez obtenido el ADN genómico, se verificó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en una solución de TAE 1X a 80 V.

5.3 Cebadores utilizados

Para este estudio se utilizaron seis distintos cebadores (Tabla 2) los cuales fueron previamente utilizados por Ángeles-Espino et al. (2020) y Vega-Ramos et al. (2022) para estudios de variabilidad genética en el género *Agave*.

Tabla 2. Cebadores ISSR utilizados.

Cebador (5' → 3')			Tm °C	Referencia
PR1	(GA) ₈ C,	GAGAGAGAGAGAGAGAC	51.5	(Vega-Ramos et al., 2022)
PR2	(GA) ₈ YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	53.0	
PR5	(GA) ₈ YG	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	55.5	
PR4	G(AG) ₇ AC	GAGAGAGAGAGAGAGAC	49.5	
PR3	(AG) ₈ YC	AGAGAGAGAGAGAGAYC	54.0	(Ángeles-Espino et al., 2020)
PR6	(GACA) ₃ YR	GACAGACAGACAYR	45.5	

Nomenclatura de nucleótidos degenerados Y: C ó T, R: A ó G

5.4 Amplificación de ADN con los cebadores

Se realizó la amplificación de ADN (diluido 1:9) por medio de PCR de las 24 muestras por cada cebador (ver Tabla 2), utilizando el estuche comercial GoTaq Green Master Mix 2X de Promega®, por medio de un termociclador Axygen® siguiendo la mezcla y programa de reacción del Tabla 3 y 4.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR para las 24 muestras.

Componente	Volumen	Concentración final
GoTaq Green Master Mix, 2x	12.5 µL	1X
Cebador	0.5-5 µL	0.2-2 µM
ADN molde	4.5 µL	<250 ng
Agua Milli-Q (aforar a)	25 µL	N.A.

Tabla 4. Programa de PCR para la amplificación de las 24 muestras de ADN.

Pasos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 s	45 ciclos
Alineación	Tabla 2	30 s	
Extensión	72 °C	30 s	
Extensión	72 °C	10 min	1 ciclo

La temperatura de alineación fue diferente para cada cebador, ésta se puede consultar en el Tabla 2.

5.5 Electroforesis de la amplificación y construcción de matrices binarias

Los productos de ISSR-PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.2% en una solución de TAE 1X. Para esto, se mezclaron 8 μ L del producto de PCR con 3 μ L de buffer de carga 5X Green GoTaq® de PROMEGA. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V. Una vez finalizada la corrida, el gel se visualizó en un fotodocumentador Axygen®.

Los productos de PCR obtenidos con los seis cebadores diferentes se analizaron directamente a partir del gel, tomando en cuenta todas las bandas de amplificación claramente visibles. Posteriormente, estos patrones de bandeo ISSR se convirtieron en matrices de código binario (0 y 1), donde el valor **1** se asignó para indicar la presencia de una banda y el valor **0** para indicar su ausencia.

5.6 Análisis de resultados

5.6.1 Índices de diversidad genética

Con las matrices binarias se calcularon los índices de eficiencia de cada cebador, como el índice de heterocigocidad (H), el contenido de información polimórfica (PIC), poder discriminatorio (D), poder de resolución (R) y número de loci (N). Estos índices fueron calculados con el programa en línea iMEC (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>).

5.6.2 Análisis de Varianza Molecular

El análisis de varianza molecular (AMOVA, Analysis of Molecular Variance) se realizó con el fin de estimar los componentes de varianza y sus niveles de significancia asociados a la variación genética existente entre individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones analizadas. Este procedimiento se ejecutó utilizando el programa GenAlEx versión 6.5 (Smouse & Peakall, 1999), a partir de los datos moleculares generados mediante marcadores ISSR. La prueba permitió cuantificar la proporción de la variación genética atribuible a cada nivel jerárquico (entre poblaciones y entre los individuos de cada población), proporcionando una medida del grado de diferenciación poblacional.

5.6.3 Análisis de Coordenadas Principales

Asimismo, con el propósito de explorar las relaciones genéticas entre las poblaciones detectadas y visualizar los patrones de agrupamiento entre accesiones, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA, Principal Coordinate Analysis) en el mismo entorno de GenAlEx versión 6.5. Este análisis multivariado se basó en la matriz de distancias genéticas derivada de los datos ISSR, lo que permitió representar gráficamente la distribución genética de los individuos y evaluar la estructura poblacional de manera complementaria a los resultados obtenidos mediante el AMOVA.

5.6.4 Construcción de árboles filogenéticos

Para analizar las relaciones genéticas entre las diferentes muestras de *Agave* estudiadas, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento, el cual se basó en las distancias genéticas obtenidas entre los individuos. Para este propósito, se construyó un dendrograma utilizando el método de agrupamiento jerárquico UPGMA (Método de Agrupamiento por Pares no Ponderado con Media Aritmética, por sus siglas en inglés *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Este método permite representar visualmente las similitudes genéticas entre los genotipos, agrupándolos en función de su proximidad genética.

La medida de similitud genética empleada fue el coeficiente de Jaccard, mientras que el análisis y la generación del dendrograma se realizaron utilizando el software DARwin, versión 6.0, que está diseñado específicamente para el análisis de diversidad genética y la representación gráfica de relaciones filogenéticas. Este programa permite calcular matrices de disimilitud y generar representaciones dendrogramáticas con alta precisión, facilitando la interpretación de los resultados.

VI RESULTADOS

6.1 Colecta

Antes de realizar la colecta de todas las plantas, estas fueron previamente identificadas morfológicamente, en la Figura 11 se presentan ejemplares de las tres especies analizadas, en las zonas de muestreo tanto de *A. lechuguilla* como de *A. lophantha* existen densas poblaciones de ejemplares con distintas edades, por lo que se colectaron mezclas de plantas jóvenes y adultas, mientras que las colectas de *Agave sp.* fueron todas plantas jóvenes



Figura 12. Especímenes analizados. A) *A. lechuguilla*, B) *A. lechuguilla X lophantha* y C) *A. lophantha*.

6.2 Extracción de ADN genómico

Se observó que los tejidos de las plantas más jóvenes fueron más fáciles de macerar que los tejidos de las plantas más adultas, esta maceración influyó a la hora de extraer el ADN genómico, en la Figura 12 se muestran los geles electroforéticos al 0.8% de las 24 muestras, mientras que las muestras de *Agave sp.* (a) fueron plantas jóvenes, y se muestra un gel más uniforme, las otras dos especies fueron plantas adultas mezcladas con jóvenes.

Sin embargo, se obtuvo ADN genómico integro y de alto peso molecular en todas las muestras, con una presencia tenue de barrido, aun así, este ADN se utilizó diluido en una relación 1:9 para realizar las reacciones de PCR. La calidad del ADN genómico fue suficiente para obtener productos de PCR con los cebadores propuestos.

