

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Código de barras de la vida y análisis filogenético en *Dasyilirion cedrosanum* y *D. berlandieri* con base en secuencias de DNA citoplasmático

Por:

MARÍA DE JESÚS JÁUREGUI GONZÁLEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México.
Agosto 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Código de barras de la vida y análisis filogenético en *Dasyliirion cedrosanum* y
D. berlandieri con base en secuencias de DNA citoplasmático

Por:

MARÍA DE JESÚS JÁUREGUI GONZÁLEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

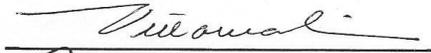
Aprobada:



Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés
Asesor Principal



Dra. Francisca Ramírez Godina
Coasesor



Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de la División de Agronomía
Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México
Agosto 2015

DEDICATORIA

A mis padres: María González y Jesús Jáuregui por ser las personas que me dieron la vida, por apoyarme siempre en todo momento, por su fe y paciencia, por sus desvelos y sacrificios. Porque pesar de la distancia siempre han estado ahí, luchando conmigo. Gracias por apoyarme en mi decisión de estudiar esta carrera y por creer que era capaz de hacerlo. Gracias por enseñarme a luchar y sobre todo ser mi orgullo y ejemplo de vida.

A mis abuelitos Carmen Ledesma y Santos González por su apoyo y sabios consejos, pero sobre todo por todo el amor y cariño que siempre me han brindado. Gracias por sus palabras de aliento y las bonitas platicas que he tenido con ustedes desde niña.

A mi tío: Santos González, por ser la persona que me inspiro a estudiar esta noble y digna profesión, por ser un ejemplo en mi vida profesional, por sus consejos y apoyo durante el estudio de mi carrera y ahora en esta etapa de mi vida.

A mi hermanita: Esmeralda Muñoz González por su apoyo incondicional, por sus regaños y consejos, por ser mi mejor amiga, por acompañarme en mis logros y caídas y contribuir en la culminación de esta etapa final en mi carrera, gracias por darme ánimos. Gracias por ayudarme ver consumado este sueño, no lo habría

logrado sin tu ayuda.

A Libnin Díaz por creer en mis capacidades y recordármelo todo el tiempo, por alentarme a seguir adelante y no darme por vencida, por tus consejos, cariño y recordarme que todo sueño con esfuerzo se cumple. Gracias por estar ahí siempre. Gracias por todos estos años de amistad.

AGRADECIMIENTOS

A Hashem

Porque sin ti nada habría sido posible, por estar siempre a mi lado y guiarme en mi camino, por no apartarte de mí en los momentos difíciles, por poner retos en mi camino y ayudarme a crecer; por los seres maravillosos que están a mi lado. Gracias por tu amor, palabra y bendición que nunca me faltan.

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

Por su labor como mi Asesor principal, al asesorarme en la correcta redacción de este mi trabajo de tesis; por darme su voto de confianza y la oportunidad de entrar a sus clases, por permitirme formar parte de su equipo al invitarme a trabajar en este interesante proyecto. Gracias por su paciencia y guía en el manejo de los softwares que fueron necesarios para la realización de este trabajo. Gracias por aportarme los nuevos conocimientos y herramientas que serán el legado para mi nueva vida como profesional.

Dra. Francisca Ramírez Godina

Por su colaboración y disposición en formar parte de mi grupo de asesores, por su apoyo en la revisión y corrección de este trabajo.

Dr. José Angel Villarreal Quintanilla

Por su disposición en formar parte del comité de asesores, por su colaboración en la revisión de esta tesis y brindarnos sus conocimientos para la identificación taxonómica de las especies utilizadas en la presente investigación.

L.C.Q. Dulce Victoria Mendoza Rodríguez

Por capacitarme en el manejo de técnicas moleculares y enseñare los procesos básicos y funcionamiento de aparatos en el laboratorio. Por su orientación en la parte técnica de la metodología empleada y colaboración en la realización de ella. Por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo, por sus consejos y amistad.

Al trabajador de campo, el **Sr. Miguel Ángel Rodríguez Armendáriz**, por su apoyo en el trabajo de campo para la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser mi casa de estudio durante casi cinco años **y a mis maestros** por los conocimientos que me brindaron.

Al Biólogo Fernando Hernández Godínez por capacitarme en la Técnica de código de Barras de la Vida, parte fundamental para la realización de esta tesis, durante mi estancia en LANGEBIO, CINVESTAV Irapuato.

Dr. Octavo Martínez de la Vega por abrirme las puertas de su laboratorio en LANGEBIO, CINVESTAV Irapuato.

El presente trabajo está auspiciado por el **CONACYT**, a través del proyecto “Análisis comparativo de caracteres genéticos y fisiológicos hipotéticamente relacionados con la determinación sexual en sotol (*Dasyllirion cedrosanum*)”, clave CB 154682.

Parte de mi estancia en la UAAAN para la realización de este trabajo fue gracias a la beca otorgada por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** a través del proyecto de ciencia Básica clave 154682.

A mis amigos y compañeros:

Eduardo Hernández, Sara Jiménez, Verónica Robles, Emir Roblero, Juan Bonilla, Eduardo Martínez, Oscar Morales, Icela Hernández, Arturo Ponciano, Eri Udiel, Dulce Rojas, Alonso Constantino, Alejandro Arredondo, Teodoro Jacobo, Edgar Olivar, Abigail González, Jesús Hernández, Adolfo Hernández, Víctor Bañuelos, Leticia Ruiz, Jaime Gutiérrez, Grisel Vergara, Rodolfo Rodríguez, Antonio Vela, Luis Castañeda, Enrique Guevara, Riquelme Míncez, Gerardo Ramírez, Manuel Treviño, Antonio Ramírez y Marco Aurelio Puente. Gracias por los momentos compartidos durante estos casi cinco años, los recuerdos de las cosas que vivimos estarán guardados siempre en mi corazón, así como cada uno de ustedes.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	13
I.INTRODUCCIÓN.....	15
Hipótesis.....	17
OBJETIVOS.....	17
II.REVISIÓN DE LITERATURA.....	19
Importancia Ecológica del sotol.....	19
Importancia económica.....	19
Distribución del género <i>Dasyilirion</i>	20
<i>Dasyilirion wheeleri</i>	21
<i>Dasyilirion serratifolium</i>	24
<i>Dasyilirion cedrosanum</i>	26
<i>Dasyilirion berlandieri</i>	28
Métodos para la identificación de especies.....	31
Técnica de código de barras de la vida.....	33
Aplicaciones del código de barras de la vida.....	35
Estudios realizados mediante la técnica de código de barras en <i>Dasyilirion</i>	35
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Localidades de estudio.....	37
Material biológico.....	38
Recolección de muestras en campo.....	44
Aislamiento de DNA.....	45
Análisis de calidad del DNA en gel de agarosa.....	46
Determinación de la calidad del DNA en espectrofotómetro.....	47
Iniciadores de secuencias de los genes <i>rbcL</i> y <i>matK</i>	47
Cuantificación del DNA en espectrofotómetro NanoDrop 1000.....	48
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	49
Programa del termociclador Palm-Cycler para PCR de cada gen.....	51
Técnica de electroforesis.....	52
Secuenciación de muestras.....	53
Depuración de las secuencias.....	53
Blast entre F y R.....	54
Corte de extremos de baja calidad.....	55
Traducción para descartar fallas en secuenciación.....	56
Agrupamiento de secuencias por marcador.....	56
Alineación con Clustal.....	56
Análisis filogenético.....	57
Obtención de secuencias consenso.....	57
Generación de dendrogramas.....	58
Generación de códigos de barras.....	58

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
Calidad de DNA.....	59
Amplificación de fragmentos de <i>rbcL</i> y <i>maK</i>	62
Alineaciones y distancias genéticas.....	66
Visualización de códigos de barras.....	84
V.CONCLUSIONES.....	86
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Lista de plantas del género <i>Dasyvirion</i> usadas en el estudio y su localización.....	39
Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de las secuencias.....	48
Cuadro 3. Preparación del coctel para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	50
Cuadro 4. Programa del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	51
Cuadro 5. Parámetros de calidad de DNA.....	60
Cuadro 6. Número de sustituciones de nucleótidos entre especies de <i>Dasyvirion</i> con el marcador <i>rbcL</i>	67
Cuadro 7. Número de sustituciones de nucleótidos entre especies de <i>Dasyvirion</i> con el marcador <i>matK</i>	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutos de <i>Dasyllirion wheeleri</i> S. Watson - sotol común, (Foto: Steve Hurst, USDA-NRCS PLANTS Database).....	23
Figura 2. <i>D. wheeleri</i> en el jardín de reserva Springs en Las Vegas (foto: Stan Shebs; http://commons.wikimedia.org/).....	24
Figura 3. Detalle de las hojas de <i>D. cedrosanum</i> en jardines de la UAAAN, 2014. (Foto: H. Reyes).....	27
Figura 4. Planta de <i>D. cedrosanum</i> , con un escapo floral joven (foto: H. Reyes).....	28
Figura 5. Planta de <i>D. berlandieri</i> (Foto: H. Reyes).....	30
Figura 6. Detalle de los frutos de <i>D. berlandieri</i> (foto: H. Reyes).....	31
Figura 7. Área de distribución de las tres poblaciones donde se localizan las especies estudiadas.....	40
Figura 8. Cercanía geográfica entre localidades.....	41
Figura 9. Ubicación de la población de <i>D. berlandieri</i>	42
Figura 10. Ubicación de la población desconocida de <i>Dasyllirion</i>	43
Figura 11. Ubicación de la población de <i>D. cedrosanum</i>	44
Figura 12. Patrones electroforéticos para el iniciador <i>rbcL</i>	63
Figura 13. Patrones electroforéticos para el iniciador <i>matK</i>	64
Figura 14. Agrupamiento de plantas individuales con con el gen <i>rbcL</i> y el método de Neighbor-Joining (NJ) en <i>Dasyllirion</i>	70
Figura 15. Árbol filogenético para el gen <i>rbcL</i> a partir de secuencias consenso de <i>D. cedrosanum</i> , <i>D. berlandieri</i> y las secuencias de BOLD (<i>D. serratifolium</i> y <i>D. wheeleri</i>).....	72
Figura 16. Árbol filogenético para el gen <i>rbcL</i> a partir de secuencias consenso de <i>D. cedrosanum</i> , <i>D. berlandieri</i> y las secuencias de BOLD (<i>D. serratifolium</i> y <i>D. wheeleri</i>), incluyendo a UA2010-39.....	74
Figura 17. Árbol filogenético del gen <i>rbcL</i> a partir de secuencias consenso de BOLD, <i>D. cedrosanum</i> y <i>D. berlandieri</i> con la inclusión de <i>A. officinalis</i>	75
Figura 18. Dendrograma de secuencias <i>matK</i> de plantas individuales.....	77
Figura 19. Planta UA2010-39 introducida en Buenavista, Saltillo, Coah. (Foto: D. Mendoza).....	78
Figura 20. Dendrograma de plantas individuales de la región <i>matK</i> sin la planta UA2010-39.....	79
Figura 21. Árbol filogenético a partir de las secuencias consenso de la región <i>matK</i> para <i>D. berlandieri</i> , <i>D. cedrosanum</i> y las secuencias de BOLD con inclusión de UA2010-39.....	80
Figura 22. Árbol filogenético a partir de las secuencias consenso de la región <i>matK</i> para <i>D. berlandieri</i> , <i>D. cedrosanum</i> y las secuencias de BOLD sin UA2010-39.....	81
Figura 23. Árbol filógenético con la inclusión de <i>Asparagus officinalis</i> para la región <i>matK</i>	82
Figura 24. Arbol filógenético con la inclusión de <i>Asparagus officinalis</i> para la combinación <i>rbcL</i> – <i>matK</i>	83

Figura 25. Representación gráfica del código de barras de la vida para *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* con el gen *matK*.....84

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la utilidad de dos regiones del cloroplasto (*rbcL* y *matK*) propuestas como código de identificación genética para la discriminación e identificación de las especies *Dasyllirion cedrosanum* y *D. berlandieri*. Se usó DNA de cinco plantas para cada una de las dos especies, así como de una población de especie desconocida de una localidad al Sureste de Coahuila. Por medio de PCR se llevó a cabo la amplificación de las regiones *rbcL* y *matK*, las cuales se secuenciaron y posteriormente se depuraron mediante la alineación de las secuencias derecha e izquierda, así como el análisis de los electroferogramas y la traducción de la secuencia. Mediante la ayuda de los paquetes *seqinr*, *ape* y *spider* del ambiente y lenguaje de cómputo estadístico R se obtuvieron secuencias consenso para cada especie y se realizaron los análisis filogenéticos necesarios, mientras que la depuración y análisis de secuencias se llevaron a cabo con los softwares *Clustalx* y *FinchTV*, todos de acceso libre. Los resultados obtenidos a partir de los análisis filogenéticos no mostraron variación intraespecífica para ninguna de las secuencias, y se logró discriminar entre las especies *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* a partir de la detección de siete sustituciones en 866 nucleótidos para el gen *matK*, y de la detección de una sustitución en 519 nucleótidos para el gen *rbcL*. Ambas especies se compararon con *D. wheeleri* y *D. serratifolium*, que son las únicas reportadas en el sistema BOLD. Los análisis comparativos, mostraron una cercanía genética entre las

especies *D. wheeleri* y *D. serratifolium*, las cuales a su vez se alejan de *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*. El presente trabajo demuestra la utilidad de los genes citoplasmáticos *rbcL* y *matK*, para distinguir entre las especies del género *Dasyllirion*, especialmente *matK*.

Palabras clave: *Dasyllirion*, código de barras, *rbcL*, *matK*.

