

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



Evaluación De Nuevos Iniciadores Para Código De Barras De La Vida Con El
Gen *matK* En Seis Asparagaceae De Zonas Áridas.

Por:

MARTÍN REGINO MARTÍNEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO

Evaluación De Nuevos Iniciadores Para Código De Barras De La Vida Con El Gen
matK En Seis Asparagaceae De Zonas Áridas

Por:

MARTÍN REGINO MARTÍNEZ

TESIS

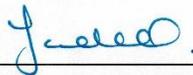
Presentada como requisito parcial para poder obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO EN PRODUCCIÓN

Aprobada por el Comité de Asesoría:



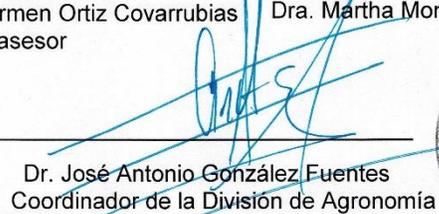
Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés
Asesor Principal



Dra. Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias
Coasesor



Dra. Martha Monzerrath Orozco Sifuentes
Coasesor



Dr. José Antonio González Fuentes
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2021



Declaración de no plagio

El autor es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

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

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo es original.

Pasante


María Regina Meliá

Firma y Nombre

Asesor principal


M. Humberto Reyes Valdés

Firma y Nombre

AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar quiero darle gracias a **DIOS**, por haberme dado la fortaleza de estar aquí hoy, culminando una de mis tantas metas que me he propuesto en la vida que es el de terminar satisfactoriamente mis estudios profesionales y por darme la dicha de haber vivido momentos inolvidables que siempre llevare presente en mi memoria.*

*A mi **ALMA MATER** por haberme abierto sus puertas, y permitirme ser parte de su majestuosa historia; por cobijarme y brindarme las herramientas necesarias para enfrentarme a los retos que me ponga la vida, y por haberme inculcado la profesión más noble y antigua del mundo “la agricultura”, solo espero honrarla con honor y humildad a mi **ALMA TERRA MATER**.*

A cada uno de mis maestros que de alguna manera dejaron su huella en mi vida, gracias por sus enseñanzas y consejos que contribuyeron a mi formación personal, por aportarme sus conocimientos que me servirán para ser un buen profesionalista.

*Al **Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés** por permitirme estar dentro de su equipo de trabajo, por su paciencia otorgada y por enseñarme nuevas cosas en la vida.*

*A la **Dra. Martha Monzerrath Orozco Sifuentes** por apoyarme en todo el tiempo dedicado en la realización de este trabajo de investigación, gracias por esos buenos consejos que de algún modo me sirvieron en este trayecto de vida.*

*A la **LCQ. Dulce Victoria Mendoza Rodríguez**, del Laboratorio de Genomas del Dpto. de Fitomejoramiento por la instrucción y el apoyo recibido durante esta investigación, por tu compromiso para obtener*

siempre buenos resultados. Gracias por tu confianza, por tu comprensión y por ser una gran persona.

*A la **Dra. Yadhira del Carmen Ortiz Covarrubias** gracias por apoyarme y dirigirme en este trabajo de investigación.*

*A los maestros por ayudarme en mi formación académica, por sus consejos y apoyo que muchos me brindaron incondicionalmente, en particular al **Ing. Raúl Gándara Huitrón** y **Ing. Gustavo Alfonso Burciaga Vera** por apoyarnos en todo momento, por ser no solamente un profesor sino también un amigo, tío, abuelo y padrino de generación, por su paciencia hacia mí y mis compañeros amigos de la generación, se les aprecia y se les seguirá apreciando, muchas gracias.*

***Compañeros amigos:** a todos aquellos que se cruzaron en mi camino y que compartieron buenos recuerdos y ratos inolvidables que sé que el día que nos topemos estarán esos recuerdos que compartimos juntos, éxito para todos mis amigos se les desea lo mejor.*

DEDICATORIA

A mis Padres

***MARTIN REGINO HERNANDEZ Y EDITH MARTINEZ CRUZ,** por darme los consejos que ayudaron a forjarme como hombre y como su hijo, gracias por darme los consejos que me guiaron en mi camino, para alcanzar mis metas, y concluir con una faceta de mi vida, que es el de la culminación de mis estudios profesionales. Les agradezco de todo corazón la dicha de brindarme su apoyo incondicional, y por haber creído en mí, gracias a ustedes tengo las herramientas para enfrentarme a la vida, que aunque está llena de obstáculos, ustedes lograron forjarme un camino por el cual debo caminar, sé que el camino es difícil y que está lleno de retos, pero solo le pido a dios que estén conmigo para recorrerlo juntos, pues mis triunfos son*

de ustedes, porque gracias a ustedes soy lo que soy y nunca me olvidaré de las raíces y del lugar de donde vengo , pero sobre todo gracias por darme la vida

A mis Hermanos

*Que desde niños soñamos con ser alguien en la vida, hoy con orgullo podemos decir que ese sueño de niños se ha cumplido, con los que compartí los mejores momentos de mi vida, que aunque la vida nos ha llevado por rumbos diferentes, ustedes también forman parte de mis éxitos, como olvidarme de ustedes si son parte de todo lo que soy ahora, que aunque la vida nos lleve por distintos lugares, siempre tendremos un lugar en común donde nuestros sueños comenzaron a formarse, gracias por todo **DARIO, ARMANDO, MARISOL Y CHRISTIAN.***

A ROSA ISELA CERVANTES REYES POR ESTAR A MI LADO TODOS ESOS AÑOS DE ESTUDIOS JUNTOS Y POR HABERME ENSEÑADO UNA GRAN LECCION DE VIDA QUE JURO JAMAS VOLVER A REPETIRLA, QUE DIOS TE VENDIGA.

RESUMEN

Las zonas áridas y semiáridas de México comprenden unas de las regiones con mayor riqueza de especies vegetales en el mundo. Muchas de estas especies no han sido clasificadas taxonómicamente y esta no es una tarea sencilla. La clasificación molecular con los iniciadores universales del gen de la maturasa K (*matK*) como código de barras de la vida son efectivos en un gran número de plantas, pero pueden no funcionar para todos los géneros. Recientemente, para el género *Dasyllirion*, se diseñó un nuevo par de iniciadores *matK* efectivos para todas las especies evaluadas de este género. La eficacia de estos nuevos iniciadores en otras especies de la familia Asparagaceae, ayudará a caracterizarlas y dará información importante para los programas de conservación de la biodiversidad de flora de zonas áridas y semiáridas de México. El objetivo de este trabajo fue evaluar si estos nuevos iniciadores *matK* diseñados para el género *Dasyllirion*, son útiles en la amplificación del gen *matK* de otras especies de la familia Asparagaceae de zonas áridas. Se colectaron hojas de *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe parviflora*. Se aisló DNA, se evaluó su integridad en gel de agarosa al 1%, y se determinó concentración y pureza en NanoDrop ND-1000. Se amplificó el gen *matK* mediante PCR (kit BioLabs) con los nuevos iniciadores *matK* 335F (TTTCATTCTCGTTGCGATTAG) y *matK* 1327R (ACTTTATTCGATACAAACCCTGTT). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los resultados muestran bandas amplificadas en cada una de las especies evaluadas. El nuevo par de iniciadores especialmente diseñados para *Dasyllirion*, pueden ser utilizados en código de barras de la vida en otras especies de la familia Asparagaceae.