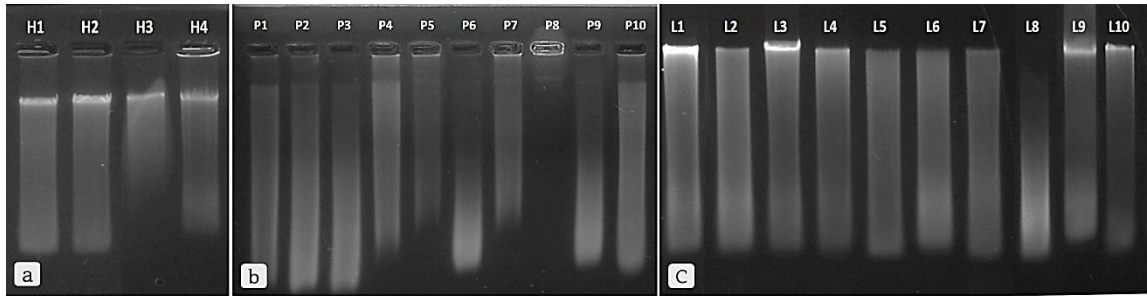


Figura 13. ADN genómico de todas las muestras. (a: presuntos híbridos, donde, en este estudio de denotaron con la letra H 1-4, b: *Agave lophanta* denotados con la letra P 1-10, c: *Agave lechuguilla* denotados con la letra L 1-10).

6.3 Geles electroforéticos de los ISSR-PCR

En las Figuras 13 a 19 se observa el patrón de bandeo ISSR-PCR para cada cebador, obtenido después de una electroforesis en gel de agarosa 2.2%. En dichos geles pueden notarse patrones de bandeos similares entre muestras de la misma especie y, así mismo, diferentes entre especies. De igual manera, en todos los geles se evidencia la presencia de muchas bandas (loci), esto sirvió para la construcción de las matrices binarias y la generación de los estudios posteriores.

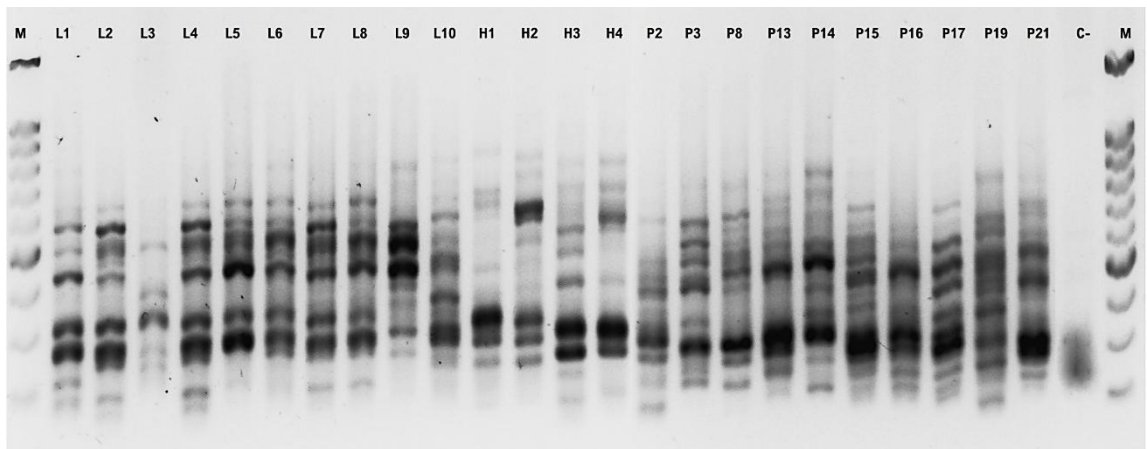


Figura 14. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR1 (GA)₈C. M marcador molecular, L muestras de *A. lechuguilla*, H muestras de *Agave sp.*, P muestras de *A. lophanta*.

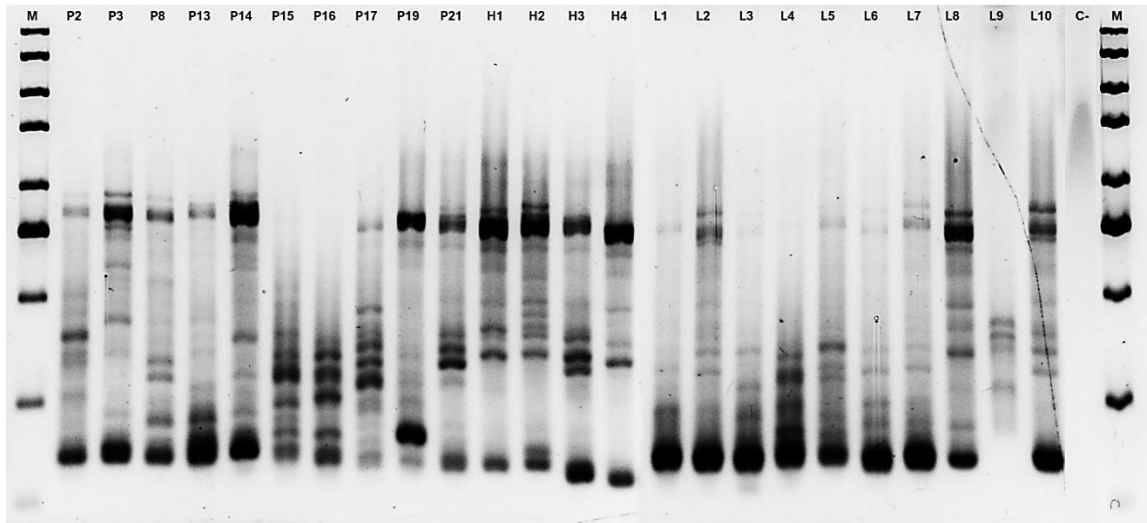


Figura 15. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR2 (GA)₈YC. M marcador molecular, L muestras de *A. lechuguilla*, H muestras de *Agave sp*, P muestras de *A. lophanta*.

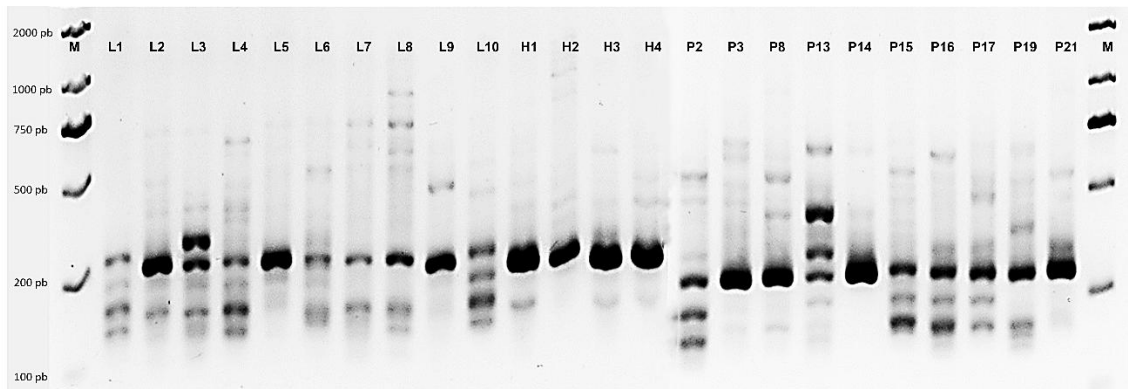


Figura 16. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR3 (AG)₈YC. M marcador molecular, L muestras de *A. lechuguilla*, H muestras de *Agave sp*, P muestras de *A. lophanta*.