Correo electrónico: María de Jesús Jáuregui González,
maria.jauregui013@gmail.com

I. INTRODUCCIÓN

En las áreas desérticas del norte de México y hasta el suroeste de los Estados Unidos de América, se ubica una planta semejante en apariencia a los agaves y palmeras, perteneciente al género *Dasyliirion*, comúnmente denominada sotol. Se trata de una planta perenne, dióica, con numerosas hojas largas, lineares, flexibles y arrosetadas desde la base del tallo; presenta una tonalidad gris a verde pálido con espinas en los bordes; cuenta con un escapo o garrocha que puede llegar a medir hasta 4.5 m de altura, del cual se desprende una inflorescencia con flores pequeñas en panículas y se propaga por semilla. En México se cuenta con 16 especies distribuidas en las zonas áridas de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León y Zacatecas (Bogler, 1994).

El sotol es una planta resistente a la sequía y temperaturas extremas que, además de ser parte importante del ecosistema, desde tiempos prehispánicos fue utilizada como fuente de alimento, en ceremonias religiosas y como remedio medicinal de los antiguos pobladores indígenas del desierto. Actualmente sirve como alimento para animales en épocas de sequía y en la elaboración de una bebida alcohólica conocida como “sotol” la cual se prepara de su piña y tiene denominación de origen para los estados de Coahuila, Chihuahua y Durango. Sus hojas son

empleadas para la elaboración de cestería, mientras que el escapo es tallado y utilizado como bastón.

El género *Dasylíron* ha sido ubicado en diferentes familias botánicas y actualmente se le clasifica en la familia *Asparagaceae* y la subfamilia *Nolinaceae*. La denominación e identificación de especies es aún un tema complicado, debido a la gran variabilidad entre plantas de la misma especie, y en ocasiones resulta difícil ubicarlas con seguridad a través claves taxonómicas. La determinación de especies es de suma importancia por diversos aspectos, tales como la realización de estudios dirigidos a programas de mejoramiento genético para obtener materiales con características agronómicas deseables, así como en programas enfocados a conservación y estudios relacionados con la cultura y ecología de una región determinada.

El uso de marcadores moleculares para la identificación botánica; tales como el empleo de secuencias de DNA como código de barras para la identificación genética de especies (Hebert *et al.*, 2003a), es una herramienta de gran utilidad. Se basa en la amplificación y secuenciación de fragmentos particulares de material genético para tipificar e identificar una especie, aunque de él se cuenta con un fragmento de tejido, contribuyendo así de manera más rápida, eficaz y certera en la identificación taxonómica (CBOL Plant Working Group *et al.*, 2009). En el caso particular de plantas terrestres, las secuencias de los genes de cloroplastos *rbcL* y

matK han demostrado ser altamente eficientes para la identificación de especies.

Hipótesis

Es posible discriminar entre especies del género *Dasyvirion* mediante la utilización de las secuencias de DNA citoplasmático de los genes *rbcL* y *matK*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la utilidad de dos regiones del genoma del cloroplasto propuestas como código de identificación genética para la discriminación de las especies *Dasyvirion cedrosanum* y *D. berlandieri*.

Objetivos específicos

- Tipificar secuencias dentro de los genes *rbcL* y *matK* en especímenes del género *Dasyvirion* en tres localidades del Sureste de Coahuila, y oeste de Nuevo León.

- Obtener secuencias consenso para *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*.
- Evaluar el poder discriminatorio de las secuencias para diferenciar e identificar especies pertenecientes al género *Dasyilirion*.
- Generar árboles filogenéticos que ayuden a dilucidar la relación entre estas dos especies y las presentes del mismo género en el sistema BOLD.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia Ecológica del sotol.

El género *Dasyllirion* que pertenece a la familia de las Asparagáceas y forma parte importante de la biodiversidad de las zonas áridas y semiáridas, cuyo ambiente natural es el matorral desértico rosetófilo y el crasirosulifolio espinoso (Bogler, 1994), así como de los procesos edáficos e hidrológicos, además de servir de alimento para los animales silvestres (Cano y Burciaga, 2007).

Importancia económica.

En México el sotol representa una fuente importante de ingresos al ser empleado como forraje para animales en tiempo de sequía, materia prima para la confección de cestería, y en la elaboración de una bebida alcohólica llamada por el mismo nombre (“Sotol”), actividad que provoca la explotación más importante para esta planta en Chihuahua, Coahuila y Durango, que son los estados que gozan de la protección prevista en la Ley de la Propiedad Industrial a la Denominación de Origen

del Sotol, establecida por la NOM-005-RECNAT-1997, que define los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de vegetación forestal (Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual, 2002) . Las especies *D. cedrosanum*, *D. duranguense* y *D. wheeleri* son las de mayor importancia económica en el país para la producción de la bebida (Standley, 1922).

Distribución del género *Dasyliirion*

Se tienen reportadas cerca de 16 especies pertenecientes al género *Dasyliirion*, que se extienden sobre los terrenos áridos y montañosos de Arizona, Nevada, Nuevo México y Texas en los Estados Unidos de Norte América y dentro de la República Mexicana, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Veracruz (Bogler, 1994; 1998). Para el estado de Coahuila se reportan las especies *D. texanum*, *D. cedrosanum*, *D. leiophyllum* y *D. heterocanthum* (Henrickson y Johnston, 1986; Bogler, 1994), donde destaca *D. cedrosanum* por su abundancia (Villarreal, 2001).

Clasificación taxonómica del Género *Dasyilirion* (USDA, 2014, NCBI, 2015)

Dominio: *Eukaryota*
Reino: *Plantae*
Subreino: *Viridaeplantae*
División: *Streptophyta*
Subdivisión: *Embryophyta*
Filum: *Tracheophyta*
Subfilum: *Euphyllophyta*
Infrafilum: *Spermatophyta*
Clase: *Liliopsida*
Subclase: *Petrosaviidae*
Orden: *Asparagales*
Familia: *Asparagaceae*
Subfamilia: *Nolinoideae*
Género: *Dasyilirion*

Además de las plantas localizadas en el área de estudio (*D. cedrosanum* y *D. berlandieri*), se describen *D. wheeleri* y *D. serratifolium*.

Dasyilirion wheeleri

Son plantas robustas, con grandes coronas de 40 cm de diámetro y troncos de hasta 1.5 m de altura, por lo general reclinable. Hojas robustas y rígidas; de color verde blanquecino o azulado, 35-100 × 2-3 cm de ancho por encima de la base.

Densamente glauco - cerosa, papilosa, sin brillo; espinas todas dirigidas hacia adelante y hacia arriba. Inflorescencias menudo masivas, de hasta 5 m de longitud; tallos de 3-6 cm de diámetro en la base; ramas laterales de 3 a 10 cm y frutos pendientes; brácteas en forma de cuña, atenuados; fascículos de flores extendidos, de 10 a 20 cm de la base a la punta; ejes primarios de 4-14 cm. Flores con receptáculos de 0.2 a 0.5 mm; tépalos a veces teñidos de púrpura de 2.4 × 1 a 1.5 mm; estilo de 0.2-0.3 mm; frutos hinchado que llegan a ser de color marrón y dorado; estigma lobulado de 0.4 mm; pedúnculo del fruto de 3-3.5 mm. Cápsulas ampliamente obovadas o redondeadas en sección transversal de 5-8 × 4-5 mm; ala distal lobulada de 2-2.5 mm (Bogler, 1998) En las Figuras 1 y 2 se observan detalles de la las hojas y frutos de esta especie.

Se distribuye en los estados de Arizona, Nuevo México y Texas en Estados Unidos, mientras que en México la podemos encontrar en los estados de Chihuahua y Sonora a una altitud de 1200 a 1900 m (Bogler, 1994).



Figura 1. Frutos de *Dasyllirion wheeleri* S. Watson - sotol común, (Foto: Steve Hurst, USDA-NRCS PLANTS Database).



Figura 2. *D. wheeleri* en el jardín de reserva Springs en Las Vegas (foto: Stan Shebs; <http://commons.wikimedia.org/>)

Dasyliirion serratifolium

Plantas cortas o con troncos de 1-2 m, verticales o inclinados, a veces ramificados cerca de la base, densamente cubiertos por hojas viejas. Hojas arqueadas y curvadas, no es estrictamente amarillas; en forma de cuchilla de 45-75 (110) cm de largo, (1,2) 2-3,2 cm de ancho; superficie rugosa con papilas agudas, muy escabrosa, sin brillo, no cerosa; espinas de color amarillo-blanco, apuntando

hacia delante de 2-3 mm. Inflorescencias moderada de 2-4 m de altura, 2-3 (5) cm en la base, a menudo teñida de púrpura rojiza, acuminado hacia la punta; brácteas más o menos lisas y rectas; brácteas inferiores poco atenuadas, espinosas; brácteas medias acuminadas, brácteas superiores lanceoladas, aguda. Fascículos masculinos con 5-7 (10) ramas, eje central de 1-2 cm, ramas (3) 5-6 cm de largo. Flores estaminadas con tépalos de 2,4 mm de largo, 1,4 mm de ancho. Fascículos pistilados con 5-7 ramas, eje central de 0,5 cm, ramas de 5-77 cm de largo. Flores pistiladas en pedicelos cortos, frutos de 0.5-1 mm de largo; receptáculo 0.3-0.5 mm; tépalos 2.2 mm de largo, 1.5 mm de ancho, obovadas; estilo de 0,2-0,4 mm; estigma 1 mm, lóbulos unidos, tubular. Frutos obovados, 7-8 mm de largo, 4.5-.5.5 mm de ancho; ala lateral 1 mm; lóbulo hacia delante de 2.5-3 mm de largo; muesca 2 mm; estilo más estigma 1.4 a 1.8 mm. Las semillas individuales trigonoides de 2.5 mm de ancho y 3 mm de largo. (Bogler, 1994)

El período de floración se extiende de junio a julio. El fruto es una cápsula en forma de huevo que contiene una sola semilla. *D. serratifolium* está muy extendida en el sureño estado de Oaxaca en México, a altitudes de 1800 a 2350 metros (Rivera y Solano, 2012).

Dasyilirion cedrosanum

La especie *D. cedrosanum* consta de plantas de tamaño medio a robusto con un tallo principal corto y en ocasiones dos a tres tallos secundarios, tronco como de 1 a 1.5 metros de alto; hojas regulares y extendidas, glaucas de color gris pálido a verde pálido, de 80 a 100 cm de largo, y de 2 a 3.5 cm de ancho, con las puntas ligeramente apinzeladas, glaucas, con la quilla ligeramente áspera, márgenes finamente denticulados, espinas curvadas hacia la punta, distantes 10 a 15 mm y de 2 a 5 mm de largo, amarillo pálido a rojizo hacia la punta. Presenta un escapo de hasta casi 5 m de altura. Frutos elípticos y angostos de 4 a 5 mm por 7 a 9 mm (Henrickson y Johnston, 1977; Coello-Coutiño, 2003). Se desarrolla en un rango de temperatura media anual entre 17 y 21 °C y entre 150 y 400 mm de precipitación media anual. Los factores edáficos que conforman su distribución corresponden a Xerosoles, Rendzinas y Regosoles, con una gran riqueza en carbonatos de calcio, con poco desarrollo de horizontes de suelo, con buen drenaje y aireación, en laderas, a pie de monte y sobre abanicos aluviales (Cano *et al.*, 2011). El desarrollo de esta especie se ha reportado en los pastizales y matorrales desérticos rosetófilos del centro y sur del estado de Coahuila, en altitudes de 1000 a 2000 m (Coello Coutiño, 2003). En las Figuras 3 y 4 se aprecian márgenes de las hojas y escapo de una planta de *D. cedrosanum*.



Figura 3. Detalle de las hojas de *D. cedrosanum* en jardines de la UAAAN, 2014.
(Foto: H. Reyes)



Figura 4. Planta de *D. cedrosanum*, con un escapo floral joven (foto: H. Reyes).

Dasyvirion berlandieri

La primera descripción fue en 1879 por Sereno Watson (Bogler, 1994). Presenta hojas largas, delgadas y abatidos en el centro, en expansión cónica; forma de cuchilla de 100 a 170 cm de largo por 1.5 a 3.0 cm de ancho en la base; espigas de 3 a 4 mm de largo; superficie usualmente glauco-ceroso, de color blanco-verdoso, opaca, ligeramente papilosa, ocasionalmente lisas y brillantes. Inflorescencia

generalmente grande, 2.5 a 3.5 m de altura, 1.4 a 2.0 cm de diámetro; tallo rojizo; brácteas a menudo estrechamente superpuestas, lanceoladas, de color verdoso, estriado superficie, papilosa, escabroso; a menudo elípticamente espesa o más gruesa cerca del ápice. Fascículos estaminados con 5 ramas, eje central de 1-2 cm, ramas 2.5 – 6.0 cm de largo. Flores estaminadas con bráctea membranosa de 2.5 mm de ancho por 2.5 mm de largo; tépalos ampliamente obovados de 3 - 4 mm de largo y 1.6 a 2.0 mm de ancho; de color amarillo verdoso, a menudo salpicado de púrpura, usualmente 1 nervadura; filamento de 4,5 mm de largo. Fascículos pistilados con 5-8 ramas, eje central 1.0-2.5 cm, ramas de 10 cm de longitud. Flores pistiladas con una membrana, brácteas lanceoladas de 2 a 3 mm de ancho y 4-5 mm de largo; pedicelo de 3.5 a 5.0 mm de largo receptáculo de 0.5 mm; tépalos ampliamente obovados que miden 2.5 a 5.0 mm de largo por 1.5 a 2.0 mm de ancho, débilmente laciniado, verde y, a menudo salpicado de púrpura, arqueado y se mantiene en forma de copa alrededor pistilo; alargado tubo estigma, de 2-3 y 10-12 mm de largo, en sentido amplio oboval a redondeada, ligeramente dehiscentes; pedicelo de 4-5 mm; lóbulos de 3-4 mm, redondeados o truncados.

El período de floración es desde principios de mayo hasta finales de junio, con floración esporádica en otras ocasiones. *Dasyllirion berlandieri* se encuentra en Nuevo León, Tamaulipas, y probablemente San Luis Potosí en la Sierra Madre Oriental, Sierra San Carlos y Sierra de Tamaulipas; áreas rocosas abiertas, con

pendientes; a menudo en bosques espinosos bajos y arbustivos a 400 - 1850 m (Bogler, 1994). En Nuevo León es posible encontrarle en el Cerro de la Silla y sur de Monterrey hasta Galeana; en Coahuila, La Angostura al sur de Saltillo (Coello-Coutiño, 2003). En las Figuras 5 y 6, es posible visualizar detalles de hojas, escapo y frutos.