Palabras clave: código de barras de la vida; *matK*; Asparagaceae.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	9
	1.1. Objetivo	10
II.	REVISION DE LITERATURA	11
	2.1. Descripción de las especies	12
	2.2. <i>Nolina cespitifera</i>	12
	2.3. <i>Agave lechuguilla</i>	14
	2.4. <i>Yucca carnerosana</i>	18
	2.5. <i>Manfreda</i>	22
	2.6. <i>Manfreda maculosa</i>	23
	2.7. <i>Hesperaloe funifera Trel</i>	25
	2.8. <i>Agave salmiana</i>	27
	2.9. Clasificación taxonómica de especies.....	30
	2.10. Código de barras de la vida.....	31
III.	MATERIALES Y METODOS	33
	3.1. Localidades de estudio.....	33
	3.2. Material biológico	33
	3.3. Análisis de laboratorio	34
	3.4. Limpieza de muestras	34
	3.5. Aislamiento de DNA	34
	3.6. Análisis de calidad del DNA	35
	3.7. Amplificación con nuevos iniciadores.....	36
	3.8. Condiciones de PCR.....	37
	3.9. Técnica de electroforesis.....	38
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
	4.1. Calidad de DNA.....	39
	4.2. Amplificación con nuevos iniciadores <i>matK</i> 335 F y <i>matK</i> 1327R	42
V.	CONCLUSIONES	44
VI.	LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores <i>matK</i> utilizados para la amplificación.	36
Cuadro 2. Programa del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	37
Cuadro 3. Parámetros de la calidad de DNA.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Nolina cespitifera* Trel. Foto tomada del Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.....14
- Figura 2.** *Agave lechuguilla*. Foto tomada en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN18
- Figura 3.** *Yucca carnerosana* (Trel.) Mc Kelvey. Foto tomada en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.20
- Figura 4.** Municipios donde crece la “palma samandoca”. Fuente: Herbario Nacional Forestal (INIF) “Biól. Luciano Vela” del INIFAP; Matuda y Piña, 1980.....21
- Figura 5.** *Manfreda maculosa*. Foto toma en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” en la UAAAN.....24
- Figura 6.** *Hesperaloe funifera* (Koch) Trel. Foto tomada en el jardín botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.....27
- Figura 7.** *Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick. Foto tomada en el jardín botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.....30
- Figura 8.** Imágenes que muestran las especies de plantas estudiadas. A). *Nolina cespitifera*; B). *Agave lechuguilla*; C). *Yucca carnerosana*; D). *Manfreda maculosa*; E). *Agaves almiñana*; F). *Hesperaloe palviflora*33
- Figura 9.** Gel de agarosa para visualizar la integridad del DNA de las especies *N. cespitifera*, *A. salmiana*, *M. maculosa*, *H. funifera* y *A. lechuguilla*.....40
- Figura 10.** Gel de agarosa para visualizar la integridad del DNA de las especies *A. salmiana*, *Y. carnerosana* y *M. maculosa*.....41
- Figura 11.** Gel de agarosa para visualizar la integridad del DNA en las especies *M. maculosa*, *Y. carnerosana* y *N. cespitifera*.....41
- Figura 12.** PCR de una secuencia parcial del gen *matK* a partir del par de iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R en especies de *Agave salmiana* (AS01 y AS02), *Yucca carnerosana* (YUC01 y YUC03), *Manfreda maculosa* (MAN02 y

MAN03), *Agave lechuguilla* (LEC01 y LEC02) y *Nolina cespitifera* (NOL01 y NOL02), utilizando como control positivo (C+) a *Dasyllirion cedrosanum* (DC).....**42**

I. INTRODUCCIÓN

El Desierto Chihuahuense comprende una de las regiones con mayor riqueza de especies en el mundo (Granados-Sánchez, 2011). Cerca de 6 000 especies vegetales se encuentran ampliamente distribuidas sobre su superficie. Existe una gran variedad de formas y tamaños de plantas, con un alto porcentaje de endemismo (Rzedowsky, 1965). Sin embargo, el proceso de identificación de cada grupo taxonómico que alberga no es una tarea sencilla. Para la clasificación morfológica se requiere contar con la planta completa incluidas las estructuras reproductivas. Con el objetivo de facilitar la clasificación taxonómica se creó el Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL, por sus siglas Consortium the Barcode of Life) que propone secuenciar fragmentos cortos de DNA dentro de regiones estándar del genoma de especies animales, vegetales o microorganismos que en analogía a un código de barras de tipo comercial, sirvan como identificadores universales. El consorcio para el código de barras de la vida (CBOL, 2009), propone secuenciar genes de cloroplasto como *maturasa K (matK)*, la subunidad grande de la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (*rbcL*), *rpoC1* y *tmH-psbA*, entre otros, para identificar plantas terrestres (Jing *et al.*, 2011). Particularmente, el gen *matK* ha dado resultados favorables para discriminar entre un gran número de plantas (CBOL, 2009). Se considera que los iniciadores universales de código de barras de la vida pueden no funcionar para todos los géneros de plantas terrestres (Roy *et al.*, 2010). Por ello algunos investigadores han diseñado iniciadores específicos de ciertas especies de plantas, dentro de regiones conservadas del gen *matK*, que son de utilidad en la identificación de diferentes grupos taxonómicos (Jing *et al.*, 2011). El grupo de trabajo del laboratorio de análisis de genomas de la UAAAN ha diseñado iniciadores *matK* que con éxito ha hecho eficiente el proceso de identificación de plantas del género *Dasyliirion*. El objetivo de esta investigación fue probar si los iniciadores *matK* diseñados para el género *Dasyliirion* son útiles en la amplificación del gen *matK* en otras especies de la misma familia como *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe funifera*.

1.1. Objetivo

Evaluar un nuevo par de iniciadores para la amplificación del gen *matK* en las especies *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe funifera* de la familia Asparagaceae de zonas áridas.

II. REVISION DE LITERATURA

Las zonas áridas y semiáridas de México ocupan más de la mitad del territorio mexicano y tienen una abundante diversidad biológica. Albergan diversos tipos de comunidades arbustivas alternados con pastizales y con algunos manchones aislados de vegetación arbórea. De acuerdo con Rzedowski (1978), reciben el nombre genérico de matorral xerófilo.

Durante miles de años estas áreas conocidas como Aridoamérica fueron habitadas por grupos indígenas aislados y poco numerosos, que practicaban estrategias de subsistencia de bajo impacto ecológico, ya que vivían de la caza y la recolección, con poca actividad agrícola. Sin embargo, la situación cambió radicalmente en los últimos 100 años, pues los matorrales y pastizales xerófilos fueron sometidos a un intenso sobrepastoreo, debido a la introducción del ganado bovino y en especial del ganado caprino (Challenger, 1998).