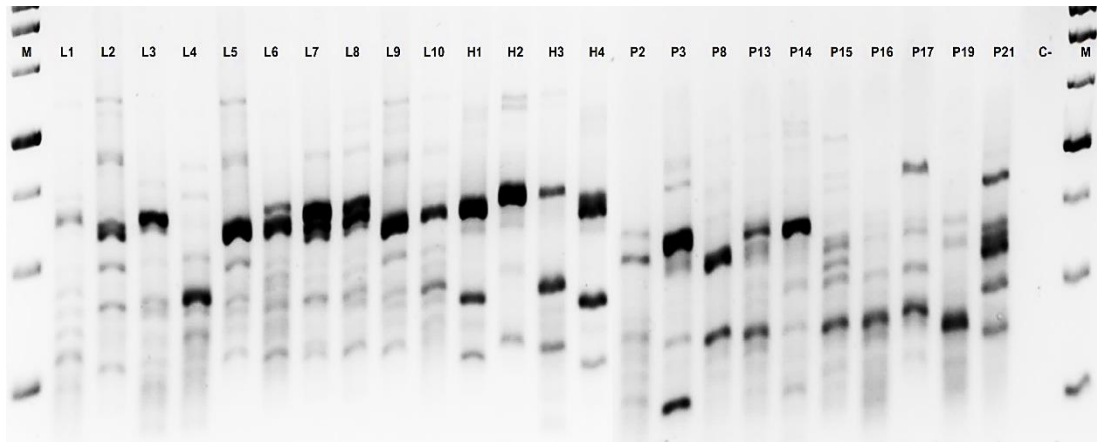


Figura 17. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR5 (GA)₈YG. M marcador molecular, L muestras de *A. lechuguilla*, H muestras de *Agave sp*, P muestras de *A. lophanta*.

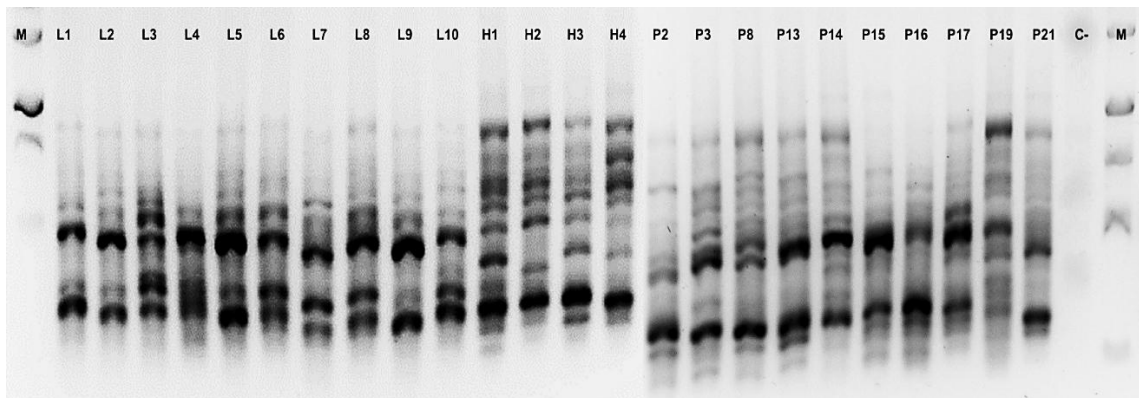


Figura 18. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR5 G(AG)₇AC. M marcador molecular, L muestras de *A. lechuguilla*, H muestras de *Agave sp*, P muestras de *A. lophanta*.

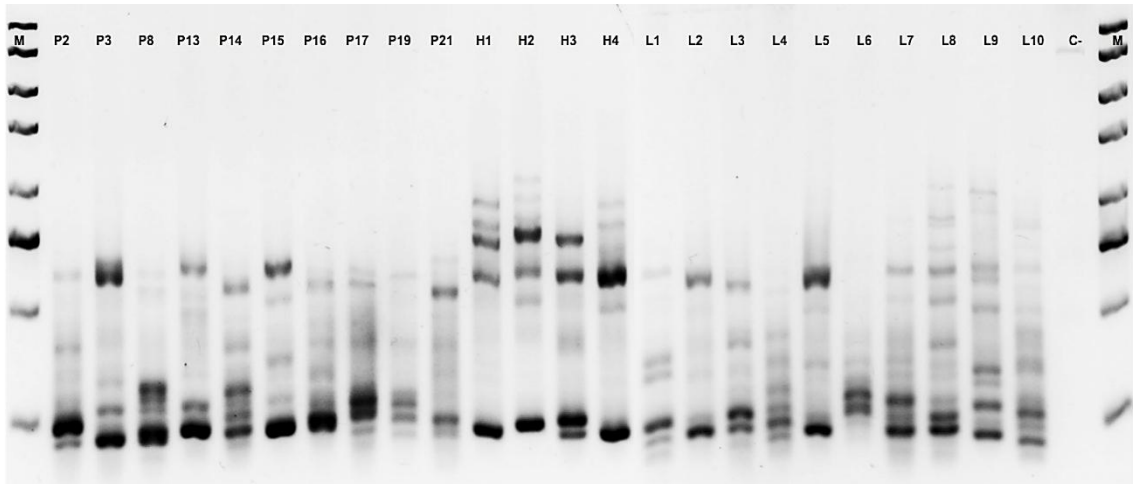


Figura 19. Patrón de bandeo ISSR-PCR de cebador PR6 (GACA)₃YR. M marcador molecular, L muestras de *A. lechuguilla*, H muestras de *Agave sp*, P muestras de *A. lophanta*.

6.4 Índices de diversidad genética

Se calculó el índice de diversidad genética de cada uno de los cebadores utilizados en este estudio, los cuales se muestran en el Tabla 5.

Tabla 5. Índices de diversidad genética de los seis cebadores utilizados.

Índice	Cebadores					
	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR6
H	0.443	0.487	0.400	0.475	0.484	0.441
PIC	0.345	0.368	0.320	0.362	0.367	0.344
D	0.890	0.825	0.924	0.849	0.832	0.893
R	12.960	10.640	10.640	11.840	8.400	11.083
N	24	17	20	22	20	22

H: heterocigosis, valor PIC: contenido de información polimórfica, D: poder discriminatorio del cebador, R: poder de resolución, N: número de loci.