Figura 5. Planta de *D. berlandieri*
(Foto: H. Reyes)



Figura 6. Detalle de los frutos de *D. berlandieri* (foto: H. Reyes)

Métodos para la identificación de especies

Una especie puede ser definida como un grupo irreductible de organismos, dentro del cual hay un patrón de la ascendencia y descendencia, y que es distinto al de otros grupos (Cracraft, 1983).

La sistematización de la clasificación de seres vivos implica contar con una adecuada identificación para lo cual se emplea el uso de caracteres taxonómicos o

rasgos singulares que permiten separar o diferenciar una especie de otra. Entre los caracteres taxonómicos se encuentran los morfológicos, predominando aquellos de las estructuras reproductivas (flores, frutos y semillas), así como caracteres cuantitativos. Estos también pueden ser caracteres bioquímicos que se determinan al analizar la composición de sustancias presentes en los seres vivos, como aquellas capaces de producir colores y sabores en flores y frutos, sus posibles beneficios en el ámbito curativo, así como el peligro potencial de ingerirlos (Figuroa *et al.*, 2012). Sin embargo los caracteres mencionados anteriormente presentan ciertas desventajas puesto que se ven afectados por el ambiente. La identificación de especímenes a partir de caracteres morfológicos por ejemplo, puede ser muy difícil para los investigadores o incluso puede no aplicarse debido a la plasticidad fenotípica, su origen y dimorfismo sexual. En ocasiones solo se cuenta con fragmentos de tejidos, como restos de hojas o semillas, los cuales no presentan suficientes caracteres diagnósticos para una acertada identificación. Es por esto que actualmente la técnica de código de barras de la vida basada en técnicas de biología molecular, se presenta como una herramienta complementaria para la correcta identificación de las especies (Crawford *et al.*, 2011).

El código de barras de la vida fue presentado a la comunidad científica en el 2003, cuando el grupo de investigación de Paul Hebert en la Universidad de Guelph en Canadá publicó un artículo titulado “Biological identifications through DNA

barcodes”. Se integró como Iniciativa al contar con la cooperación de varios países que actualmente participan para acrecentar un banco de datos, alimentado con información genética y taxonómica, que esté disponible en Internet. En México, las tres instituciones nodales son el Instituto de Biología de la UNAM, el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), con sede en la Paz, Baja California Sur, y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), ubicado en Chetumal, Quintana Roo. También colabora en el área informática la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), aunque no realiza tareas de investigación (Rangel *et al.*, 2005).

Técnica de código de barras de la vida

El código de barras de DNA consiste en tipificar una secuencia corta de una región específica del genoma para utilizarla de forma análoga al funcionamiento de un escáner de supermercados donde los productos son identificados gracias a las rayas negras del Código Universal de Producto (UPC). Con la diferencia que el Código de barras de DNA utiliza un color específico asignado a cada base nitrogenada (Kress y Erickson, 2012).

La región del gen mitocondrial citocromo c oxidasa 1 (“CO1”) de 648 pares de bases se utiliza para casi todos los grupos de animales, ya que posee las ventajas de

ser lo suficientemente corta para ser secuenciada de forma rápida y barata y lo suficientemente larga para identificar variaciones entre especies; sin embargo no es efectiva para la identificación de plantas ya que el genoma de la mitocondria de las plantas evoluciona mucho más lento que en la mitocondria de los animales (Hebert *et al.*, 2003b; Savolainen *et al.*, 2005). Por ello, biólogos de varios países, agrupados en la Iniciativa Código de Barras la Vida, en la búsqueda un código de barras o marcador genético que funcional para este tipo de organismos, han desarrollado una novedosa herramienta para identificar plantas, a partir de la utilización de marcadores provenientes de los genes de cloroplastos *rbcL* y *matK* que comparten todas las plantas terrestres. Estas secuencias son adoptadas por el Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL) y que se reportan como los más eficientes para las tres características básicas que requiere el código de barras: universalidad, es decir, que esté presente en todas las plantas terrestres; facilidad técnica para obtener la secuencia, incluso de fragmentos de semillas, alimentos o muestras forenses, y capacidad de discriminación, que varíe lo suficiente para distinguir a individuos de especies distintas. El gen *rbcL* (gen de la subunidad grande de la ribulosa bisfosfato carboxilasa) participa en el proceso de fotosíntesis y fijación de carbono de la atmósfera para generar azúcar, que es el proceso bioquímico más importante en el planeta que sostiene todas las cadenas tróficas. En tanto, *matK* es el gen que codifica para una enzima llamada maturasa, que ayuda a la conformación y maduración de un RNA de transferencia (Rangel *et al.*, 2005).

Los dos loci complementarios más utilizados son el plástido espaciador intergénico *trnH-psbA* (uno de los principales contendientes por el código de barras de DNA vegetal nuclear junto con *trnL-F*, *trnL-L*, *trnL-K* entre otros) y los espaciadores internos transcritos de DNA nuclear ribosomal (ITS) (Kress y Erickson, 2012).

Aplicaciones del código de barras de la vida

La técnica de código de barras tiene aplicaciones en la identificación de organismos, para saber si son endémicos y pueden o no salir del país, en la distinción de plantas relacionadas con investigaciones criminales, certificación de componentes biológicos en infusiones, y como apoyo en investigaciones arqueológicas, donde a partir de restos de semillas, madera, alimentos y restos momificados es posible identificar qué consumió una civilización del pasado (Rangel *et al.*, 2005).

Estudios realizados mediante la técnica de código de barras en *Dasyllirion*

Para la región *rbcl* se tiene reportado en el sistema BOLD 77,550 registros publicados, formando 789 BIN (clusters), con muestras procedentes de 188 países

depositado en 90 instituciones. De estos registros, 70,864 tienen nombres de las especies, y representan 36,251 especies. De estos sólo 4,318 se reportan para el orden *Asparagales*.

Para la región *matK* se encuentran 88,521 registros publicados, con muestras procedentes de 175 países, depositado en 149 instituciones. De estos registros, 69.446 tienen nombres de las especies, y representan 36.393 especies, de los cuales 9,017 pertenecen a orden *Asparagales*. Para el caso particular de género *Dasyilirion* se dispone de cuatro registros para *rbcL*, tres que representan a *D. wheeleri* y una para *D. serratifolium*.

Parar la región *matK*, solo se encuentran cuatro registros publicados en el sistema BOLD, dos para la especie *D. serratifolium* y dos para *D. wheeleri*, lo que sugiere la necesidad de identificación y asignación del código de barras para el resto de las especies pertenecientes al género *Dasyilirion* (Información recabada de BOLD Systems, 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Localidades de estudio

La extracción de DNA para las muestras recolectadas se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Análisis de Genomas del Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, mientras que la obtención de productos de PCR y secuenciación de los mismos se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del CINVESTAV Irapuato, Guanajuato. Los sitios de muestreo fueron: (i) los terrenos de la sede de la UAAAN, en Buenavista, Saltillo, Coah., una zona con clima templado semiseco, ubicada en los 25° 20' 55.72" N y 101° 01' 40.74" O, con una altitud de 1798 m; (ii) Puerto de Jamé, localizado en el municipio de Arteaga, Coah., con clima predominante semiseco - semicálido a una latitud de 25° 20' 52" N, longitud de 100°33.965" O y altitud de 2699 m y (iii) municipio de Santiago, Nuevo León, coordenadas 25° 22' 066" de latitud Norte y 100°26.652 "de longitud Oeste, altitud de 2060 m. Las áreas de recolección se muestran en las Figuras 7 a la 11.

Material biológico

De acuerdo con los requisitos de la base de datos BOLD se requiere trabajar con cinco ejemplares diferentes de cada especie, por lo que se trabajó con una muestra de cinco plantas identificadas como *D. cedrosanum* (Buenavista, Saltillo, Coah.), cinco plantas identificadas como *D. berlandieri* (Mpio. de Santiago, N.L.) y cinco plantas de una población no identificada (Puerto de Jamé, Arteaga, Coah.). En el Cuadro 1 se enlistan las plantas, así como las coordenadas de dichas localidades, las cuales se observan en la Figuras 7 a la 11. La identificación de *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* fue realizada por el Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla del departamento de Botánica de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Cuadro 1. Lista de plantas del género *Dasyllirion* usadas en el estudio y su localización.

ID Laboratorio	Latitud	Longitud	Altitud (m)	Especie
JAM 01	25° 20' 842''	100°34.894'	2553	<i>Dasyllirion</i> sp.
JAM 02	25° 20' 520''	100°33.958'	2699	<i>Dasyllirion</i> sp.
JAM 03	25° 20' 520''	100°33.965'	2699	<i>Dasyllirion</i> sp.
JAM 04	25° 20' 522''	100°33.970'	2704	<i>Dasyllirion</i> sp.
JAM 05	25° 20' 527''	100°33.976'	2718	<i>Dasyllirion</i> sp.
CH 02	25° 22' 065''	100°26.643'	2060	<i>D. berlandieri</i>
CH 03	25° 22' 066''	100°26.652'	2060	<i>D. berlandieri</i>
BO 01	25° 22' 123''	100°26.205'	2001	<i>D. berlandieri</i>
BO 03	25° 22' 186''	100°25.830'	1977	<i>D. berlandieri</i>
BO 04	25° 22' 190''	100°25.826'	1975	<i>D. berlandieri</i>
UA2011-27	25° 21' 288''	101°02.001'	1790	<i>D. cedrosanum</i>
UA2011-15	25° 21' 323''	101°01.908'	1792	<i>D. cedrosanum</i>
UA2010-28	25° 20' 930''	101°1.665'	1811	<i>D. cedrosanum</i>
UA2010-39	25° 21' 268''	101°1.900'	1794	<i>D. cedrosanum</i>
UA2010-12	25° 21' 358''	101°01.906'	1791	<i>D. cedrosanum</i>

ID = clave de identificación

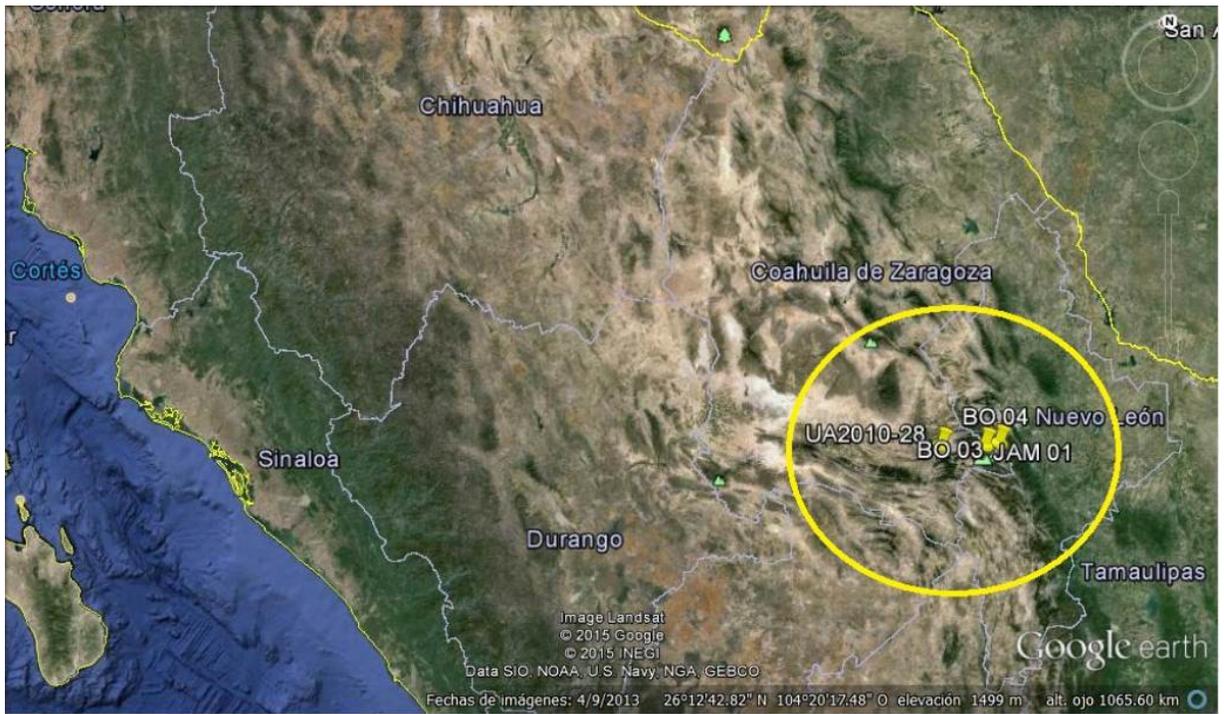


Figura 7. Área de distribución de las tres poblaciones donde se localizan las especies estudiadas.