De manera simultánea se acelera la explotación selectiva de algunas especies de plantas propias del matorral xerófilo tales como la lechuguilla y la candelilla, alterando la estructura y diversidad de sus comunidades. El problema se vio agudizado por la expansión de la agricultura intensiva, altamente tecnificada, en combinación con la ganadería extensiva y el desarrollo progresivo de las actividades mineras (Cervantes, 2005).

La diversidad florística de las comunidades arbustivas de zonas áridas (6 000 especies descritas), poseen un considerable potencial como recursos forestales. Estos recursos naturales ofrecen múltiples alternativas de utilización y pueden ser aprovechados de manera racional y sostenible, para contribuir al mejoramiento de la calidad de vida del sector rural (Cervantes, 2005). Para ello, es necesario tener conocimientos básicos de estas especies a fin de apoyar los programas de conservación y uso sostenible de esta gran biodiversidad de flora de zonas áridas y semiáridas de México.

2.1. Descripción de las especies estudiadas.

A continuación se hace una revisión de cada una de las especies bajo estudio, mencionando aspectos morfológicos, ecológicos, taxonómicos, económicos, culturales, entre otros.

2.2. *Nolina cespitifera*

2.2.1. Descripción botánica

Planta monocotiledónea, arbustiva, perenne acaulescente, cespitosa, sin tallo, crece en grupos aislados, sus hojas son lineares flexibles de 1-1,40 m de longitud, de 5-15 mm de diámetro y aglomeradas hacia el extremo de las ramas o troncos, de color verde claro a verde amarillento. Los márgenes son dentados en su parte lateral. Su inflorescencia es rígida, corta, de 0,3-0,8m de largo, en forma de panícula ramosa terminal; con numerosas ramificaciones de color verde a café oscuro, de tamaño igual o un poco menor al tamaño de sus hojas. Sus flores son pequeñas, de color rosa y están dispuestas en panículas amplias con sépalos ovals y redondeados de 2,5-3,5 cm de largo. La floración ocurre de abril a junio y su época de fructificación comprende parte del verano y otoño, iniciando en junio, y se extiende hasta septiembre. Las semillas son ovoides, de 3-4 mm de diámetro y de color marrón (Castillo y Sáenz, 1993; Zamora et al., 2010; Fhnavajoir, 2014).

2.2.2. Taxonomía

La primera descripción del género *Nolina* fue realizada en 1803 por Michaux A. (1803). El nombre botánico honra al francés Abbé P.C. Nolin, co-autor de *Essai sur l'Agriculture Moderne* (Nolin y Blavet, 1755; Lexicon, 2014; Tropicos, 2014). La primera descripción de *N. cespitifera* fue realizada por William Trelease (1911) y su clasificación taxonómica es la siguiente (Tropicos, 2014):

Clase.....*Equisetopsida C. Agardh,*
Subclase..... *Magnoliidae Novák ex Takht.*
Superorden.....*Lilianae Takht.*
Orden.....*Asparagales*
Familia.....*Asparagaceae.*
Género.....*Nolina Michx.*
Especie.....*Nolina cespitifera Trel.*

2.2.3. Usos y aprovechamiento

El cortadillo como comúnmente se le llama a *Nolina cespitifera Trel.* (sub-familia Nolinaceae), es un término asociado a la forma aserradas o dentada de sus hojas en su parte lateral y que suele ocasionar lesiones en las manos del recolector de la materia prima (Castillo y Sáenz, 1992). El género tiene entre 17 a 20 especies reportadas en México (Standley, 1920; García y Galván, 1995). E un recurso forestal no maderable de suma importancia económica y con gran potencial industrial para el noreste del país. En la actualidad, la región sur del estado de Coahuila es la más importante con respecto a las áreas de distribución y de explotación. El aprovechamiento lo realizan alrededor de 3 000 familias campesinas de 37 predios, ubicados en los municipios de Saltillo, General Cepeda y Parras de la Fuente (Castillo y Sáenz, 1993).

De esta planta se obtiene una fibra de alta resistencia, que mezclada con sorgo escobero, se utiliza en la fabricación de escobas, cepillos y en la confección de muebles rústicos en sustitución del ratán; además, se emplea también en la elaboración de discos para barredoras mecánicas y cartuchos de explosivos (Castillo y Sáenz, 1993; SEMARNAT, 2003).



Figura 1. *Nolina cespitifera* Trel. Foto tomada del Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.

2.3. *Agave lechuguilla*

2.3.1 Descripción botánica

La lechuguilla (*Agave lechuguilla*) es una planta perenne, pequeña, con hojas dispuestas en forma de rosetas; de 30 a 50 cm de alto y 40 a 60 cm de ancho, flores amarillas o rojizas. Las hojas generalmente de 25- 50 cm de largo por 2.5- 4 cm de ancho, lanceoladas–lineales, de color verde ligero a amarillo–verdoso, en su mayoría ascendentes a erectas, algunas veces falcadamente, la parte apical cóncava, y profundamente convexa en la base, algunas veces con manchas verdosas, rígidas, el margen continuo y recto, de color café ligero a

gris, fácilmente desprendible cuando la hoja está seca. Al margen de la hoja presenta dientes típicamente curvos, de 2–5 mm de largo, café o en su mayor parte gris, de 1.5–3 cm de separado, y de 8-20 cm. La espina en el ápice de la hoja fuertemente cónica a subulada, de 1.5–4 cm de largo, grisácea, la ranura corta encima de la base, abierta o cerrada. La inflorescencia, es un escapo de 2.5–3.5 m de altura, por lo general glauco, las flores cortas pediceladas en pares o tercios, rara vez en longitud de 2–15 cm, panículas con muchas o pocas flores laterales ascendentes. Las flores de 30–45 mm de largo, amarillas o por lo común teñidas de colores rojos o púrpura; Ovario de 15 a 22 mm de largo, fusiforme, redondamente angulado, estrecho en el cuello; tubo de 2.5–4 mm de largo, poco profundo, abierto. Tiene tépalos desiguales, lineales, de 13–20 mm de largo ascendentes, involutos alrededor de los filamentos, los exteriores sobre bordes y en el interior de la base, gruesamente encapuchado; Filamentos de 25–40 mm de largo, extendidos. Las anteras de 15–20 mm de largo. Los frutos son una cápsula dehiscente oblonga o piriforme color café o negra, de 18–25 mm de largo y 11–18 mm de ancho, corta pedicelada o sésil, redonda y con un corto pico en el ápice, glauca. Las semillas de 4.5–6 mm de largo y 3.5–4.5 mm de ancho con un pequeño hilo o muesca y pocas estrías aladas al rededor del lado curvo.