6.5 Análisis de la varianza molecular

Tabla 6. Análisis de varianza molecular

Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Varianza estimada	% de Varianza
Entre poblaciones	2	1.458	0.729	0.035	7%
Dentro de las poblaciones	21	9.750	0.464	0.464	93%
Total	23	11.208		0.500	100%

Stat	Value	P(rand >= data)
Φ_{PT}	0.071	0.007

El análisis de varianza molecular (AMOVA) evidenció una clara estructuración en la diversidad genética de las poblaciones estudiadas. Los resultados mostraron que la mayor parte de la variación genética total (93 %) se atribuye a diferencias dentro de las poblaciones (varianza estimada = 0,464), mientras que solo un 7 % de la variación se explica por diferencias entre poblaciones (varianza estimada = 0,035).

El estadístico de diferenciación Φ_{PT} (análogo a F_{ST}) registró un valor de 0,071, lo que indica un nivel de diferenciación genética moderado-bajo, aunque estadísticamente significativo ($p = 0,007$). Esto confirma que la estructura genética observada entre poblaciones no es atribuible al azar.

En conclusión, aunque las poblaciones comparten una elevada proporción de diversidad intrapoblacional, presentan una diferenciación genética leve pero significativa, lo que refleja cierta estructuración espacial en la variación genética.

6.6 Análisis de coordenadas principales (PCoA)

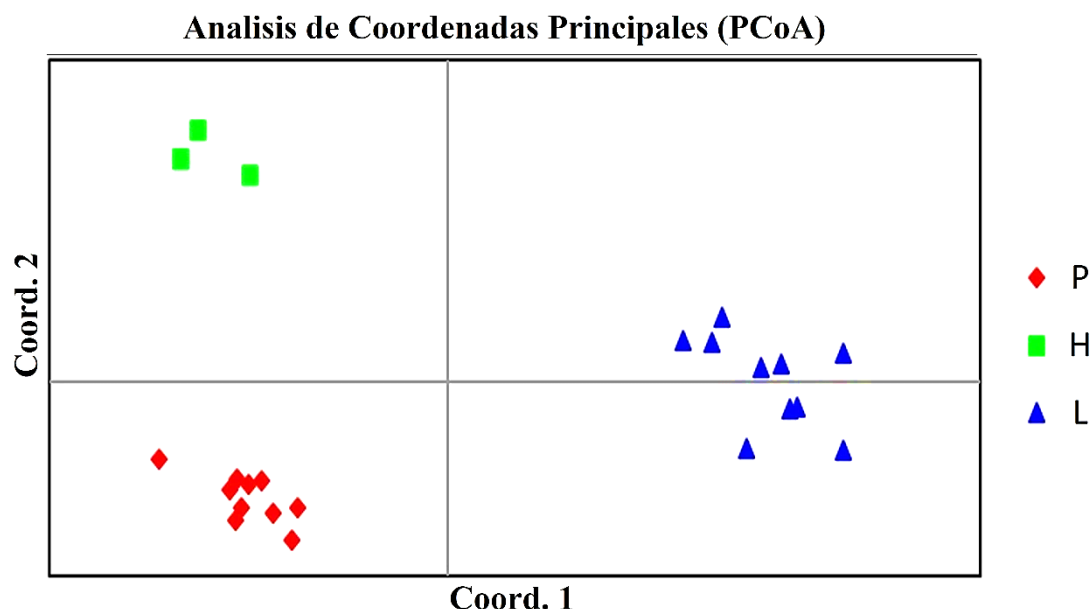


Figura 20. PCoA derivado de una matriz binaria. (*Agave lechuguilla*: azul, *A. lophantha*: rojo y *A. lechuguilla* X *lophantha*: verde)

El análisis de coordenadas principales (PCoA) realizado a partir de una matriz binaria de presencia/ausencia de marcadores ISSR revela la estructuración genética de las poblaciones analizadas. Los dos primeros ejes del PCoA capturan colectivamente el 61.84% de la variación genética total, representando una proporción sustancial de la diversidad genética presente en el conjunto de datos.

El Eje 1 explica el 32.40% de la variación, constituyéndose como el principal componente de diferenciación genética entre las poblaciones. El Eje 2 captura un 29.44% adicional de la variación, complementando la representación de los patrones de diversidad. La contribución del Eje 3, aunque notable (8.04%), es considerablemente menor, elevando la variación acumulada explicada a 69.88% para las tres primeras coordenadas.

La distribución espacial de los individuos en el plano bidimensional definido por los ejes 1 y 2 muestra una estructuración poblacional claramente definida, donde los ejemplares de cada población tienden a agruparse de forma coherente según su color asignado. Este patrón de agrupamiento, visualizado en un espacio que representa más del 60% de la variación total, confirma la existencia de una diferenciación genética significativa entre las poblaciones.

La alta proporción de varianza explicada por los dos primeros ejes valida la representatividad de la configuración espacial observada y corrobora los resultados previamente obtenidos en el análisis AMOVA, que indicaban una diferenciación genética significativa entre poblaciones ($\Phi_{PT} = 0.071$, $p = 0.007$).

En conclusión, el PCoA evidencia una clara separación de las poblaciones en el espacio multivariante, reflejando patrones consistentes de diversidad genética capturados eficientemente por los marcadores moleculares ISSR.

6.7 Dendrogramas obtenidos

En la Figura 19 se muestran los dendrogramas obtenidos a través de las matrices binarias producidas por los geles de ISSR-PCR de los seis cebadores.