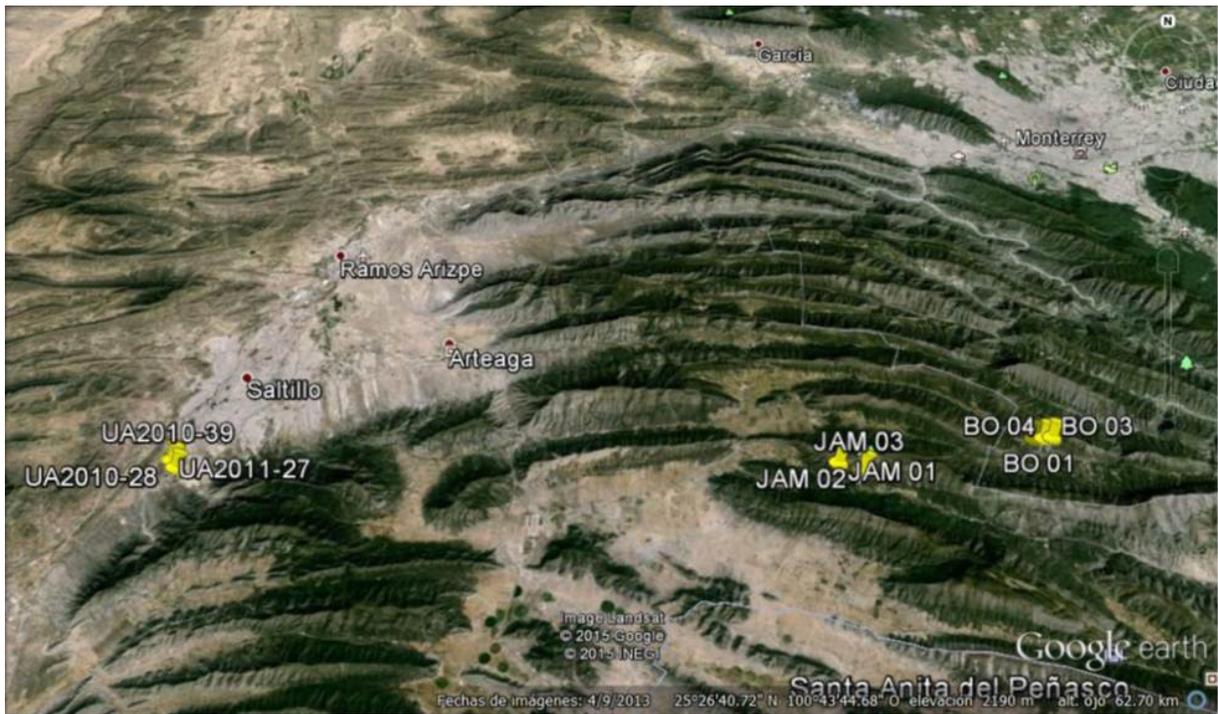


Figura 8. Cercanía geográfica entre localidades.



Figura 9. Ubicación de la población de *D. berlandieri*.



Figura 10. Ubicación de la población desconocida de *Dasyllirion*



Figura 11. Ubicación de la población de *D. cedrosanum*.

Recolección de muestras en campo

En las localidades anteriormente descritas se etiquetaron y recolectaron muestras de ejemplares de cada especie, los cuales fueron documentados con fotografías y geolocalización.

Análisis de laboratorio

Limpieza de muestras

De las plantas seleccionadas (Cuadro 1) se cortaron hojas jóvenes y sanas, las cuales se introdujeron en cajas de Petri identificadas con su etiqueta correspondiente. Para desinfectar se sumergieron las hojas en una solución de hipoclorito al 1 % y posteriormente en etanol al 70 % por 1 minuto. Se enjuagaron en agua estéril, se dejaron secar y se colocaron en cajas Petri estériles para su utilización próxima.

Aislamiento de DNA

El aislamiento de DNA genómico se realizó con base en la metodología que a continuación se describe (Fernando Hernández Godínez, comunicación Personal). Se molieron 20 mg de tejido fresco con N₂ líquido y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml; se agregaron 800 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH = 8, NaCl 20 mM, EDTA 20 mM y N-Lauril-sarcosina al 7 %), se invirtió el tubo ocasionalmente hasta humedecer completamente el polvillo de tejido y se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente se le agregaron 800 µl de fenol , se agitó en un vortex y se

centrifugó por 20 min a 4 °C a 12,000 rpm. Se retomó la fase acuosa, se transfirió a otro tubo y se le agregaron 100 µl de RNAsa diluida (100 mg/ml) por cada 100 µl de solución acuosa; se mezcló por inversión e incubó a 37 °C por 15 minutos. Se le agregaron 800 µl de isopropanol frío (-20 °C), se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar por media hora aproximadamente hasta formar la madeja de DNA. Se colectó la madeja con un gancho de pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se lavó con 200 µl de alcohol al 70 % (-20 °C), se decantó, se dejó secar por 10 a 30 minutos y se resuspendió en TE 1X (según cantidad de DNA). Posteriormente se almacenó a 8 °C para su futura visualización y a -20 °C para almacenamiento por tiempo indeterminado.

Análisis de calidad del DNA en gel de agarosa.

Para corroborar la pureza del DNA se preparó un gel de agarosa al 1 % para el cual se disolvió 1 g de agarosa en 100 ml de solución tampón 10x de TBE (tris base, ácido bórico, EDTA) estéril, se calentó en microondas por alrededor de 90 segundos hasta que se observó una mezcla completamente homogénea. Se dejó enfriar por espacio de unos minutos y se agregaron 10µl de Gel Red (BIOTIN™ cat: 41003) para su incorporación. Esta mezcla se vertió en la placa de corrida colocando el peine en la parte superior del aparato electroforético (Life Technologies™ Gibco.), se eliminaron burbujas y se dejó enfriar por 20min. Transcurrido este tiempo se cargó

con ayuda de micropipeta 5µl de la muestra + 1µl de buffer de carga (Nucleic Acid Sample Loading Buffer de Bio-Rad) por cada pozo y se corrió el gel a un voltaje de 80-90 volt durante 1h. Al término se llevó a un documentador de geles (Bio-Rad Gel Doc™ 170-8170) donde se digitalizó y fotografió el gel, para su interpretación.

Determinación de la calidad del DNA en espectrofotómetro

Posterior a la electroforesis del DNA, se cuantificó y evaluó su calidad espectrofotométricamente con absorbancias de 260nm (A260) y 280nm (A280), con un Nanodrop ND-1000 y un volumen de 1µl de muestra sin diluir. Puesto que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260nm mientras que las proteínas lo tienen a 280nm. El cociente de ambas absorbancias (A260/280) es un indicador de pureza.

Iniciadores de secuencias de los genes *rbcL* y *matK*

Se usaron dos iniciadores para marcadores *rbcL* reportados por Levin *et al.*, (2003) y Kress *et al.*, (2007) y dos para *matK*, los cuales fueron reportados por Cuenoud *et al.*, (2002) (Cuadro 2), y utilizados en un estudio por Fazekas *et al.*, (2012). Cabe señalar que las temperaturas de alineación que se presentan en este

cuadro son las que se obtuvieron por medio del software IDT (Integrated DNA Technologies) y que nos sirvieron como punto de partida para encontrar las temperaturas optimas de estos iniciadores con las muestras de *D. cedrosanum*, *D. berlandieri* y la de la población de Jamé.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación de las secuencias.

Nombre del iniciador	Secuencia 5' - 3'	Sentido	TA (°C)	Referencias
rbcLaF	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Derecho	61.3	Soltis et al: (1992) modificado por Levin et al; (2003)
rbcLaR	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	Izquierdo	57.9	Fofana et al: (1997) modificado por Kress and Erickson; (2007)
matK-390F	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	Derecho	49.4	Couenoud et al; (2002)
matK-1326r	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	Izquierdo	56	

TA= Temperaturas de alineación promedio obtenidas del software *IDT* (Integrated DNA Technologies)

Cuantificación del DNA en espectrofotómetro NanoDrop 1000

Para poder aplicar el protocolo se necesita una concentración mínima de 100 ng/µl de DNA. El NanoDrop TM. Espectrofotómetro 1000 tiene la capacidad de medir muestras de DNA concentradas, con el uso de una longitud de onda de entre 220 nm

a 750 nm. Funciona a través de un software (ND-1000 V3 3.0), el cual realiza las lecturas y proporciona valores de las muestras que se visualizan en la pantalla de la computadora asociada. Es un equipo que da un valor preciso en ng/μl, así como el grado de pureza del DNA. Este método tiene la ventaja de emplear para la cuantificación de 1 a 2 μl de muestra. En este caso se colocó 1 μl de DNA en el lector del NanoDrop. A partir de los datos obtenidos en el NanoDrop se prepararon diluciones de DNA ajustadas a una concentración final de 40 ng/μl (Fazekas *et al.*, 2012) en un volumen de 50 μl, con la fórmula:

$$C1 \times V1 = Cf \times Vf$$

Dónde:

C1 = Concentración inicial de DNA

Cf = 40 ng/μl

Vf = 50 μl

V1 = Volumen requerido de suspensión de DNA

Para la dilución se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó la técnica de la PCR con la finalidad de amplificar o reproducir un gran número de copias de DNA de los genes de cloroplastos *matK* y *rbcL*, partiendo de una pequeña muestra. Para llevar a cabo esta técnica se prepararon cocteles de

PCR que contenían 25 µl de trehalosa al 10 %, 5 µl de Buffer 10x, 2.5 µl de MgCl₂ [2.5 mM], 0.25 µl de dNTPs [10 mM], 0.5 µl de iniciador Derecho [10 µM], 0.5 µl de iniciador Izquierdo [10 µM], 0.25 µl de Taq polimerasa[5 U/µl], 4 µl de DNA [40 ng/µl], y 12 µl de agua estéril, para un volumen total de 50 µl por muestra.

Cuadro 3. Preparación del coctel para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Componente	Volumen	
	1 reacción	15 reacciones
Agua estéril	12 µl	180 µl
Trehalosa 10%	25 µl	375 µl
Buffer 10x	5 µl	75 µl
MgCl ₂ [2.5mM]	2.5 µl	37.5 µl
dNTP's [10mM]	0.25 µl	3.75 µl
Iniciador F	0.5 µl	7.5 µl
Iniciador R	0.5 µl	7.5 µl
<i>Taq</i> Polimerasa [5u/ml]	0.25 µl	3.75 µl
Subtotal	46 µl	**690 µl /15
DNA Templado	4 µl	4 µl para cada tubo
Total	50 µl	50 µl

**El volumen se divide entre el número de reacciones y se agrega el DNA de cada muestra

Programa del termociclador Palm-Cycler para PCR de cada gen

La optimización de las temperaturas de alineación se basaron a partir de la media del valor por default para cada primer, y a partir de esta referencia se corrieron a diferentes temperatura en un termociclador de gradiente Palm-Cycler™ de Corbett Life Science. Las condiciones óptimas de hibridación o alineación para *rbcL* fue de 61°C y para *matK* de 57°C el cuál se observa en el (Cuadro 4). Una vez que se obtuvo el mejor producto de PCR para cada par de iniciadores u oligonucleótidos se procedió a realizar una PCR en el termociclador de punto final Applied Biosystem™ donde se utilizó el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 4 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 seg, una temperatura de alineación para el marcador *rbcL* de 61°C por 35 seg y una de 57°C por 35 seg para *matK*, 72°C por 35 seg para la temperatura de extensión; un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos y 4°C por 5 minutos. Los productos finales de la PCR se guardan a -20°C hasta proceder con la cuantificación por electroforesis y/o cuantificación en espectrofotómetro.

Cuadro 4. Programa del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Ciclos	Fase	Temperaturas optimizadas		Tiempo (min)
		<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	
	Desnaturalización inicial del DNA	94 °C	94 °C	4:00
40	Desnaturalización del DNA	94 °C	94 °C	0:30
	Alineación del iniciador	61 °C	57 °C	0:35
	Extensión de iniciador	72 °C	72 °C	0:35
	Extensión final del iniciador	72 °C	72 °C	10:00

Técnica de electroforesis

Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis horizontal. Se utilizó un equipo de electroforesis marca Cleaver Scientific, Modelo: MSMIDI. Se prepararon geles de agarosa al 1% con 0.8 g de agarosa en polvo en 80 ml de solución tampón TAE 1x (Tris base, Ácido acético, EDTA) estéril. La mezcla se calentó en un horno de microondas por 90 segundos hasta que se transparentó. Se dejó enfriar durante varios minutos hasta poder tocar el recipiente y se adicionaron 5 µl de colorante Gel Red (BIOTIUM™ cat: 41003) como agente de tinción para visualizar los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta y se agitó suavemente para obtener una mezcla homogénea. En seguida se colocó el peine en el lado de la charola correspondiente al polo negativo. Se vació la mezcla eliminando posibles

burbujas en el gel y se dejó solidificar por 20 min. Una vez formado el gel, se cubrió completo con una solución de TAE 1X. Se cargaron 6 μ l de la muestra (producto de PCR) más 3 μ l de buffer de carga(TrackIt™ Cyan/Orange Loading Buffer, marca Invitrogen). Además se cargó en uno de los pozos del gel un total de 2 μ l del marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder - Life Technologies) más 1 μ l de buffer de carga. Se cerró el aparato, se conectaron los cables a la fuente de poder a una potencia de entre 80 y 90 Vólts, por un tiempo de 1 hr. Al finalizar este proceso se extrajo el gel y se llevó a un documentador de geles (Bio-Rad Gel Doc™ 170-8170) que consta de un transiluminador y una cámara que capta la imagen del gel y la envía a una computadora con sistema operativo Windows XP y software Quantity OneR para su interpretación.

Secuenciación de muestras

El proceso de secuenciación del DNA se llevó al cabo para ambas hebras de la cadena (derecha e izquierda) para mejorar la precisión de sus datos. Se realizó en el área de genómica del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), por el personal de la misma, con el programa de secuenciación ABI y el equipo Applied Biosystems® 3730/3730xl DNA Analyzer.

Depuración de las secuencias

Blast entre F y R

Se hicieron alineaciones entre la secuencias derecha e izquierda de los dos genes de cada muestra para verificar la calidad de la secuenciación mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) implementada en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), la cual utiliza un algoritmo que normalmente compara la secuencia del usuario (Query) contra las secuencias de su base de datos (Subject) para indicarle al usuario la secuencia más cercana. En el caso de este estudio se tomó en cuenta el tamaño de ambas secuencias, el porcentaje de identidad y cobertura los cuales debían ser lo más cercanos al 100% y el número de gaps o deleciones.

Revisión de electroferogramas

Una vez revisadas las secuencias mediante el BLAST, se procedió a medir la calidad de estas mediante la revisión de electroferogramas que no son más que gráficos que arroja el secuenciador, los cuales muestran el orden de las bases a

partir de curvas de fluorescencia o picos bien definidos, correspondiendo un color para cada base (verde para la adenina, rojo para timina, negro para guanina y azul para citosina), donde mientras más altos sean los picos más fuerte será la fluorescencia creada por esa base y mayor su calidad. (Northwest Association for Biomedical Research and Research National Science Foundation, 2012).