2.3.2. Taxonomía

Reino..... Plantae

División..... *Magnoliophyta*

Clase..... *Liliopsida*

Subclase..... *Liliidae*

Orden..... *Asparagales*

Familia..... *Asparagaceae*

Subfamilia..... *Agavoideae*

Género..... *Agave*

Especie..... *Agave lechuguilla*

2.3.3. Distribución de la especie

El nombre científico de la lechuguilla es *Agave lechuguilla Torr.* (Reyes et al., 2000). Esta especie se encuentra dentro del Desierto Chihuahuense de clima semiárido donde existe muy poca humedad. La precipitación varía de 150 a 400 mm anuales, no obstante esta especie puede resistir períodos de sequía de varios años consecutivos, así como inundaciones. La lechuguilla crece favorablemente en temperaturas que van desde los 30 °C hasta -3 °C y en un extremo de -8 a 44 °C. Se desarrolla en laderas y partes altas de sierras y lomeríos pedregosos de origen calizo, en montañas con inclinaciones y bajadas, en ocasiones en superficies planas y con un drenaje moderado (Berlanga *et al.*, 1992; Gentry, 1982; Reyes et al., 2004).

Geográficamente se ubica en una superficie de 100 000 km², abunda desde Texas y Nuevo México, en los Estados Unidos, hasta Querétaro, Hidalgo y Guanajuato en México. Esta planta es un elemento característico de las provincias de la altiplanicie de México y planicie del noreste y de la región xerofítica mexicana. Forma parte del matorral desértico rosetófilo o crasirosulifolio espinoso, donde la lechuguilla es el elemento dominante y es la especie que le da la fisonomía a este tipo de vegetación; no obstante, también se puede localizar en el matorral desértico micrófilo o matorral inerme parvifolio en menor densidad (Berlanga et al., 1992; Nobel, 1988 y Rzedowski, 1978).

2.3.4. Usos y aprovechamiento

La fibra de lechuguilla tienen significativas propiedades físico mecánicas tal como su resistencia a la tensión (Juárez y Rodríguez, 2004). Por lo que es

empleada en la industria automotriz, cordelería, aseo de edificios, bajo alfombras, etc. El residuo final o guishe después de la obtención del ixtle de la lechuguilla se trata de integrar y dar uso ya que tiene bastantes cualidades para ser empleado en laminados, aglomerados, cartón, papel filtro, esteroides, etc. (Berlanga et al., 1992).

Hernández et al. (2005) señalan que además de la obtención de ixtle, la extracción de saponinas presentes en la planta es de importancia debido a las diversas propiedades farmacológicas que éstas poseen. Así se evitan los diversos efectos nocivos que el consumo de residuos de lechuguilla origina en animales domésticos como las ovejas, cabras y conejos. Por su parte Márquez et al., (1996) señalan que existe la posibilidad de obtener celulosa de la fibra de lechuguilla ya que contiene cantidades considerables de celulosa, lignina y hemicelulosa. Con ello se aprovecha casi en su totalidad esta materia prima y se reduce la contaminación ecológica originada por el aprovechamiento del ixtle.

2.3.4. Producción y comercialización

La fibra que es el producto comercial más aprovechado tiene una producción media de 21.2 gr de fibra seca por planta por año aproximadamente, lo que equivale a una producción de 424 kg de fibra por hectárea (Berlanga et al., 1992). Sin embargo, con el establecimiento y manejo de plantaciones es posible reducir el turno técnico de aprovechamiento y cosechar cada siete meses (Castillo et al., 2008).

Se ha demostrado que los incrementos en la disponibilidad de agua y nutrientes al suelo estimulan el crecimiento de las plantas (Chapin, 1980; Hunt y Nicholls, 1986).



Figura 2. *Agave lechuguilla*. Foto tomada en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.

2.4. *Yucca carnerosana*

2.4.1. Descripción botánica

Los nombres comunes de la *Yucca carnerosana* son: palma carnerosana, palma barreta, palma loca, palma pita. Planta perenne caulescente, simétrica, de crecimiento extremadamente lento y de porte arbustivo o arborescente. Generalmente se distribuye en forma individual, rara vez se le observa formando densas agrupaciones de varios troncos de diferente tamaño, unidos en su base. Tronco grueso y escamoso con diámetro de 15 a 40 cm y altura promedio de 3.0 m, en ocasiones alcanza más de 10 m; raras veces se ramifica una o dos veces en su parte superior. Hojas de color verde azulado, rígidas de forma cóncavo convexa y se agrupan hacia el extremo del tallo, de 50-100 cm de largo x 5-7.5 cm de ancho y terminan en punta con una fuerte espina de 0.95 a 1.30 cm. Las hojas forman densas cabezuelas o rosetas consistentes y simétricas con un diámetro proporcional a su altura. El escapo floral crece en la parte central de la

roseta, es grande y grueso, sobresale por completo del follaje. El escapo se ramifica presentado de 15 a 30 pedicelos con brácteas blancas. Flores campanuladas o globosas con 6 tépalos (3 pétalos y 3 sépalos). Estambres libres y se insertan en la base de los segmentos, las anteras y el pistilo miden 48-63 mm de largo; ovario súpero trilocular 6-9 mm de diámetro. Flor perfumada de color blanco. Fruto indehiscente (abayado) carnosos de 5-7.5 cm de largo x 4 cm de diámetro. Semillas gruesas planas semirredondas color negro con gran cantidad de endospermo de 7 a 100 mm de diámetro.

2.4.2. Taxonomía

Reino.....*Plantae*

División.....*Magnoliophyta*

Clase.....*Liliopsida*

Subclase.....*Liliidae*

Orden.....*Asparagales*

Familia.....*Asparagaceae*

Subfamilia.....*Agavoideae*

Género.....*Yucca*

Especie.....*Yucca carnerosana (Trel.) McKelvey*

2.4.3. Distribución de la especie

Se distribuye al sur de Coahuila en los municipios de Saltillo y Arteaga, Sierra de Parras y General Cepeda, Sierra de la Paila en Ramos Arizpe y Municipios de Ocampo y Cuatro Ciénegas, Coahuila; Aldama y Ojinaga, Chihuahua; Arramberri, Dr. Arroyo, Mier y Noriega, Villa García y Galeana, Nuevo León; Cárdenas, Cedral, Guadalcázar, Guadalupe, Matehuala, Real del Catorce, Charcas, Villa de la Paz, Vanegas, San Luis Potosí; Miquihuana Bustamante,

Tula y Jaumave, Tamaulipas; San Salvador, Mazapil, Melchor Ocampo y Concepción del Oro, Zacatecas.

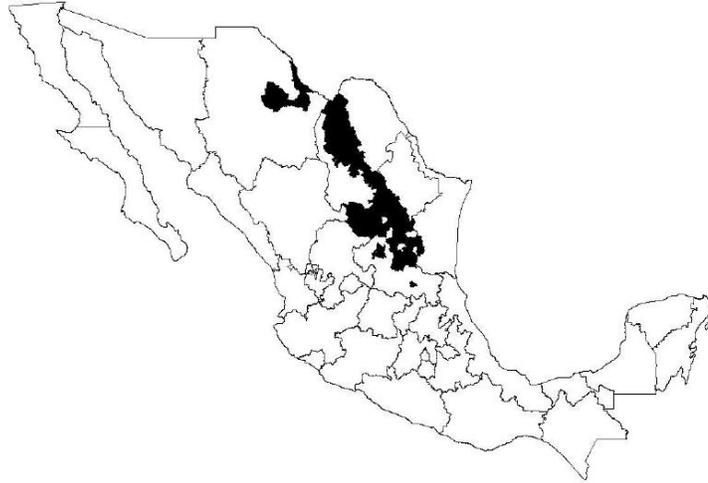


Figura 3. Municipios donde crece la “palma samandoca”. Fuente: Herbario Nacional Forestal (INIF) “Biól. Luciano Vela” del INIFAP; Matuda y Piña, 1980.