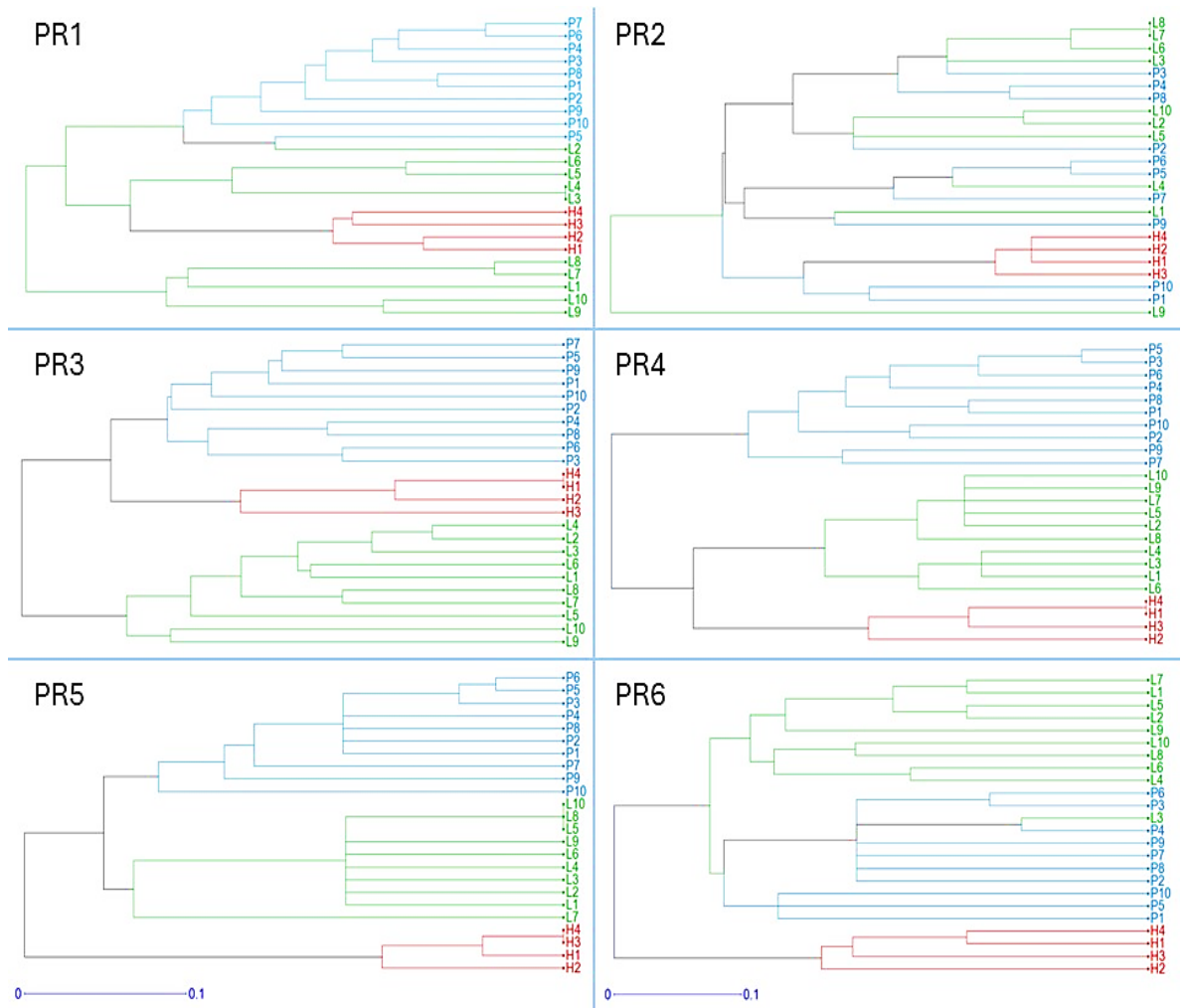


Figura 21. Dendrogramas resultantes de los patrones de bandeo originados con los seis cebadores. En verde (L) corresponden a muestras de *A. lechuguilla*, en azul (P) corresponden a muestras de *A. lophantha* y en rojo (H) corresponden a muestras de *A. lechuguilla* X *A. lophantha*.

VII DISCUSIÓN

El coeficiente Jaccard que se basa en la comparación de la presencia o ausencia de caracteres compartidos, es particularmente adecuado para datos binarios como los generados por marcadores moleculares dominantes (por ejemplo, AFLP, ISSR o RAPD). Este coeficiente proporciona una estimación confiable de la similitud genética entre pares de individuos (Mohammadi & Prasanna, 2003).

Aunque los marcadores ISSR son de tipo dominante y no permiten distinguir entre individuos homocigotos y heterocigotos, se estimó la heterocigosidad esperada (H) como una medida de diversidad genética. Este índice representa la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en la población sean diferentes. Su cálculo se realizó con base en la frecuencia de presencia de cada banda. Esta aproximación permite evaluar de manera indirecta la variabilidad genética en ausencia de información codominante, para este tipo de marcadores, los valores H pueden oscilar entre 0 y 0.5 (Bonin et al., 2007). En este estudio el mayor valor H lo obtuvo PR2 = 0.487 y el menor se obtuvo con PR3 = 0.400 (Tabla 5), manteniendo así un valor H promedio de 0.455, Este hallazgo sugiere que existe una considerable diversidad genética dentro del grupo muestreado, lo cual puede deberse a diferencias geográficas, ecológicas o a la historia evolutiva de los especímenes analizados. Además, confirma que los cebadores seleccionados son adecuados para estudios de caracterización genética en *Agave*.

El valor PIC *Polymorphic Information Content* (Contenido de Información Polimórfica), es una medida que indica cuán informativo es un marcador molecular para detectar variación genética entre individuos. Un PIC alto significa que el marcador es altamente polimórfico y, por lo tanto, muy útil para diferenciar entre genotipos mientras que un PIC bajo indica que el marcador es menos variable y ofrece poca información para distinguir entre muestras. Para marcadores dominantes (entre ellos los ISSR) el valor PIC máximo es 0.5 (Bornet & Branchard, 2001).

Los cebadores utilizados en este estudio mostraron valores PIC entre 0.320 (PR3) a 0.368 (PR2) (Tabla 5), manteniendo un promedio de 0.351 lo cual indica un nivel moderado de información de los cebadores ISSR utilizados. Este valor sugiere que los

cebadores empleados poseen una buena capacidad para detectar variabilidad genética entre las colectas analizadas, y es comparable con estudios previos en otras especies vegetales con ISSR donde muchos de ellos reportan valores promedio entre 0.30 y 0.45 (Anderson et al., 1993; Bornet & Branchard, 2001), por lo que nuestros cebadores se posicionan en un rango esperado y metodológicamente sólido.

El poder discriminatorio (D) refleja la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar presenten perfiles genéticos diferentes. Este índice de los marcadores ISSR se calculó como una medida de su capacidad para distinguir entre los genotipos analizados, los valores D cercanos al 1 indican un buen nivel de diferenciación entre las muestras evaluadas. Los cebadores utilizados en este estudio brindaron un valor D promedio de 0.868, siendo el PR2 = 0,825 el más bajo y el PR3 = 0.924 el que obtuvo el más alto, esto indica un alto nivel de capacidad de los marcadores ISSR para diferenciar entre los individuos analizados. Según Tessier et al. (1999), valores superiores a 0.80 reflejan un buen poder resolutivo del marcador, lo cual respalda la eficacia de los cebadores seleccionados en este estudio para detectar variabilidad genética en los especímenes de *Agave* analizados.

El valor de resolución (R) representa el poder de cada cebador para poder distinguir entre un número alto de genotipos. Nuestros valores R obtenidos para cinco de los seis cebadores ISSR utilizados en este estudio fueron superiores a 10, lo que indica una alta capacidad de resolución genética; PR5 = 8.400 fue el menos y el mayor se obtuvo con PR1 = 12.960.