Para la visualización de los electroferogramas se utilizó el programa *FinchTV*, tomando en cuenta un valor promedio de calidad ≥ 30 (Q30) cumpliendo con los rigurosos estándares de las bases de datos públicas. Puesto que *FinchTV* calcula la calidad tomando el \log_{10} de la probabilidad de error y multiplicándolo por -10, las bases con valores de calidad de 30, tienen probabilidades de error de uno en 1000 (Northwest Association for Biomedical Research and Research National Science Foundation, 2012).

Corte de extremos de baja calidad

Partiendo de los criterios antes mencionados sobre calidad se procedió al corte de los extremos de las secuencias con promedio de calidad inferior a 30, así como a la corrección de bases intermedias comparando la calidad de la secuencia derecha con la izquierda, tanto de las secuencias *rbcL* como *matK*.

Traducción para descartar fallas en secuenciación

Las regiones con las que se trabajó en el presente estudio son codificantes, un paso indispensable es obtener la secuencia de la proteína para la que codifica la secuencia de DNA obtenida. Para ello se verificó la ausencia de codones STOP intermedios, con la herramienta de traducción del servidor **expasy**.

Agrupamiento de secuencias por marcador

Partiendo de las secuencias ya depuradas se dio lugar a la organización de las mismas, agrupándolas en un archivo FASTA para cada gen, el cual se generó leyendo y concatenando los archivos en un vector por medio de código desde la

consola de R.

Alineación con Clustal

Con las secuencias agrupadas por marcador se realizaron alineaciones para poder observar polimorfismos o diferencias entre las secuencias de cada planta (cambios de bases) y se guardaron en archivo con formato Phylip para su posterior análisis.

Análisis filogenético

Para el análisis filogenético se utilizaron los paquetes **seqinr**, **ape** y **spider** del lenguaje y ambiente R (R Core Team. (2014)). La lectura de las alineaciones hechas en *Clustal* se realizó en formato “Phylip” con el paquete *seqinr*. Con el paquete *ape* se convirtieron las alineaciones a formato “DNAbin” y se construyó una matriz de distancias genéticas, de la cual se partió para generar un árbol filogenético preliminar con las muestras de Jamé, Boquillas, Chupadero y Buenavista con el algoritmo Neighbor Joining. Debido al hallazgo de algunas diferencias, se revisaron las secuencias nuevamente, se realizaron las ediciones necesarias y se generó otro

archivo en formato “Fasta” para los nuevos análisis.

Obtención de secuencias consenso

Con ayuda del paquete **seqinr** se obtuvieron secuencias consenso para las plantas de *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* tanto para *rbcL* y *matK*. Para la secuencia *matK* de *D. cedrosanum* 866 nucleótidos y 519 para *rbcL*. Para *D. berlandieri* una secuencia consenso *matK* de 855 y 525 nucleótidos para *rbcL*.

Generación de dendrogramas

Se construyeron dendrogramas basados en el algoritmo NJ (Neighbor Joining) a partir de la generación de matrices de distancia de Kimura con dos parámetros entre las secuencias de BOLD y las secuencias consenso de *rbcL* y *matK* para *D. cedrosanum*, *D. berlandieri* y la especie desconocida de Jamé.

Inclusión de espárrago como control

Se generaron dos archivos fasta, uno con las secuencias consenso *matK* de *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*, más las secuencias de BOLD de *D. serratifolium*, *D.*

wheeleri y *Asparagus officinalis* (espárrago), y otro con las de *rbcL*. A partir de estos archivos se generaron las matrices y arboles filogenéticos correspondientes.

Generación de códigos de barras

La representación gráfica del código de barras se llevó a cabo mediante la utilización del paquete ***spider*** de R. Se obtuvieron los códigos de barras correspondientes a *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* para los genes *rbcL* y *matk* a partir de las secuencias “DNAbin”.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad de DNA

Como se observa en el Cuadro 5, los parámetros de calidad de DNA son adecuados para proceder con la amplificación de fragmentos por medio de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Cuadro 5. Parámetros de calidad de DNA.

ID Laboratorio	CI DNA ng/ul	A260	A280
JAM 01	2947.00	58.940	34.225
JAM 02	2904.44	58.089	33.970
JAM 03	3538.92	70.778	40.258
JAM 04	2889.00	57.780	34.148
JAM 05	3408.65	68.173	39.051
BO 01	4827.61	96.552	54.582
BO 03	3893.58	77.872	45.263
BO 04	2723.86	54.477	32.973
CH 02	4489.62	89.792	50.309
CH 03	4752.27	95.045	55.248
UA2011-27	410.72	8.214	4.484
UA2010-28	120.75	2.415	1.508
UA2010-39	104.32	2.086	1.214
UA2011-12	105.28	2.106	1.338
UA2011-15	87.29	1.746	1.138

ID Laboratorio es el nombre asignado a cada planta, CI es la concentración inicial de DNA proporcionada por el espectrofotómetro, A260 es la absorbancia a 260 nm y A280 es la absorbancia a 280 nm. La concentración final necesaria para la realización de la PCR es de 40 ng/ul.

Amplificación de fragmentos de *rbcL* y *matK*

En las Figuras 12 y 13 se observan los geles con las bandas correspondientes a los fragmentos de DNA amplificados de *rbcL* y *matK* para cada una de las muestras colectadas. En la Figura 12 se puede observar que el fragmento amplificado fue el correcto al compararse con la escalera o marcador de tamaño molecular. Las bandas se observan íntegras y de buena calidad, lo que se puede notar por el grosor de las mismas, lo que permite obtener una buena secuenciación. De cada una de las 15 muestras se logró amplificar el fragmento deseado de *rbcL*, como se puede observar por medio de las bandas presentes en el gel de agarosa, las cuales presentaron un tamaño de banda aproximado de 580 bp.

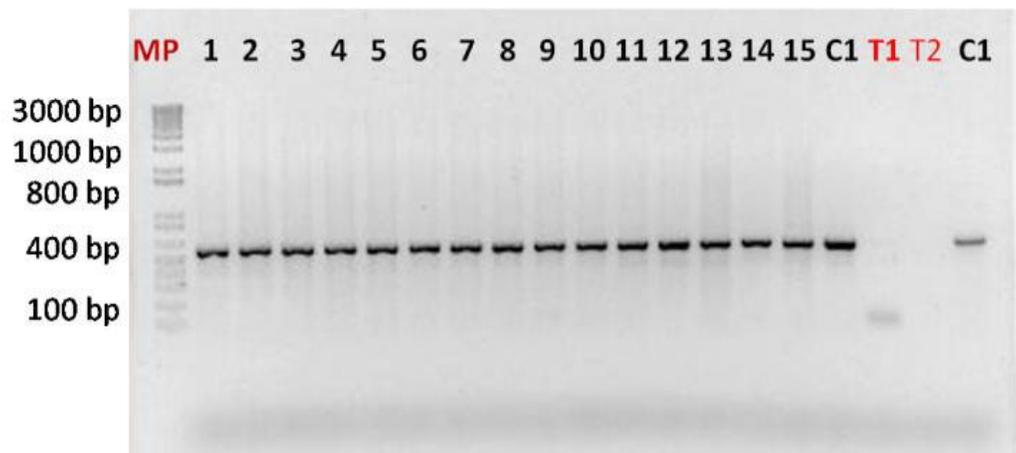


Figura 12. Patrones electroforéticos para el iniciador *rbcL*. Los carriles presentan cinco plantas para la población desconocida de Jamé (1-5), cinco para *D. berlandieri* (6-10) y cinco para *D. cedrosanum* (11-15). MP es el marcador de tamaño molecular, C1 representa el control positivo *Capsicum annum var. glabriusculum* que es chile, T1 es el sobrante del Mix sin el DNA, T2 es H₂O libre de RNAsas y Dnasas.

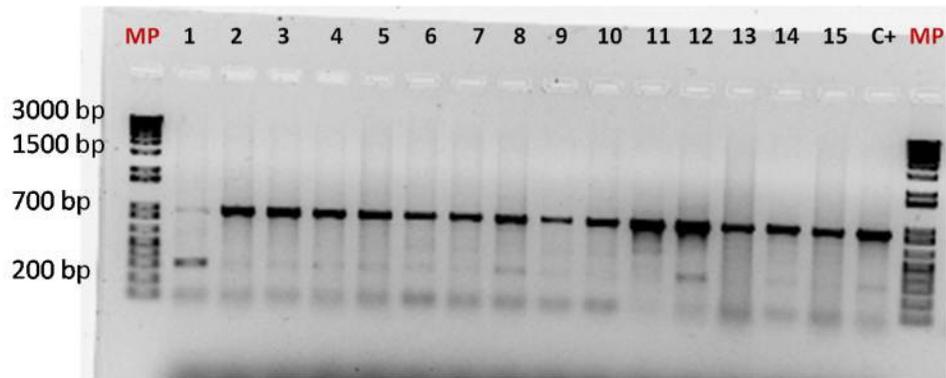


Figura 13. Patrones electroforéticos para el iniciador *matK*. Los carriles presentan cinco plantas de la población desconocida de Jamé (1-5), cinco de *D. berlandieri* (6-10) y cinco de *D. cedrosanum* (11-15). (1). JAM01, (2). JAM02, (3). JAM03, (4). JAM04, (5). JAM05, (6). BO01, (7). BO03, (8). BO04, (9). CH 02, (10). CH 03, (11). UA2011-27, (12). UA2010-28, (13). UA2010-39, (14). UA2010-12, (15). UA2011-15. C1 representa el control positivo *Capsicum annuum var. glabriusculum* que es chile y MP es el marcador de tamaño molecular.

En la Figura 13 se observa la amplificación de una banda de aproximadamente 800 bp en cada una de las muestras, lo cual concuerda con la información reportada por Fazekas *et al.* (2012), confirmando una correcta amplificación para esta región. Se observa también una segunda banda de 300 bp aproximadamente, la cual posiblemente se debe a una amplificación parcial de DNA nuclear de la misma planta, que puede tener un cierto grado de similitud con la secuencia del DNA de cloroplastos (*matK*), sin embargo es solo un corto fragmento de la secuencia, lo cual explica el pequeño tamaño de la segunda banda en comparación con la primera de 800 bp aprox. Se pudiera sugerir una contaminación con DNA de un microorganismo, ya que aun cuando se tomaron las medidas de limpieza y manejo necesarias, es posible su presencia debido a las condiciones de enfermedad en que se encontraban algunas plantas; aun cuando se trató de coleccionar y utilizar tejido sano, en este tipo de plantas es difícil obtener tejido completamente sano ya que las hojas más jóvenes pueden tener más de 5 años de vida. Sería posible pensar en la amplificación del fragmento de DNA de un microorganismo, si bien no se ha reportado en la literatura un caso similar para el caso de *matK*. Kress y Erickson (2012) recomiendan comprobar si hay secuencias quiméricas (resultado de la amplificación de PCR no específica a partir de múltiples templates), por contaminación de bacterias, virus, hongos o algas y quitarlos de la secuencia consenso. Por otro lado se podría pensar también que la banda de menor tamaño se pudo haber generado por la formación de dímeros o trímeros de primers, sin embargo por el momento, no se pueden más que sugerir posibles causas para la presencia de dos bandas, por lo que deberá tomarse

solo como una hipótesis. Es importante mencionar que dicho fenómeno no afectó los resultados obtenidos, lo cual se verificó en el análisis de las secuencias por medio de los electroferogramas, en los que se confirmó su calidad, ya que no se encontró la presencia de “N” en ellas.

Alineaciones y distancias genéticas

Se obtuvieron 15 secuencias de cada uno de los genes amplificados: *rbcL* y *matK*, las cuales presentaron muy buena calidad en su lectura y alineamiento a excepción de las plantas JAM 01 y UA2011-27 de la región *matK*, las cuales fueron eliminadas debido a problemas de secuenciación evidenciados por gaps, así como BO 01 del gen *rbcL*, que fué eliminada debido a que era un fragmento pequeño de la secuencia.

Para el marcador *rbcL* se obtuvo una secuencia consenso de 519 nucleótidos para *D. cedrosanum* y 525 para *D. berlandieri*. En los Cuadros 6 y 7 se muestra el número de sustituciones de bases por sitio entre las secuencias de nucleótidos de las plantas analizadas para ambos genes y las dos especies de sotol documentadas en BOLD. Para el marcador *matK* se obtuvo un fragmento de 866 nucleótidos en la

secuencia consenso de *D. cedrosanum* y 855 para *D. berlandieri*

Tanto para *rbcL* como para *matK*, las secuencias de las muestras se comportaron de manera uniforme dentro de las especies *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*. La mayor variación interespecífica se presentó en el gen *matK*, Las diferencias interespecíficas mayores para el gen *matK* fueron con *D. berlandieri*, la cual presentó una diferencia de 7 bases con *D. wheeleri* y 5 con *D. serratifolium*, así como *D. cedrosanum*, que mostró una diferencia de 7 bases con *D. berlandieri*, 4 con *D. serratifolium* y 6 con *D. wheeleri*. En cambio se observó poca diferencia entre las secuencias de *D. serratifolium* y *D. wheeleri* con solo 2 bases substituidas.

Para el gen *rbcL*, las secuencias de *D. wheeleri* y *D. serratifolium* solo presentaron diferencia en una base, lo mismo ocurrió para *D. wheeleri* y *D. cedrosanum*, y *D. wheeleri* con *D. berlandieri*, sin embargo la diferencia de un solo nucleótido en sus secuencias puede significar millones de años de divergencia en la escala evolutiva (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Número de sustituciones de nucleótidos entre especies de *Dasyvirion* con el marcador *rbcL*.

Especies	Dberlan	Dcedro	Dserrat	Dwheel
Dberlan	0	0	0	1
Dcedro	0	0	0	1
Dserrat	0	0	0	1
Dwheel	1	1	1	0

Especies: *D. serratifolium*, *D. wheeleri*, *D. cedrosanum*, *D. berlandieri*

Cuadro 7. Número de sustituciones de nucleótidos entre especies de *Dasyvirion* con el marcador *matK*.