2.4.4. Hábitat

El tipo de vegetación que caracteriza su distribución es el matorral desértico rosetófito-lzotal. Las poblaciones naturales se desarrollan en abanicos aluviales de sierras calizas, encontrándose en laderas, cerros, lomeríos de suelos someros pedregosos bien drenados; en un intervalo altitudinal de 1,000 a 2,200 msnm. En las partes menos altas puede estar mezclada con *Yucca filifera*, formando parte del matorral desértico rosetófilo y microfilo; mientras que en mayores elevaciones, se intercalan algunos individuos sin formar manchones densos, como parte del bosque de Pinus-Quercus (Matuda y Piña, 1980; Villavicencio, 1993).



Figura 4. *Yucca carnerosana* (Trel.) Mc Kelvey. Foto tomada en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.

2.4.5. Usos y aprovechamiento

Textil, de las hojas tiernas o “cogollos” se extrae fibra (“ixtle de palma”) con la cual se produce hilo o tela de diferente calibre y resistencia, para la manufactura de sacos, mantas y forros para empaque; así como cordeles de diferentes dimensiones (Villavicencio, 1994). Se recolecta durante todo el año; sin embargo, esta actividad es más común antes de la época de lluvias.

Es una actividad tradicional en las comunidades ixtleras, en donde los productores cortan, cuecen y tallan los cogollos de las plantas para obtener una fibra dura o ixtle, de mejor calidad que la que se obtiene de otras especies no maderables. El método de aprovechamiento consiste en seleccionar en campo los cogollos que presenten una altura mayor a 20 cm.

2.4.6. Productividad

El ixtle o fibra que se obtiene se seca a temperatura ambiente, operación que se realiza extendiendo las fibras en capas sobre el suelo. Los tercios secos se embalan en manojos formando pacas de diversas dimensiones, las más comunes son de 90 × 80 × 100cm, mismas que se llevan al centro de acopio para su venta (Villavicencio, 1993). La productividad del recurso depende del número de cogollos aprovechables que puedan cortarse en una jornada de trabajo. De poblaciones naturales se recolectan entre 300 y 400 cogollos / día, para obtener de 30 a 50 kg de fibra seca de palma samandoca.

2.5. Manfreda

2.5.1 Importancia biológica y usos del género Manfreda

Las Manfredas son plantas conocidas comúnmente con el nombre de “amole” o “amolii”. El género Manfreda es una planta endémica de América y se distribuye desde el sureste de Estados Unidos de América hasta el norte de Nicaragua. México es el centro de diversidad del mismo. De las 28 especies reconocidas en la actualidad, 21 (75%) son endémicas de la república Mexicana, la mayoría consideradas como microendemismos (Ayala, 2006). Únicamente cinco especies se comparten con Estados Unidos de América: *Manfreda longiflora*, *M. maculosa*, *M. sileri*, *M. variegata* y *M. virginica*.

Por otro lado, las Manfredas son plantas útiles como ornamentales y otras son empleadas como sustitutas del jabón. Este último uso se relaciona con su alta concentración de sapogeninas. Estas sustancias convertidas en saponinas se mezclan con el agua y adquieren la propiedad de romper la tensión superficial y producen gran cantidad de espuma (Font-Quer, 1979; Nobel, 1998).

Además, los cormos de estas plantas son remedios contra cólicos, dispepsia y actúan como tónico, carminativo, antiespasmódico y estomático; algunos de

estos usos han ido desapareciendo con el paso del tiempo (Gattienger, 1894; Taylor, 1940; Jacobs y Burlage, 1958; Verhoek-Williamms, 1975).

2.6. *Manfreda maculosa*

2.6.1. Descripción botánica

Es una planta herbácea, perenne. Cormo de 3.5-5.0 cm de largo, 1.5-2.0 cm de diámetro, succulento, raíces contráctiles, carnosas con ramificaciones filiformes. Bulbo de 1.8-5.5 cm de largo, 1-2 cm de diámetro, cubierto por los restos basales de las hojas secas, éstas de (1.8-) 3.5-7.0 cm de largo, membranáceas. Hojas 4 a 6, de 10-26 cm de largo, 1.0-2.5 cm de ancho, lanceoladas a angostamente elípticas, succulentas, ligeramente acanaladas, recurvadas erectas a semierectas, verde-claras a glaucas con abundantes maculas purpura sobre la superficie adaxial, margen dentado, dientes cartilagosos, grandes, deltoides o truncados, bipartidos con una banda hialina entre ellos, separados de 0.3-0.7 cm; ápice agudo, suave. Inflorescencia de (30-) 60-130 cm de largo, erecta, rojiza a verdosa con tintes purpúreos, porción fértil de 7-27 cm de largo, laxa, con 7-33 flores; brácteas del eje de la inflorescencia 6-7, con la base truncada, las inferiores linear lanceoladas, las superiores deltoides, la tercera bráctea basal de 1.5-4.0 cm de largo, 0.4-0.9 cm de ancho, verde-grisáceas; brácteas florales de 0.7-1.2 cm de largo, 0.3-1.5 cm de ancho. Flores de 2.5-3.6 cm de largo, difusas a ascendentes, sésiles, blanco-rosadas, a rosado-rojizas, semisucculentas, infundibuliformes; tubo del perianto de 1.2-2.1 cm de largo, 0.4-0.5 cm de ancho, sin constricción en el ápice del ovario; segmentos de 1.1-1.6 cm de largo, 0.3-0.4 cm de ancho, oblongos, extendidos, involutos, ápice obtuso, con un mechón de tricomas blancos; filamentos de 1.0-1.8 (-2.4) cm de largo, que exceden al tubo por 0.8-1.6 (-2.2) cm, insertos casi en la boca del tubo, dispuestos en un mismo nivel, erectos en anthesis, blanco-amarillentos; anteras de 0.6-1.0 cm de largo, 0.1 mm de ancho, amarillas; ovario de 0.8-1.0 cm de largo, 0.3-0.4 cm de diámetro, elipsoide, sin prolongarse hacia dentro del tubo; estilo de 3.6-4.0 cm de largo, exserto, estigma trilobado, verde-amarillento.

Fruto capsular de 1.1-2.0 (-2.4) cm de largo, 1.0-1.5 cm de diámetro, elipsoidea subcilíndrico, ápice apiculado. Semillas de 4-5 mm de largo, 3-4 mm de ancho, deltoides, plano-cóncavas, con un borde angosto, negras, lustrosas.