Este resultado refleja que los cebadores seleccionados generaron un número elevado de bandas polimórficas, distribuidas de manera equilibrada entre los individuos analizados. Pues, como mencionan Prevost & Wilkinson (1999), valores de R superiores a 5 son indicativos de cebadores altamente resolutivos; por lo tanto, los valores encontrados en este trabajo destacan la eficacia de los marcadores empleados para detectar variabilidad genética entre los especímenes de *Agave* analizados. Esto no solo valida la calidad de los cebadores seleccionados, sino que también respalda la robustez de los análisis posteriores, como el agrupamiento genético y la estimación de distancias.

En los dendrogramas generados (Figura 19) para cada cebador, se observa una agrupación consistente de las muestras parentales en dos clados principales: uno conformado por las accesiones de *A. lechuguilla* (en verde) y otro por las de *A. lophantha* (en azul). Esta separación clara entre ambos grupos confirma que los marcadores ISSR empleados poseen un adecuado poder discriminante para distinguir entre especies afines del mismo género, lo cual coincide con lo reportado previamente por otros autores en *Agave* y géneros relacionados (Vega-Ramos et al., 2022). Así mismo, en todos los dendrogramas generados se observó la formación de un clado monofilético entre las muestras de *A. sp* (*A. lechuguilla* X *lophantha*) (en rojo), las cuales al tener una morfología intermedia entre *A. lechuguilla* y *A. lophantha*, se consideran posibles híbridos.

Es notable que en los dendrogramas derivados de PR1 y PR4 las muestras de *A. lechuguilla* X *lophantha* están más relacionados a las muestras de *A. lechuguilla*, a diferencia del dendrograma derivado de PR3 las muestras de *A. lechuguilla* X *lophantha* se muestran más relacionados a *A. lophantha*. Está claro que estas muestras no se agrupan en un clado único, sino que aparecen en posiciones intermedias entre ambos parentales o con mayor proximidad a uno de ellos. Este patrón sugiere que los supuestos híbridos comparten alelos con ambos progenitores, lo cual es congruente con la idea de la existencia de flujo génico o hibridación natural entre *A. lechuguilla* y *A. lophantha*. Sin embargo, en los dendrogramas derivados de PR5 y PR6, las muestras de *A. lechuguilla* X *lophantha* aparecen formando un clado independiente de las otras dos especies, lo cual no apoya la idea de que sean híbridos, o bien, este patrón podría deberse a una diferenciación genética derivada de un proceso de hibridación antigua y posterior estabilización, fenómeno descrito en estudios clásicos de hibridación (Arnold, 1997) o bien, a que dichas muestras correspondan a una población localmente diferenciada, más que a híbridos recientes.

El AMOVA refuerza esta interpretación, al mostrar que solo el 7 % de la variación genética se distribuye entre los tres grupos analizados, mientras que el 93 % ocurre dentro de los grupos. El valor $\Phi_{PT} = 0.071$ ($p = 0.007$) indica diferenciación baja pero estadísticamente significativa entre las poblaciones (varianza estimada de 0.035).

La gráfica PCoA evidencia que, a pesar de la diferenciación baja-moderada pero significativa mostrada por el AMOVA existen agrupamientos compactos y bien delimitados, sugiriendo que cada grupo analizado posee identidad genética propia.

Se observa una posición separada por parte de los presuntos híbridos (H), formando un solo clúster que no se ubica de forma intermedia entre *A. lechuguilla* y *A. lophanta* descartando así un patrón típico de hibridación, que, según (García, 2007) los híbridos recientes tienden a formar grupos intermedios de los parentales. Quedando así dos posibles alternativas para estas accesiones, la primera es que representan una población estabilizada; híbridos antiguos con recombinación y propia fijación de combinaciones alélicas, o, la segunda es que esta accesión ya constituye una población propia localmente diferenciada con una historia evolutiva independiente de los supuestos progenitores, los dendrogramas generados por PR5 y PR6 apoyan fuertemente esta idea sobre la existencia de una identidad genética diferenciada formando un clado independiente.

A. lophanta y *A. lechuguilla* son entidades genéticamente reconocibles y los individuos “presuntos híbridos” forman un grupo genético distinto, sin embargo, por la naturaleza dominante de los marcadores utilizados y el valor moderado de Φ_{PT} , estas ideas sobre el posible origen de los H requieren un análisis aún más profundo con técnicas de mayor resolución.

En conjunto, todos los análisis convergen en la misma interpretación: las dos especies parentales están diferenciadas genéticamente, aunque no de manera profunda, los presuntos híbridos constituyen un clúster genético separado a pesar de mostrar patrones de hibridación en algunos dendrogramas, y, que el patrón de agrupamiento de estos individuos sugiere que se trata de una población híbrida estabilizada o con aislamiento reproductivo más que a hibridación reciente.

La separación parcial y el comportamiento intermedio de los presuntos híbridos refuerzan la efectividad de los marcadores ISSR para detectar relaciones genéticas interespecíficas dentro del género *Agave*. La variabilidad observada entre cebadores puede atribuirse a diferencias en la resolución de los loci amplificados y en el poder discriminante de cada marcador ISSR. Considerando la naturaleza dominante de los ISSR

y la evidencia inconsistente entre los cebadores, los resultados obtenidos deben interpretarse con cautela. Se recomienda y justifica complementar estos análisis mediante métodos multivariados e incluir otras especies cercanas, lo cual aunado a la determinación de los códigos de barras de ADN (matK, ITS2 y rbcL principalmente) podría ayudar a determinar si se trata de un híbrido, especie o ecotipo nuevo.

VIII CONCLUSIONES

El ADN extraído mediante el método CTAB, junto con los cebadores mostraron buenos patrones de bandas en los geles electroforéticos. Los marcadores moleculares utilizados en este estudio fueron del tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), los cuales se consideran dominantes. En consecuencia, los datos obtenidos a través de los geles ISSR-PCR fueron binarios (presencia = 1, ausencia = 0)

Con estos datos binarios se evaluaron los índices de eficiencia de los cebadores utilizados, obteniendo muy buenos resultados para ellos, siendo así cebadores sólidos y confiables para este estudio y para la información generada, esta información se utilizó para construir matrices de similitud y generar agrupamientos mediante el método UPGMA, así como para determinar mediante un AMOVA los componentes de varianza y sus niveles de significancia asociados a la variación genética que existe entre individuos dentro y entre las poblaciones analizadas.

El análisis de agrupamiento basado en marcadores ISSR permitió evaluar las relaciones genéticas entre las 24 muestras analizadas, correspondientes a *Agave lechuguilla*, *A. lophanta* y un grupo de individuos con morfología intermedia que se presumen híbridos naturales. Se utilizaron seis cebadores (PR1–PR6) previamente reportados como polimórficos y útiles en especies del género *Agave* (Ángeles-Espino et al., 2020; Vega-Ramos et al., 2022).