Especies	Dserrat	Dwheel	Dcedro	Dberlan
Dserrat	0	2	4	5
Dwheel	2	0	6	7
Dcedro	4	6	0	7
Dberlan	5	7	7	0

Especies: *D. serratifolium*, *D. wheeleri*, *D. cedrosanum*, *D. Berlandieri*

Análisis filogenético del gen *rbcL*

El árbol filogenético de la Figura 14 muestra el agrupamiento de plantas individuales con con el gen *rbcL* y el método de Neighbor-Joining (NJ) en *Dasyllirion*, el cual incluye 14 secuencias *rbcL*; cuatro pertenecen a la especie *D. cedrosanum*, cuatro a *D. berlandieri* y cinco al grupo de la población de Jamé, el cual se agrupa con *D. berlandieri*. Por otro lado la planta UA2010-39 se separa del grupo de *D. cedrosanum* y parece agruparse más cerca de las de Jamé debido la similitud entre sus secuencias. Esto indca que podría tratarse de una planta de especie exótica, introducida al área de Buenavista, Saltillo.

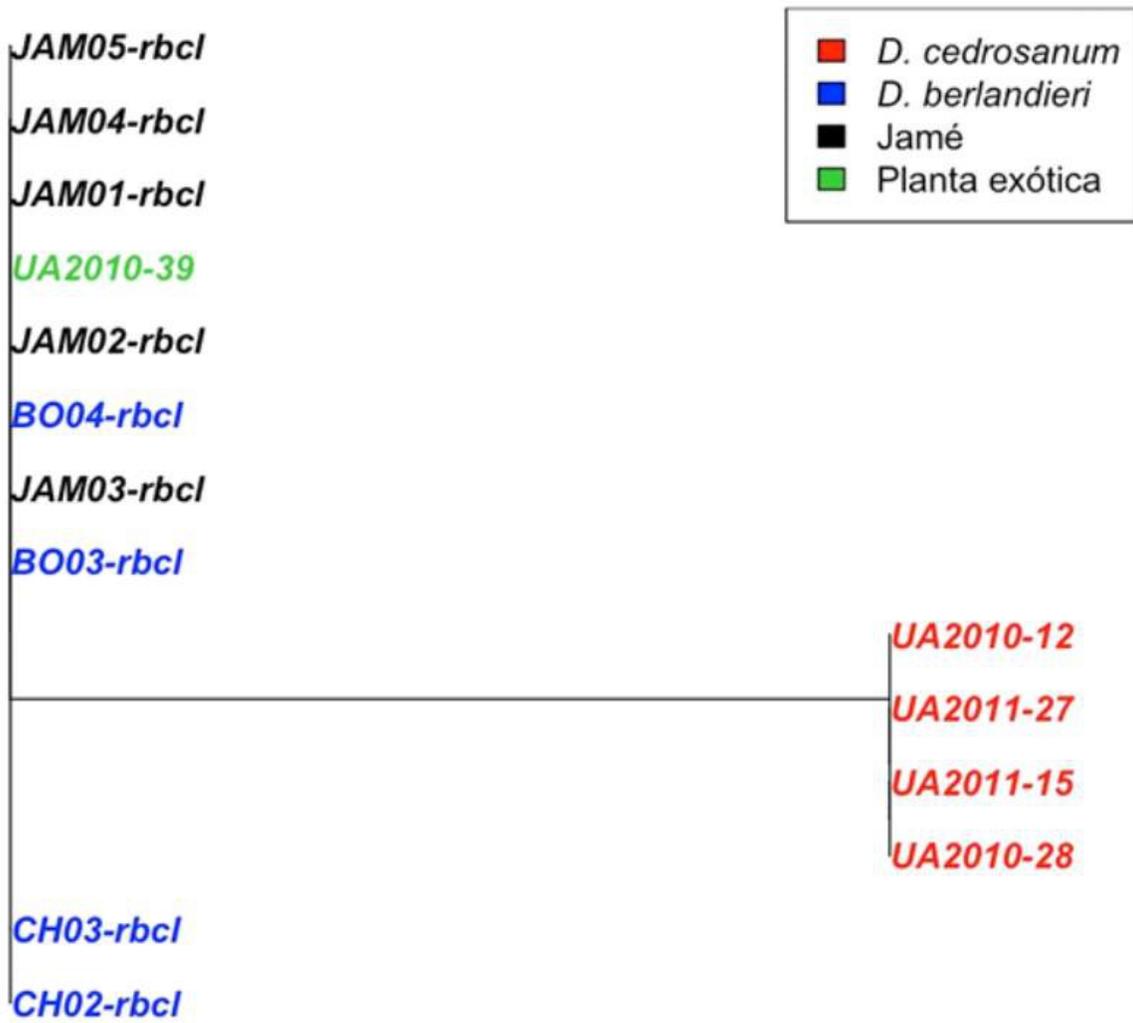


Figura 14. Agrupamiento de plantas individuales con con el gen *rbcL* y el método de Neighbor-Joining (NJ) en *Dasyllirion*.

En rojo se observan las plantas que se agrupan en la especie *D. cedrosanum*, en azul las pertenecientes al grupo de *D. berlandieri*, en negro las de la población

desconocida Jame, y en verde la planta exótica UA2010-39.

Las Figuras 15 y 16 contienen arboles filogenéticos para el gen *rbcL* a partir de secuencias consenso de *D. cedrosanum*, *D. berlandieri* y las secuencias de BOLD (*D. serratifolium* y *D. wheeleri*), incluyendo a UA2010-39 en la Figura 16. Se puede observar que la secuencia consenso para *rbcL* de *D. cedrosanum* es diferente del resto. En la Figura 16 se observa como la planta UA2010-39 se encuentra posicionada entre *D. wheeleri* y *D. berlandieri*, formando un grupo aparte de *D. cedrosanum*.

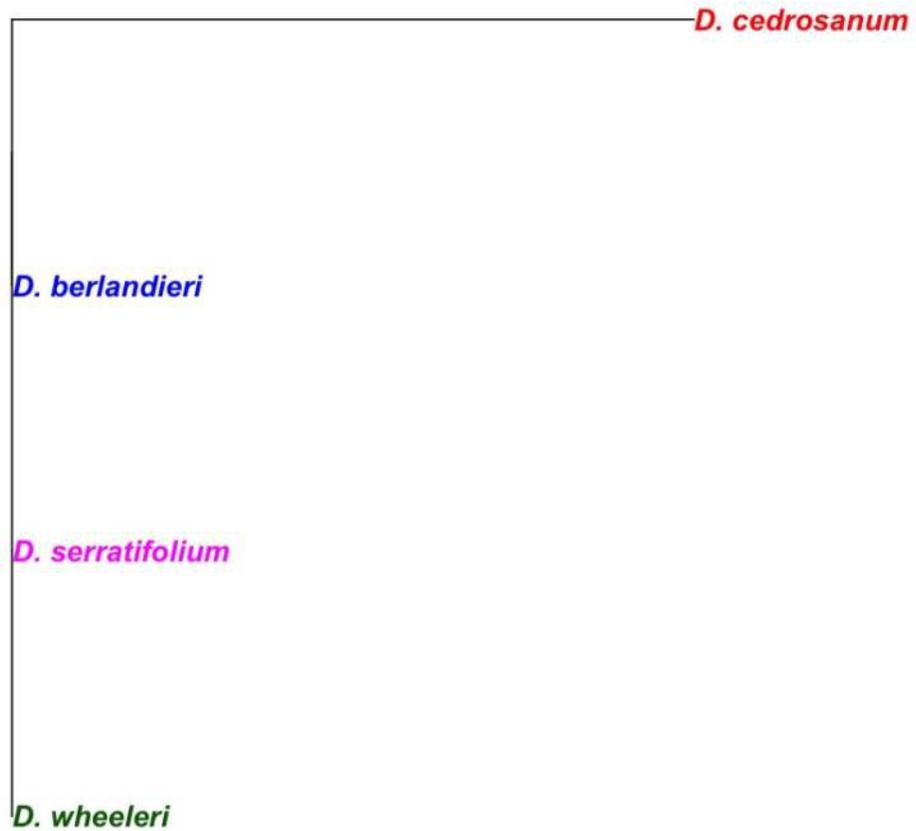


Figura 15. Árbol filogenético para el gen *rbcL* a partir de secuencias consenso de *D. cedrosanum*, *D. berlandieri* y las secuencias de BOLD (*D. serratifolium* y *D. wheeleri*).

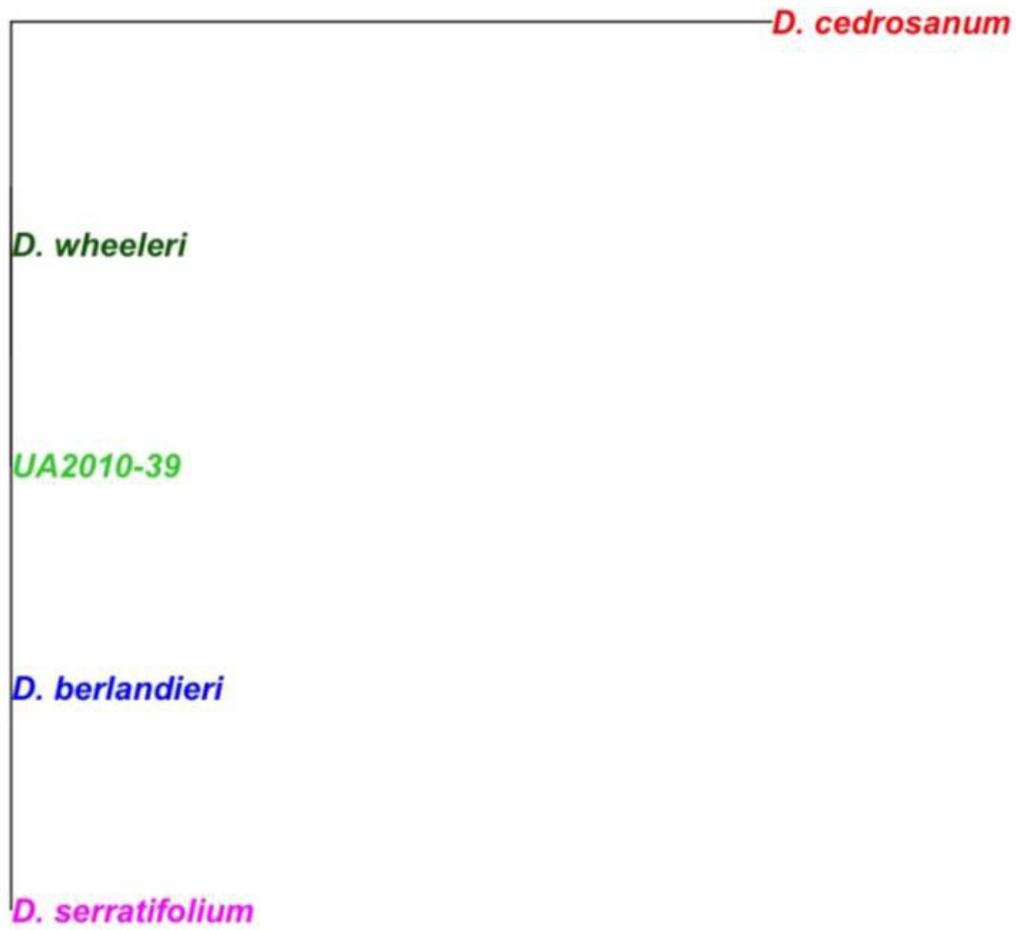


Figura 16. Árbol filogenético para el gen *rbcL* a partir de secuencias consenso de *D. cedrosanum*, *D. berlandieri* y las secuencias de BOLD (*D. serratifolium* y *D. wheeleri*), incluyendo a UA2010-39.

La Figura 17 presenta el árbol filogenético del gen *rbcL* a partir de secuencias consenso de BOLD, *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* con la inclusión de *A. officinalis*. De acuerdo con Sarich y Wilson (1973) y su propuesta de la prueba de velocidad

relativa, es que se incluyó la especie *Asparagus officinalis* como especie de referencia externa al grupo. Podemos observar como las secuencias de *Dasyllirion* se siguen agrupando de la misma manera así como su lejanía en comparación con la especie control.

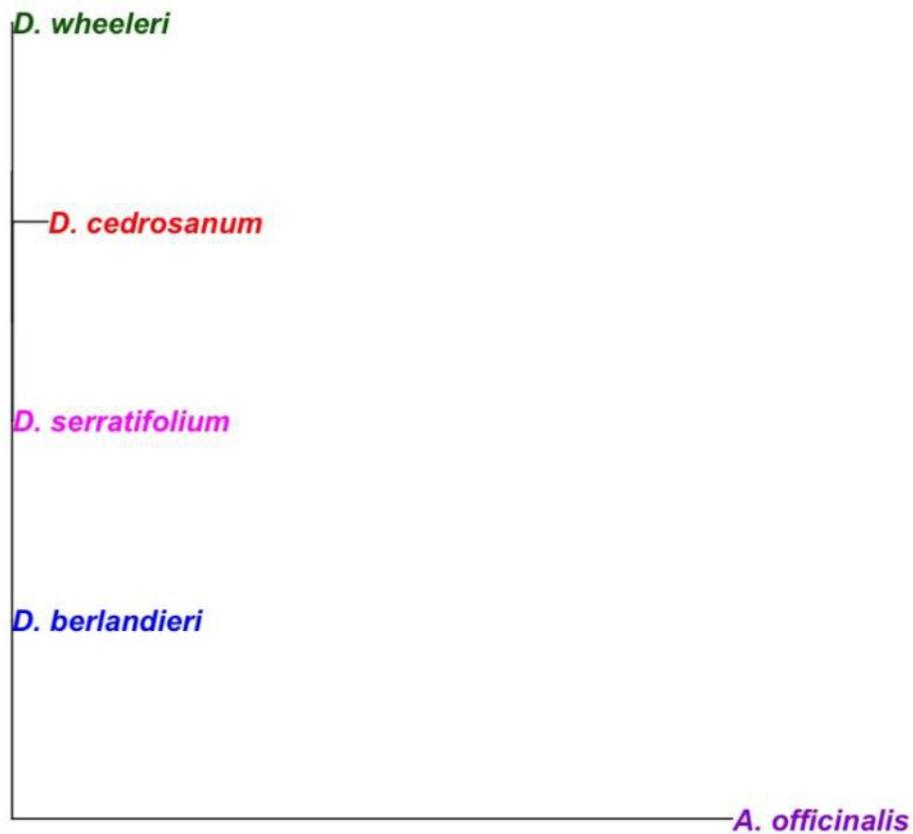


Figura 17. Árbol filogenético del gen *rbcL* a partir de secuencias consenso de BOLD, *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* con la inclusión de *A. officinalis*.