2.6.2. Taxonomía

Reino.....*Plantae*

División.....*Magnoliophyta*

Clase.....*Liliopsida*

Subclase.....*Liliidae*

Orden.....*Asparagales*

Familia.....*Asparagaceae*

Subfamilia.....*Agavoideae*

Género.....*Manfreda*

Especies.....*Manfreda maculosa*



Figura 5. *Manfreda maculosa*. Foto toma en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” en la UAAAN.

2.6.3. Distribución de la especie

Manfreda maculosa se distribuye en los Estados Unidos de América, particularmente en la región sureste de Texas y en México en los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas. Crece en altitudes de 40-400 m, forma parte de matorrales xerófilos, bosques espinosos; prospera en zonas abiertas con suelos arcillosos, pendientes pronunciadas, lomas pedregosas secas y en llanuras o praderas arcillo-arenosas, requiere de plantas nodrizas como Acacia y Larrea. Florece de mayo a julio y fructifica de finales de julio a agosto.

2.7. *Hesperaloe funifera* Trel.

2.7.1. Descripción botánica

Desde el punto de vista morfológico *Hesperaloe funifera* es una planta arbustiva de la familia Agavaceae con una altura de hasta 80 cm de altura y 1,0 a 1,2 m de ancho, con hojas largas de hasta 5 cm de ancho y 2 a 3 cm. Sus plantas tienen tallos rara vez visibles, aunque se encuentran tejidos de éste en la base de las plantas, raíces dispuestas radialmente, muy fibrosas, con rosetas acaules, compuestas de hojas densa o lasamente dispuestas, rizomatosas, característica más prominente en *H. parviflora*, hojas duras, rígidas, en general rectas, rara vez ligeramente arqueadas, con margen foliar liso, y abundantes fibras marginales, ápice no espinoso, pero agudo, de color verde oscuro a amarillo-verde brillante, flores con seis tépalos, en general de la misma longitud, y cercanamente la misma anchura, libres o levemente unidos en la base, en general recurvados cerca del ápice, perigonio campanulado o casi, con colores que varían del blanco a dos tonos, con un rosa a rojo exterior, y rosa, blanco, crema o amarillo en el interior, fruto en cápsula con numerosas semillas planas de color negro (Solis, 2012).

Hesperaloe es un género de América del Norte que consta de seis taxones. Cuatro taxones lugar en el lado oriental de la Sierra Madre Occidental, desde Texas hasta San Luis Potosí, México, mientras que los otros dos taxones se

producen en el lado occidental de la Sierra Madre Occidental, en Sonora, México. La planta de *Hesperaloe funifera* se caracteriza en términos de su contenido de holocelulosa, α -celulosa y lignina (74, 1, 52.3 y 7,9%, respectivamente).

2.7.2. Taxonomía

Reino..... *Plantae*

Subreino.....*Tracheobionta*

Superdivision.....*Spermatophyta*

División.....*Magnoliophyta*

Clase.....*Liliopsida*

Orden.....*Asparagales*

Familia.....*Asparagaceae*

Género.....*Hesperaloe*

Especies.....*Hesperaloe funifera (Lem.) Trel.*

2.7.3. Importancia y usos

La planta produce fibras fuertes que se pueden utilizar en la fabricación de productos de cordelería. Las fibras de producir un papel con tracción excepcional y resistencia al desgarro. Tales fibras se podría utilizar ya sea en papeles especiales con requisitos de alta resistencia, tales como papeles, papeles moneda biblia, bolsas de té, y los filtros, o pueden ser mezclados con otras fibras para aumentar la resistencia y mejorar la textura de una variedad de papel productos, incluidos los papeles de escritura, tejidos y productos de toalla y papeles fabricados usando secundaria (reciclado) fibra (Solis, 2012).

Los estudios previos de floración de esta planta sugieren que la eliminación de los tallos florales en desarrollo debería desviar la energía para la producción de hojas, aumentando el rendimiento de fibra y reducir los costos unitarios de producción. La producción de hojas de plantas de biomasa y las tasas relativas de crecimiento aumentó significativamente con la eliminación flor-tallo. El tamaño de la planta promedio fue 27% mayor en las parcelas de los tallos florales que se eliminaron. (Tucson, 1955).



Figura 6. *Hesperaloe funifera* (Koch) Trel. Foto tomada en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.

2.8. *Agave salmiana*

Agave salmiana es una especie endémica de México. Crece como planta silvestre en los estados del centro de México (Durango, Hidalgo, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí). Es una especie protegida por su importancia económica (NOM-059-SEMARNAT-2010). También es cultivada y su distribución es más amplia, desde Coahuila y Nuevo León hasta Chiapas. En Chiapas se observó en los municipios de Venustiano Carranza y Comitán de Domínguez, creciendo como planta cultivada a la orilla de las milpas, bordeando los huertos familiares, o bien, a lo largo de caminos, preferentemente en altitudes de 2,254 y 2,265 m. (Agroproductividad, 2012)

2.8.1. Descripción Botánica

Pertenece al grupo *Salmianae* propuesto por Gentry (1982), y se reconoce por la siguiente combinación de caracteres morfológicos: Rosetas 1.5-2.8 m de alto, 2-5 m diámetro. Hojas 1-2.2 m de largo, 20-35 cm de ancho, ampliamente lanceoladas u oblanceoladas, verde claro, verde-amarillento o verde glauco, margen recto, repando o crenado; mamilas inconspicuas a algo prominentes hacia la parte media, dentado, dientes en la parte media de 0.5-2 cm de largo, 1-2 cm de ancho, rectos o algo recurvados; espina terminal 4-8 cm de largo. Inflorescencia paniculada, laxa, 5-9 m alto, contorno general piramidal, fértil en el tercio o el cuarto superior, ramas primarias hasta 1 m largo; pedúnculo verdoso, brácteas del pedúnculo 25-45 cm largo, base 10-18 cm ancho, carnosas e imbricadas o coriáceas y separadas, deltoides, margen entero o con algunos dientecillos menores de 1 mm de largo, espina 0.5-3 cm largo. Flores 6-9 (-11) cm largo, infundibuliformes, amarillentas; tépalos 2-3 cm largo, oblongos, ápice curvado hacia adentro en anthesis, gruesos, los internos aquillados, tubo del perigonio 2-2.5 cm largo, ovario 3-5(-6) cm largo, cuello 5-10 mm; estambres con filamentos 5-8 cm largo, insertos en la parte media, cuarto superior o en la boca del tubo. Cápsulas 6-7 cm largo, 2-3 cm ancho; semillas 7-9 mm largo, 5-7 mm ancho, negras. La floración es de marzo a julio. El desarrollo de la inflorescencia se inicia en octubre o noviembre del año anterior. La fructificación a partir de noviembre.