Se demostró la utilidad de los marcadores ISSR para la detección de relaciones genéticas interespecíficas dentro del género *Agave*, el análisis combinado de ISSR-PCR mediante dendrogramas, AMOVA y PCoA permitió evaluar con mayor solidez las relaciones genéticas entre *Agave lechuguilla*, *A. lophanta* y el conjunto de individuos morfológicamente identificados como posibles híbridos naturales. Futuras investigaciones podrían complementar este análisis mediante técnicas de mayor resolución para confirmar o descartar la naturaleza híbrida, y de ser así, determinar la dirección del flujo génico entre las especies estudiadas.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Khalik, S. M., Miyase, T., Melek, F. R., El-Shabraway, O. A., Mahmoud, I. I., & Mina, S. A. (2002). New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation. *Die Pharmazie*, 57(8), 562–566.
- Alberto-Hurrell, J., & Delucchi, G. (2012). *Aportes botánicos Fam. Asparagaceae*. www.mobot.org/MOBOT/research/APweb
- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología Molecular*, 18(1), 541–566.
- Alcocer, J. L. L., Herrera, J. C. C., & Alberto, J. N. (2018). Magueyes silvestres de Yucatán. *Ecofronteras*, 31–33.
- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>
- Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7(10).
- Anderson, G. J. A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D., & Sorrells, M. E. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36(1), 181–186.
- Ángeles-Espino, A., Dimas-Estrada, H. E., Ramírez-Alvarado, D., Cruz-Rubio, J. M., Palmeros-Suárez, P. A., & Gómez-Leyva, J. F. (2020). Caracterización molecular de mutantes de *Agave tequilana* inducidas con radiación gamma Co60 y su efecto en la acumulación de fructooligosacáridos. *Acta Universitaria*, 30.
- Arnold, M. L. (1997). *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press.
- Barrientos Rivera, G., Esparza Ibarra, E. L., Segura Pacheco, H. R., Talavera Mendoza, Ó., Sampedro Rosas, M. L., & Hernández Castro, E. (2019). Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 655–668.

- Beutelspacher Baigts, C. R. (2017). *Primer registro de Agave lophantha Schiede (Asparagaceae), para Chiapas, México.*
- Bisht, V., Rawat, J. M., Gaira, K. S., Purohit, S., Anand, J., Sinha, S., Mitra, D., Ataya, F. S., Elgazzar, A. M., El-Saber Batiha, G., & Rawat, B. (2024). Assessment of genetic homogeneity of in-vitro propagated apple root stock MM 104 using ISSR and SCoT primers. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04939-3>
- Bonin, A., Ehrich, D., & Manel, S. (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, 16(18), 3737–3758.
- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 209–215.
- Britannica, T. E. of E. (2023, November). *Agavoideae*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/Agavoideae>
- Bueno, A. M., Luis, J., Hernández, P., Melesio, R. P., & Meza, P. G. (2018). *Diversidad genética de maguey (Agave spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato.*
- Cabral-Cordero, I. (2009). *Evaluación de diversidad, distribución e importancia económica de la familia Agavaceae en el Noreste de México.*
- Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D., & Ríos-González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(42), 100–122.
- Castillo Quiroz, D., Berlanga Reyes, C. A., Pando Moreno, M., & Cano Pineda, A. (2020). Regeneración del cogollo de Agave lechuguilla Torr. de cinco procedencias bajo cultivo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 33(103), 27–40. <https://cienciasforestales.inifap.gob.mx/index.php/forestales/article/view/739>

- Chase, M. W., Reveal, J. L., & Fay, M. F. (2009). *A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae*.
- Cotsapas, C., Mitrovic, M., & Hafler, D. (2018). Multiple sclerosis. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 148, pp. 723–730). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6>
- Delgado, E., & Neyra, C. D. (2019). Frecuencias alélicas de 21 marcadores STR autosómicos en una población mestiza peruana aplicado a la práctica forense. *Revista Española de Medicina Legal*, 45(3), 92–97.
- Eguiarte, L. E., Jiménez Barrón, O. A., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., Gámez, N., Gasca-Pineda, J., Castellanos-Morales, G., Moreno-Letelier, A., & Souza, V. (2021). Evolutionary ecology of Agave: distribution patterns, phylogeny, and coevolution (an homage to Howard S. Gentry). *American Journal of Botany*, 108(2), 216–235.
- Eguiarte, L., Leebens-Mack, J., & Heyduk, K. (2021). Editorial: Recent Advances and Future Perspectives for Agavoideae Research: Agave, Yucca and Related Taxa. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.687596>
- Eloy, R., Camacho, S., Corresponsables, : M, En, C., Ramiro, R., Gómez, M., María, M., Ayala, H., En, M., Héctor, C., Casas, S., Miguel, C., Lugo, R., & Luz López Martínez, Q. M. (n.d.). *Sistemática filogenética, biogeografía y relación suelo-planta de Yucca*.
- El-Sayed, M. M., Abdel-Hadi, M., & El-Nahas, H. A. (1991). Molluscicidal activity and clinico-pathological effect of Agave lophantha. *Archives of Pharmacal Research*, 14, 81–86.
- Esparza Ibarra, E. L., Violante González, J., Monks, S., Cadena Iñiguez, J., Araujo Andrade, C., & Rössel Kipping, E. D. (2015). *Los agaves mezcaleros del altiplano Potosino y Zacatecano*.

- Fernández-Galindo, M. A., Moreno-Ortiz, J. M., Contreras-Gutiérrez, J. A., Martínez-Félix, J. I., Guerrero-Valdez, M., & Beltrán-Ontiveros, S. A. (2022). Microsatellites instability as a biological marker for the administration of Pembrolizumab. *Revista Médica de La Universidad Autónoma de Sinaloa REVMEDUAS*, 12(2), 135–142.
- García, M. A. (2007). Los Agaves de México. In *Revista Ciencia* (Vol. 87, pp. 14–23).
- García-Mendoza, A., & Galván-V, R. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Botanical Sciences*, 56, 7–24.
- García-Mendoza, A. J. (2018). Lechuguilla: Agave lechuguilla. In *Infografía*.
- Garro-Monge, G., Jiménez-Quesada, K., & Alvarenga-Venutolo, S. (2014). Caracterización genética molecular de materiales procesados de Stevia rebaudiana utilizando la técnica de microsatélites. *Revista Tecnología En Marcha*, 27(3), ág-32.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*.
- Gentry, H. S. (2004). *Agaves of continental north America*. University of Arizona Press.
- Gill-Langarica, & Mayek-Pérez. (2008). *Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (Phaseolus vulgaris L.): Aplicaciones y Perspectivas*.
- Giraldo-Cañas, D. (2020). A new species of Agave (Asparagaceae: Agavoideae) from Colombia. In *Revista Mexicana de Biodiversidad* (Vol. 91, Issue 1). Universidad Nacional Autónoma de México. <https://doi.org/10.22201/IB.20078706E.2020.91.3274>
- González, A. (2008). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Resultados preliminares. *Trabajo de Investigación Para Culminar El Programa de Doctorado. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*. [Http://Acceda. Ulpgc. Es/Bitstream/10553/1941/1/3211. Pdf](http://Acceda.Ulpgc.Es/Bitstream/10553/1941/1/3211.Pdf).