La Figura 18 comprende el dendrograma de secuencias *matK* de plantas individuales, donde se observa la formación de tres grupos, el primero constituido por plantas pertenecientes a la especie *D. cedrosanum*, dentro de la cual se encuentran ubicadas las plantas de la localidad de Buenavista; el segundo formado por las plantas pertenecientes a la especie *D. berlandieri* en la cual se agrupan las plantas

de Boquillas, Chupadero y Jamé; lo cual sugiere que las plantas de la localidad de Jamé podrían pertenecer a *D. berlandieri*. El tercer grupo está conformado por la planta UA2010-39 de la localidad de Buenavista, lo que la confirma como una especie introducida, la cual aún no se ha podido ubicar con certeza en una especie particular debido a la carencia de estructuras florales al momento de su observación, y a su condición como planta masculina. Según observaciones hechas por el Dr. Jose Angel Villareal Quintanilla, se presume que podría tratarse de la especie *D. acrotrichum* (Bogler, 1994), ya que presenta características similares (Figura 19). En todo caso, ya que se trata de una planta exótica, se elimina para el siguiente análisis.

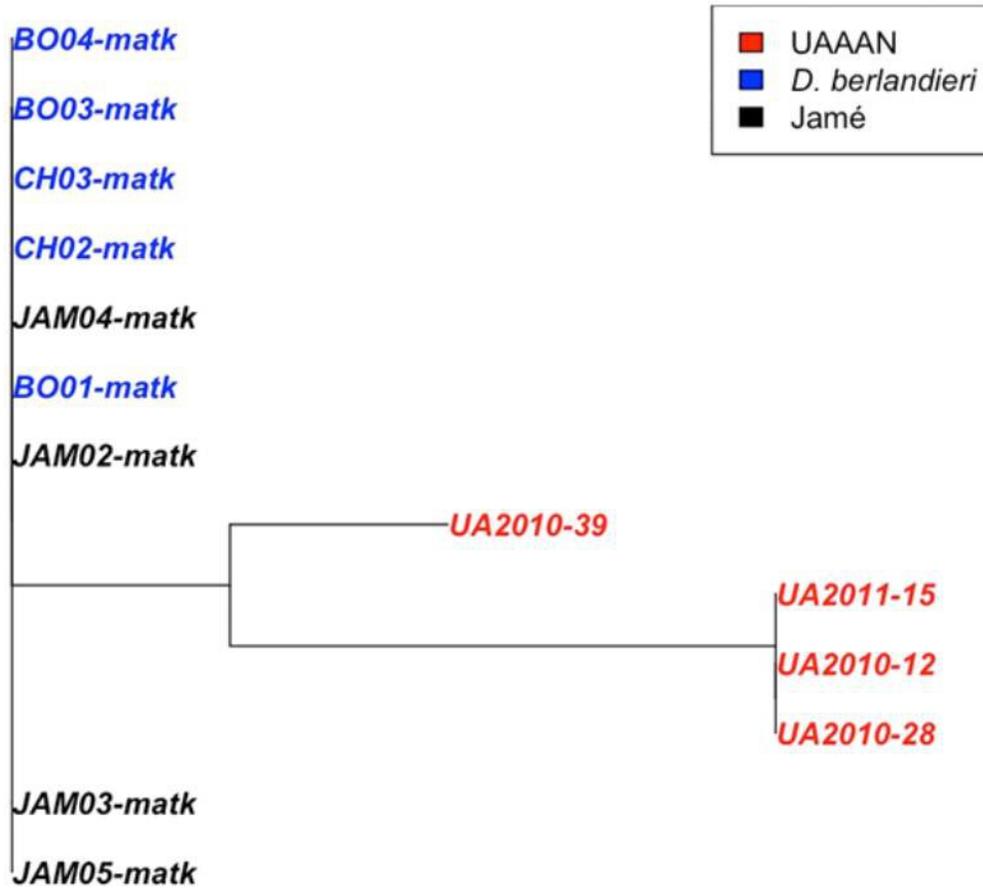


Figura 18. Dendrograma de secuencias *matK* de plantas individuales.



Figura 19. Planta UA2010-39 introducida en Buenavista, Saltillo, Coah. (Foto: D. Mendoza)

Como resultado de la eliminación de la planta UA2010-39 para el análisis con *matK*, se forman únicamente dos grupos (Figura 20), uno en el que se agrupan las plantas de la población de Jamé con las *D. berlandieri* y otro donde se agrupan las *D. cedrosanum*.

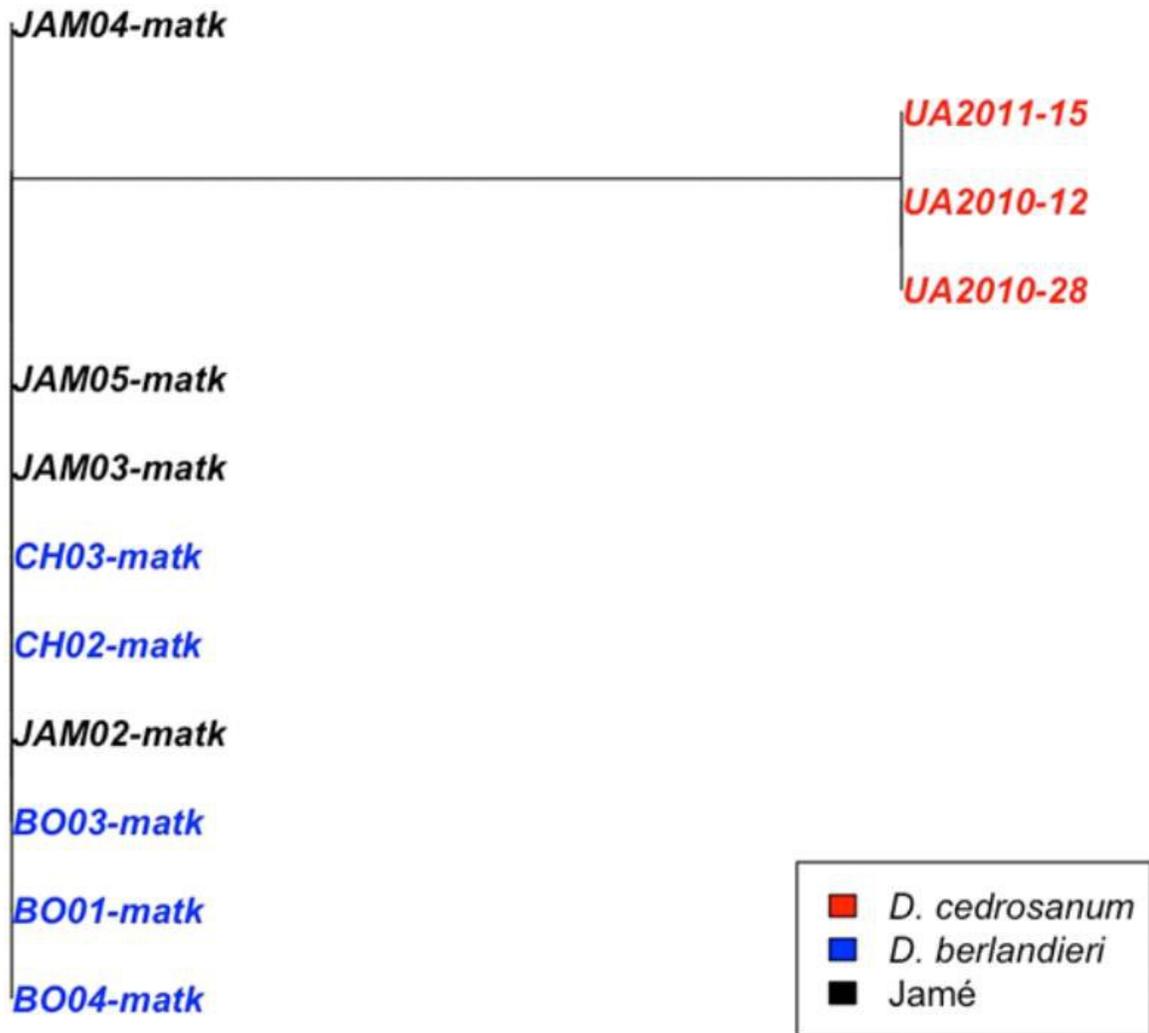


Figura 20. Dendrograma de plantas individuales de la región *matK* sin la planta UA2010-39.

En el dendrograma de la Figura 21 donde se ubica el árbol filogenético a partir de las secuencias consenso de la región *matK* se observa por un lado a *D.*

serratifolium y *D. wheeleri* que se encuentran más cercanos genéticamente, y por otro lado se les ve alejados de los grupos *D. berlandieri* y *D. cedrosanum*. UA2010-39 aparece intermedia entre estas dos especies pero más cercana a *D. berlandieri*, lo que coincide con los análisis arrojados por el marcador *rbcL*.

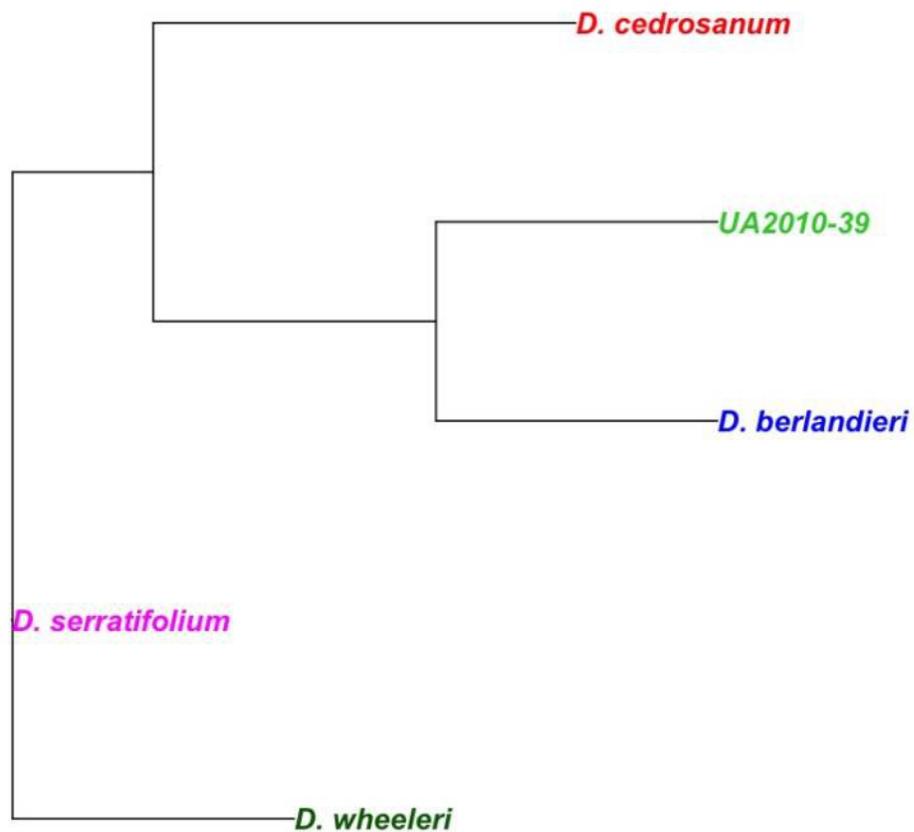


Figura 21. Árbol filogenético a partir de las secuencias consenso de la región *matK* para *D. berlandieri*, *D. cedrosanum* y las secuencias de BOLD con inclusión de UA2010-39.

Con la eliminación de la planta UA2010.39, las especies *D. wheeleri* y *D. serratifolium* siguen permaneciendo cercanas entre sí pero lejanas de *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* (Figura 22). Los grupos se mantienen sin haber diferencias respecto a los resultados obtenidos a través de los dendrogramas anteriores.

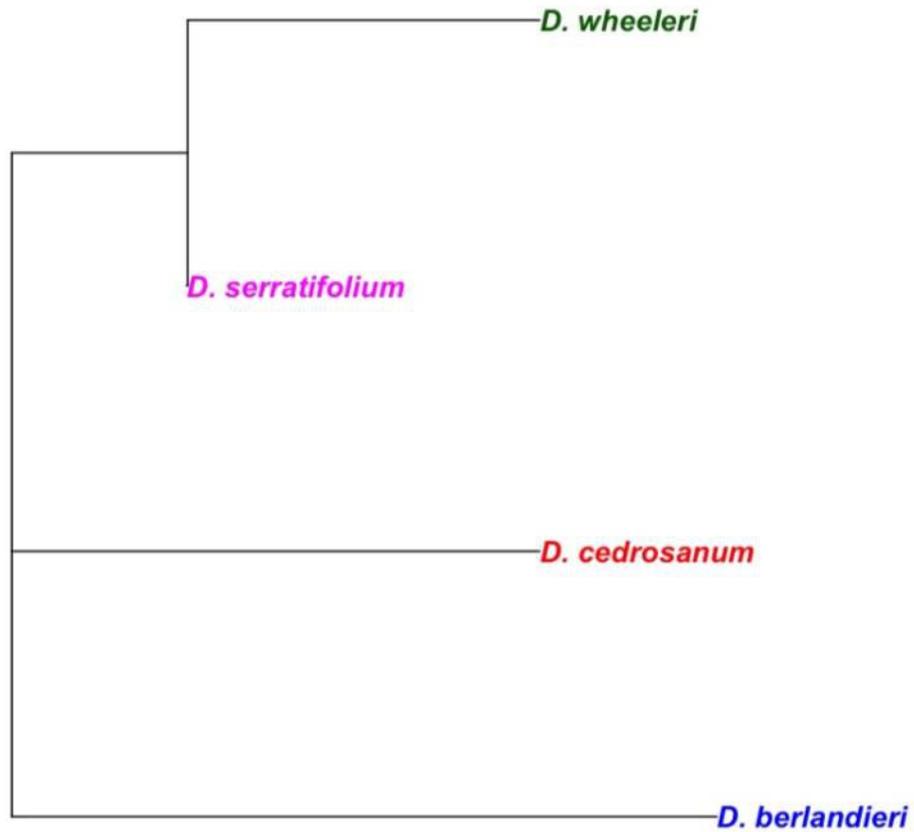


Figura 22. Árbol filogenético a partir de las secuencias consenso de la región *matK* para *D. berlandieri*, *D. cedrosanum* y las secuencias de BOLD sin UA2010-39.