Gentry (1982) reconoce cuatro categorías intraespecíficas de *Agave salmiana*. La especie cultivada en Chiapas se puede asignar tentativamente como *Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck subsp. salmiana*. García-Mendoza (2011) menciona que el nombre de la subespecie típica se aplica principalmente a las plantas cultivadas grandes o asilvestradas que se explotan para la producción de pulque o la obtención de fibras duras. La gran plasticidad morfológica que presenta la especie es producto de la domesticación por miles de años. Se han observado plantas de características morfológicas intermedias que corresponden posiblemente a híbridos entre *Agave salmiana* y *Agave americana*. Esto puede

ocurrir dada la cercanía de las plantas, aunque aparentemente la época de floración es diferente en las dos especies. (Agroproductividad, 2012)

2.8.2. Taxonomía

Reino.....*Plantae*

Clase.....*Liliopsida*

Subclase.....*Liliidae*

Orden.....*Asparagales*

Familia.....*Asparagaceae*

Subfamilia.....*Agavoideae*

Género.....*Agave*

Especie.....*Agave salmiana Otto EX Salm-Dyck*

2.8.3. Usos.

Se utiliza principalmente para producir aguamiel y pulque; como cerco vivo para delimitar terrenos y huertos; las inflorescencias ocasionalmente se aprovechan como forraje y el pedúnculo seco o quiote para construcción (techos, paredes y cercos).



Figura 7. *Agave salmiana* Otto ex. Salm-Dick. Foto tomada en el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la UAAAN.

2.9. Clasificación taxonómica 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 clasificación de seres vivos implica contar con una adecuada identificación para lo cual se emplea el uso de rasgos singulares que permitan separar o diferenciar una especie de otra. Por ejemplo, los caracteres morfológicos son los más usados para diferenciar entre especies y predominan las estructuras reproductivas como flores, frutos y semillas. Otro tipo de caracteres comúnmente usados son los bioquímicos que son las sustancias químicas presentes en los seres vivos. Ejemplos de este tipo de caracteres son las sustancias que producen los colores y sabores en flores y frutos, las sustancias que son tóxicas o que tienen posibles beneficios en el ámbito curativo (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 puede ser difícil e incluso

puede no aplicarse debido a la plasticidad fenotípica, su origen y dimorfismo sexual. Es por esto que 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 (Paz *et al.*, 2011).

2.10. Código de barras de la vida.

El proyecto del código de barras de la vida nace en la universidad de Guelph, Canadá y propone secuenciar fragmentos cortos de DNA dentro de regiones estándar del genoma que, en analogía a un código de barras de uso comercial, sirvan como identificadores universales para cada organismo viviente (animales, vegetales etc.). Esta iniciativa no pretende sustituir la taxonomía alfa, la cual se basa en la descripción, identificación y clasificación de la biodiversidad, utilizando un organismo como unidad de trabajo, sino facilitar la tarea de identificación de especies, revitalizar las colecciones biológicas y acelerar el inventario de la biodiversidad (Herbert y Gregory, 2005).

El código de barras de la vida además de ser útil en la identificación es auxiliar en la revisión de clasificaciones taxonómicas dudosas, en el control de tráfico ilegal de especies en peligro de extinción, en el análisis de dieta de diferentes animales a partir de su contenido estomacal o de sus heces y en el descubrimiento de nuevas especies (Janzen *et al.*, 2011).

Para poner en marcha este proyecto se creó el consorcio de Barcode of Life en el National Museum of Natural History, Washington DC, USA y el CBOL en el 2004, cuya función es igual a la de una biblioteca universal, que relaciona cada barcode o “secuencia de DNA diagnostica” con especies de referencia o “vouchers” asignados a nombres de la clasificación linnneana, depositados en instituciones científicas (Lanteri, 2007). La metodología de código de barras de DNA se propuso inicialmente para identificar animales a partir de un fragmento del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI), de aproximadamente 648 pares de bases (pb). Esta región presenta una alta tasa de sustitución entre especies del mismo género (Hebert *et al.*, 2003). Sin

embargo, para plantas no es utilizable ya que la tasa de sustitución es muy baja a diferencia de animales, lo cual se traduce en la ausencia de variación a nivel de secuencia entre especies del mismo género (Paz *et al.*, 2011). La búsqueda de secuencias útiles en la obtención de código de barras en plantas terrestres, se enfocó en regiones del genoma nuclear y de cloroplasto, pero muy pocas son efectivas de manera individual, ya que no presentan suficiente variación. Por este motivo, la CBOL sugiere la combinación de dos regiones plásticas: *matK* y *rbcL*, ambas regiones de aproximadamente 800 pb y que han sido ampliamente utilizadas en estudios de filogenia (Janzen, 2009; Jing *et al.*, 2011; Paz *et al.*, 2011).

El gen *matK* del genoma de cloroplasto ha dado resultados favorables para discriminar entre un gran número de plantas (CBOL, 2009). Sin embargo, se considera que los iniciadores universales de código de barras de la vida pueden no funcionar para todos los géneros de plantas terrestres (Roy *et al.*, 2010).

Específicamente, en el género de *Dasyllirion* el uso de los iniciadores universales para secuenciar segmentos del gen *matK* resultaron inconvenientes ya que generaron bandas de tipo secundario y segmentos de mala calidad (Orozco-Sifuentes *et al.*, 2019). Por lo tanto, nuestro grupo de trabajo ha diseñado iniciadores *matK* que con éxito ha hecho eficiente el proceso de identificación de plantas del género *Dasyllirion*. Estos iniciadores exitosos para *Dasyllirion*, pueden ser exitosos también para la amplificación de la región *matK* de otras especies que cohabitan las mismas regiones medioambientales y que pertenecen a la misma familia de *Dasyllirion*. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue probar si los iniciadores *matK* diseñados para el género *Dasyllirion* son útiles en la amplificación del gen *matK* en especies como *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe parviflora*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localidades de estudio

El sitio de muestreo fue el Jardín Botánico “Gustavo Aguirre Benavides” de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Buenavista, Saltillo, Coahuila. La zona posee clima templado semiseco, ubicada en los 25° 20' 55.72" N y 101° 01' 40.74" O, con una altitud de 1798 msnm.

3.2. Material biológico

Se recolectaron muestras de material vegetal de seis especies diferentes, pertenecientes a la familia Asparagaceae. Se etiquetaron ejemplares de cada especie: *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe parviflora*. Estas fueron documentadas con fotografías y geolocalización.