- González, D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Scientia Fungorum*, *14*, 1–21.
- Guillot Ortiz, D., & Van Der Meer, P. (2003). Las familias Agavaceae y Aloaceae en la comunidad valenciana. In *Flora Montiberica* (Vol. 23).
- Heyduk, K., McAssey, E. V., Field, R., & Leebens-Mack, J. (2023). The Agavoideae: an emergent model clade for CAM evolutionary biology. In *Annals of Botany* (Vol. 132, Issue 4, pp. 727–737). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcad062>
- 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.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Lemus-Díaz, P. G., Belmonte-Izquierdo, Y., & Carlos González-Hernández, J. (2024). *La importancia del metabolismo CAM en la familia Agavaceae*.
- Li, W., Wang, B., & Wang, J. (2006). Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany*, *84*(2), 176–180.
- López-Serrano, P., Hernández-Ramos, A., Méndez-González, J., Martínez, M., Aguirre, O., Vargas, B., & Corral-Rivas, J. (2021). *Mejores prácticas de manejo y ecuaciones alométricas de biomasa de Agave lechuguilla*.
- Marwal, A., & Gaur, R. K. (2020). Molecular markers: tool for genetic analysis. In *Animal biotechnology* (pp. 353–372). Elsevier.
- McNeill, J., Wiersema, J., Smith, G. F., Starr, G., & Thiede, J. (2018). Request for a binding decision on the descriptive statement associated with *Agave lophantha* (Asparagaceae/Agavaceae). *Taxon*, *67*(3), 655.

- Medrano-Hernández, J. M., Rodríguez de la O, J. L., Reyes-Trejo, B., & Peña-Ortega, M. G. (2017). Molecular characterization using ISSR primers of *Magnolia mexicana* DC. from two regions in Zongolica, Veracruz, Mexico. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 23(3), 427–436.
- Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235–1248.
- Muñoz, J. J. (2005). *Manual de marcadores moleculares (RAPD, isoenzimas y proteínas) para el estudio de Prosopis y especies forestales afines*.
- Narcia Velasco, M., Castillo Quiroz, D., Vázquez Ramos, J. A., & Berlanga Reyes, C. A. (2012). Turno técnico de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en el noreste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(9), 81–88.
- Nobel, P. S., & Quero, E. (1986). Environmental productivity indices for a Chihuahuan desert CAM plant, *Agave lechuguilla*. *Ecology*, 67(1), 1–11.
- Ortiz-Brunel, J. P., Munguía-Lino, G., Castro-Castro, A., & Rodríguez, A. (2021). Análisis biogeográfico del género americano *Echeandia* (Agavoideae: Asparagaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 92, e923739.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9–17.
- Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 107–112.
- Queiroz, S. R. de O. D., do Nascimento, M. N., & dos Santos Carneiro, F. (2015). *Genetic variability in populations of Agave sisalana Perrine detected by inter simple sequence repeats*.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Peña-Valdivia, C. B. (2000). Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. *Botanical Sciences*, 67, 75–88.

- Ríos, E., Ruiz, H. M., & Castañeda, S. T. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la Zoología. *Obtenido de Http://Www. Revistaciencia. Amc. Edu. Mx/Images/Revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-Moleculares. Pdf.*
- Rocha, M., Good-Ávila, S. V, Molina-Freaner, F., Arita, H. T., Castillo, A., García-Mendoza, A., Silva-Montellano, A., Gaut, B. S., Souza, V., & Eguiarte, L. E. (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.
- Romo, A., & Morrone, J. J. (2012). Especies mexicanas de Curculionidae (Insecta: Coleoptera) asociadas con agaves (Asparagaceae: Agavoideae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(4), 1025–1035. <https://doi.org/10.7550/rmb.30633>
- Rosales, M. S. D., Jiménez, M. de la L. G., Gómez, C. R., Valles, C. Q., de León, S. D. D., Ordaz, S. J. M., & Balch, E. P. M. (2008). El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16(41), 53–62.
- Sankar, A. A., & Moore, G. A. (2001). Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 206–214.
- Scheinvar G. (2018). *Filogeografía de Agave lechuguilla y patrones de distribución de Agave en México.*
- Smouse, P. E., & Peakall, R. O. D. (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82(5), 561–573.
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J.-M., & Charrier, A. (1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 171–177.
- Thiede, J., & Eggli, U. (2020). Agavaceae. *Monocotyledons*, 9–19.
- Thiede, J., Smith, G. F., Figueiredo, E., & Starr, G. D. (2021). The taxonomy of *Agave lophantha* Schiede (1829) and *A. univittata* Haw.(1831)(Asparagaceae subfam.

- Agavoideae/Agavaceae) and the typification of both names. *Haseltonia*, 27(1), 14–20.
- Ulises, O., Burciaga, M., Castillo Quiroz, D., Arreola, O. M., & Burciaga, M. (2011). *Caracterización y selección de sitios para plantaciones de lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.) en el estado de Coahuila*.
- University of Florida. (n.d.). *Agave lophantha*. Gardening Solutions. Retrieved February 1, 2025, from https://gardeningsolutions-ifas-ufl.edu.translate.google.com/plants/ornamentals/agave-lophantha/?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=es&_x_tr_hl=es&_x_tr_pto=tc
- Van Der Meer, P., & Puche, C. (2014). *Agave univittata* var. *ensifera* (Jacobi). *Bouteloua*, 19: 58-64.
- Vega-Ramos, K. L., Gutierrez-Coronado, M. A., & Gómez-Leyva, J. F. (2022). Marcadores moleculares issr para identificación de hijuelos de agaves. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 45(1), 75–81.
- Verhoek, S. (1998). Agavaceae. In K. Kubitzki (Ed.), *Flowering Plants · Monocotyledons: Liliaceae (except Orchidaceae)* (pp. 60–70). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_8
- Verhoek, S., & William, J. H. (2003). *Agavaceae in Flora of North America*. Agave or Century Plant Family.
- Viveros Shangai. (n.d.). *La planta Agave lophantha Schiede*. Retrieved February 11, 2025, from <https://www.viverosshangai.es/La-planta-Agave-lophantha-Schiede>
- Walker, C. (2019). *Agave lophantha*. *New Zealand Cactus & Succulent Journal*, 72(2), 15–17.
- Wolfe, A. D., & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing* (pp. 43–86). Springer.

Wong Chia. (2009). *Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) de la UNAS-Tingo María.*

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183.