En la Figura 23 se visualiza el árbol filogenético con la inclusión de *Asparagus officinalis* para la región *matK*. Podemos notar lo distinta que es la planta *D. cedrosanum* en comparación con las demás al observar cómo se aleja del resto, al igual que especie control (*A. officinalis*) que se aleja mucho más. Sin embargo *D.*

matK de forma individual. De tal manera que resultados obtenidos de la combinación de ambos genes, aportan básicamente la misma información del dendrograma anterior (Figura 23).

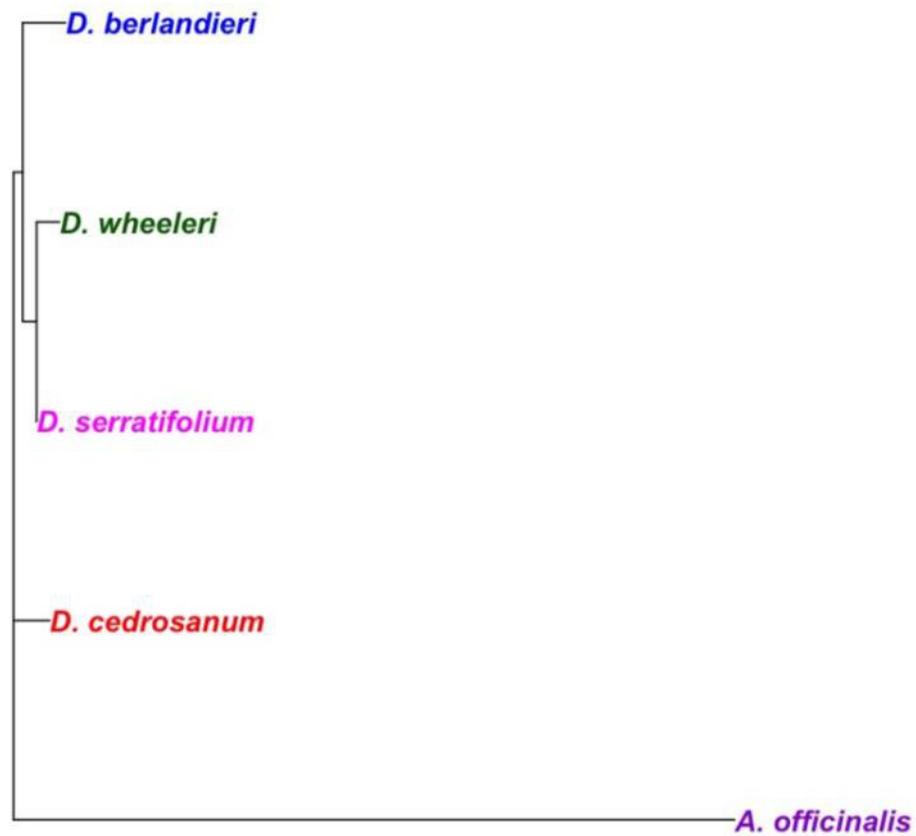


Figura 24. Arbol filogenético con la inclusión de *Asparagus officinalis* para la combinación *rbcL* – *matK*.

Visualización de códigos de barras

En la Figura 25 se puede visualizar el código de barras correspondiente a cada especie, en el cual se pone en evidencia una divergencia de 7 nucleótidos entre *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* para el gen *matK*.

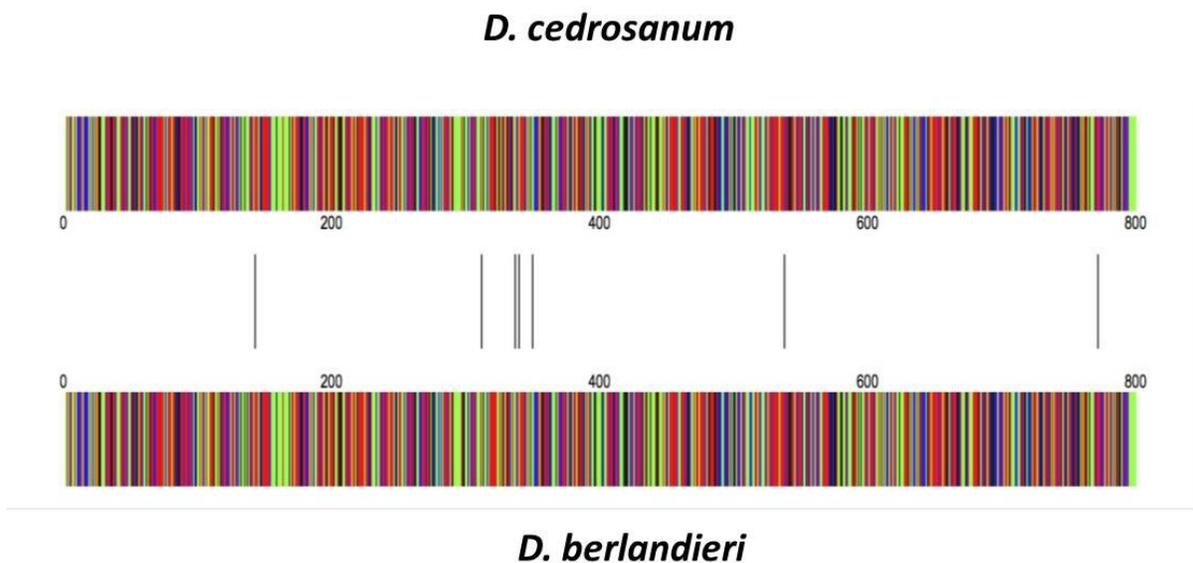


Figura 25. Representación gráfica del código de barras de la vida para *D. cedrosanum* y *D. berlandieri* con el gen *matK*.

El color verde corresponde a la adenina, rojo para timina, negro para guanina y azul para citosina.

Los análisis anteriores arrojan resultados contundentes de que *matK* es la mejor región como código de barras de la vida para el género *Dasyllirion*, ya que en el análisis logró separar con mayor eficacia las especies. Por otro lado se conoce según estudios previos que el gen *rbcL* de manera individual tiene poco poder discriminatorio para identificar individuos a nivel de especie, y en este caso particular, sólo pudo diferenciar entre *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*, y no excluyó la planta introducida en Buenavista (UA2010-39), la cual incluyó en el grupo de *D. berlandieri*.

Tanto para el fragmento de *matK* como para el de *rbcL* la base de datos de BOLD y GenBank tiene secuenciadas únicamente 2 especies de *Dasyllirion*, por lo que el presente estudio representa un avance al contribuir con futuros estudios para el resto de las especies de sotol que menciona la literatura. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren la utilidad de esta combinación de loci para distinguir e identificar especies del género *Dasyllirion*.

V. CONCLUSIONES

1. La técnica de Código de Barras de la Vida con el uso de los genes *matK* y *rbcL* resultó ser eficiente para distinguir entre especies del género *Dasyllirion*, al permitir diferenciar sin ambigüedad entre cuatro de ellas. Además ambas secuencias de genes citoplasmáticos no presentaron diferencias intraespecíficas.
2. La secuencia del gen *matK* mostró mayor poder de discriminación que *rbcL*.
3. Las secuencias del gen *matK* y *rbcL* permitieron identificar la presencia de una planta exótica en Buenavista, Saltillo, Coah.
4. Las secuencias de DNA de la población del puerto de Jamé coinciden con las de *D. berlandieri*.
5. La combinación de las secuencias *rbcL* y *matK* revelaron que las especies *D. wheeleri* y *D. serratifolium* son filogenéticamente cercanas entre si y lejanas de *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*.

VI. BIBLIOGRAFÍA

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

Bogler D. J. 1998. Three New Species of *Dasyilirion* (Nolinaceae) from Mexico and a Clarification of the *D. longissimum* Complex. *Brittonia*, 50(1), 71.
doi:10.2307/2807720

BOLD Systems. 2015. Taxbrowser_Taxonpage @ www.boldsystems.org. (n.d.). Retrieved from http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxon=Dasyilirion+&searchTax=

Cano P. A. , Martínez B. O. U., Berlanga, C. A., Villavicencio G. E. E., Castillo Q. D., Mayorga C. F. J. y Lara G. G. J. 2011. Guía para la evaluación de existencias de sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) en poblaciones naturales del Estado de Coahuila Campo Experimental Saltillo. INIFAP-CIRNE, (43).

Cano P. A. y Martinez B. O. U. 2007. Determinación de áreas potenciales para el establecimiento de plantaciones de sotol (*Dasyliirion cedrosanum* Trel.) en el estado de Coahuila. *INIFAP-CIRNE*, 31, 48. Retrieved from <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/183.pdf>

CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S. y Little, D. P. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794–7. doi:10.1073/pnas.0905845106.

Coello Coutiño, J. 2003. Oportunidades comerciales del sotol (*Dasyliirion* spp.) como alternativa a la producción campesina del Estado de Coahuila”. UAAAN (73 p.). Retrieved from: <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/Unarrow/0218.pdf>

Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis in R. F. Johnston (ed.). *Current Ornithology*, New York: Plenum Press. 159-187.

Crawford, A. J., Paz, A. y Gonzalez, M. 2011. códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/19782/27968>

Cuénoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J. y Chase, M.

W. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *American Journal of Botany*, 89(1), 132–144. <http://doi.org/10.3732/ajb.89.1.132>

Fazekas A. J., Kuzmina M. L., Newmaster S. G. y Hollingsworth P. M. 2012 DNA

Barcoding methods for land plants. En: Kress. W. J., Erickson D. L. (Eds.) DNA Barcodes: Methods and Protocols. (470 pp.). Washington, D.C, USA.

Figuroa Y. L., Cano S. J., Castaño E., Ly A., Arroyo H., Caamal V. J, Sanchez T.

F., López G. R., Briones S. y Rodríguez Z. 2012. Phylogenetic relationships and expression in response to low temperature of a catalase gene in banana (*Musa acuminata* cv. Grand Nain) fruit. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture*. 109(3):429-438.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y DeWaard, J. R. 2003 a. Biological

identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1512), 313–21. doi:10.1098/rspb.2002.2218

Hebert P. D. N., Ratnasingham S. y DeWaard, J.R. 2003 b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc R Soc B Biol Sci 270:S96–9. (doi:10.1098/rsbl.2003.0025)

Henrickson J. y Johnston M. C. 1986. Vegetation and community types of the Chihuahuan Desert. In: Barlow J.C., Powell A.M. and Timmermann B.N. Eds. Second Symposium on Resources of the Chihuahuan Desert Region, United States and Mexico, pp. 20-39. Chihuahuan Desert Research Institute, Alpine.

Henrickson J. y Johnston M.C. 1977. A flora of the chihuahuan desert region. Edition 1.2 vol 2. Los Angeles. U.S.A.

Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual. 2002. Declaratoria general de proteccion de la denominacion de origen “sotol.” Mexico. Retrieved from http://www.wipo.int/wipolex/en/text.jsp?file_id=220963

Kress W. J. y Erickson D. L. 2012. DNA barcodes: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 858, 3–8. doi:10.1007/978-1-61779-591-6_1

Kress W. J. y Erickson D. L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnHpsbA spacer region.

PLoS One, 6:1-10 (modified from Fofana B *et al.* (1997) Belgian Journal of Botany, 129: 118-122).

Levin, R. A., Wagner W. L., Hoch P. C., Nepokroeff M., Pires J. C., Zimmer E. A., y Sytsma K. J. 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast rbcL and ndhF data. *American Journal of Botany*, 90(1), 107–115.
<http://doi.org/10.3732/ajb.90.1.107>

Northwest Association for Biomedical Research and Research National Science Foundation. 2012. Using Bioinformatics: Genetic Research. Retrieved from https://www.nwabr.org/sites/default/files/Genetic_Research_Overview_NWABR.pdf

Rangel S. J. L., Enríquez P. L. y Marshall P. 2005. Taxonomical allocation sampling effort for studying tropical owls. In R. Rodríguez-Estrella (Ed.). *Current Raptor Studies in Mexico*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste and CONABIO. En prensa.

R Core Team. 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. URL: <http://www.R-project.org>.

Rivera M. L. y Solano E. 2012. Flora del Valle de Tehuacan – Ciucatlà (99: 1-68).

UNAM. Retrieved from

http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/F99_Noli_p26.pdf

Sarich V. M. y Wilson A.C. 1973. Generation time and genomic evolution in primates. *Science* Vol 179. pp. 1200-1203

Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K. y Lane, R. 2005.

Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1805–11. doi:10.1098/rstb.2005.1730

Standley, P. C. 1922. Trees and shrubs of Mexico. *Gliricidia*. Contributions from the

U.S. National Herbarium., 23(2), 482–483. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20057002297.html;jsessionid=4009F6C03002C82ACF54F0703B16BBC5>

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources*

Information Network - (GRIN) [Base de Datos en Línea]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.

URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxfam.pl> (27 May 2015)

Villarreal Quintanilla, J. Á. 2001. Flora de Coahuila. UNAM. (138 p.) Retrieved from
<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=k6RkjAuRR2YC&pgis=1>