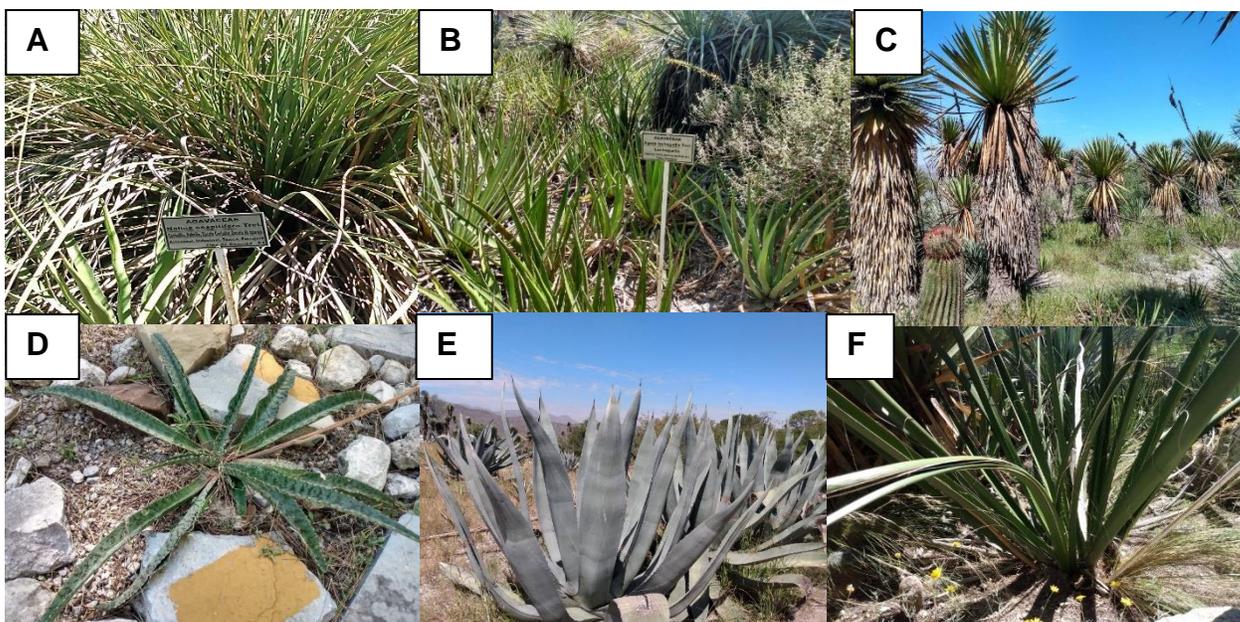


Figura 8. Imágenes que muestran las especies de plantas estudiadas. A). *Nolina cespitifera*; B). *Agave lechuguilla*; C). *Yucca carnerosana*; D). *Manfreda maculosa*; E). *Agave salmiana*; F). *Hesperaloe parviflora*

3.3. Análisis de laboratorio

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. La obtención de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) se llevó a cabo en las mismas instalaciones del Departamento de Fitomejoramiento.

3.4. Limpieza de muestras

De las plantas seleccionadas se cortaron hojas sanas, las cuales se introdujeron en bolsas de papel identificadas con su respectiva etiqueta. Las hojas se desinfectaron en una solución de hipoclorito al 1% y posteriormente en etanol al 70% ambas por 1 minuto. Se enjuagaron en agua estéril, se dejaron secar, se cortó el material vegetal en pequeños cuadros y se colocaron en morteros estériles con su respectiva identificación, se metió al refrigerador para su utilización próxima.

3.5. Aislamiento de DNA

El aislamiento de DNA genómico se realizó con base en la metodología de López *et al.* (1995) modificada.

Se tomaron 20 mg de tejido fresco congelado molido 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 hasta humedecer completamente todo el tejido vegetal 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 minutos a 12,000 revoluciones por minuto. Transcurrido el tiempo, se extrajo el sobrenadante de cada muestra y se trasladó a un nuevo tubo. Se le agregó 100 µl de RNAsa y se mezcló por

inversión. En seguida se agregó 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 pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se lavó con alcohol al 70 %. Se decantó el alcohol, se dejó secar por unos minutos el tubo con el DNA recolectado y se re-suspendió en agua estéril. Posteriormente se almaceno a 8 °C para su visualización y a -20 °C para almacenamiento por tiempo indeterminado.

3.6. Análisis de calidad del DNA.

Para corroborar la integridad del DNA se preparó un gel de agarosa para el cual se pesó 0.4 g de agarosa y se vació en un matraz con 40 ml de solución tampón 0.5x de TBE estéril (tris base, ácido bórico, EDTA). La mezcla se calentó en microondas hasta el punto de ebullición o hasta visualizar la mezcla homogénea. Se dejó enfriar por unos minutos, se agregó 2 µl de Gel red (BIOTIN™ cat: 41003) y se homogenizo bien. En seguida se vació la mezcla al molde del aparato electroforético (Life Technologies™ Gibco.) se eliminaron burbujas y posteriormente se le puso el peine y se dejó enfriar por unos 15 minutos. Para cargar el gel, se mezclaron 5 µl de DNA y 3 µl de buffer de carga (Nucleic Acid Sample Loading Buffer de Bio-rad), colocando un total de 8 µl por muestra en cada pozo del gel con su respectiva muestra identificada. Se corrió el gel a un voltaje de 80-90 volt durante media hora. Al termino del tiempo se llevó a un documentador de geles (Bio-Rad Gel Doc™ 170-8170) donde se fotografió el gel para su interpretación.

Posterior a la electroforesis del DNA, se cuantificó y evaluó su pureza con un equipo de espectrofotometría (Nanodrop ND-1000) con absorbancias de 260 nm (A260) y 280 nm (A280). El volumen de la muestra usado para el análisis fue de 1 µl. Puesto que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm y las proteínas lo tienen a 280 nm, el cociente de ambas absorbancias (260/280) es un indicador de pureza. Se obtuvieron

estadísticos básicos y se realizó un ANOVA para los resultados de calidad dentro del software estadístico de R (Core Team, 2020). A partir de los datos obtenidos, 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:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

Donde:

C1 = Concentración inicial de DNA; C2 = Concentración final 40 ng/ µl; V2 = Volumen final 50 µl; V1 = Volumen requerido de suspensión de DNA. Para la dilución se utilizó agua libre de RNAsas y DNAsas

3. 7. Amplificación con nuevos iniciadores *matK*

Para probar la eficiencia de los nuevos iniciadores diseñados específicamente para el género *Dasyllirion* (*matK* 335F y *matK* 1327R; Orozco-Sifuentes *et al.*, 2019) se realizó el proceso de amplificación para cada especie de la familia Asparagaceae. La PCR se llevó al cabo en un volumen de 50 µl. Para la amplificación del gen *matK*, cada reacción contenía 5 µl de Buffer Taq Standard 10X, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de primer Forward 10 µM, 1 µl de primer Reverso 10 µM, 0.25 µl de Taq polimerasa, 37.75 µl de agua libre de nucleasas y 4 µl de ADN templado (50 ng/µl en agua estéril), todo lo anterior de acuerdo al protocolo de kit BioLabs (Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer)

Cuadro 1. Iniciadores *matK* utilizados para la amplificación (Orozco-Sifuentes *et al.*, 2019).

Iniciador	Secuencia 5´-3´	Sentido
<i>matK</i> 335F	TTTCATTCTCGTTGCGATTAG	Derecho

<i>matK</i> 1327R	ACTTTATTTCGATACAAACCCTGTT	Izquierdo
----------------------	---------------------------	-----------

3.8. Condiciones de PCR

Las condiciones de reacción utilizadas se presentan en el Cuadro 2. Para la visualización de los productos de PCR, se corrió un gel de agarosa al 1 % con TBE 0.5 X, adicionado con Gel Red Nucleid Acid BIOTUM en proporción de 1 µl por cada 10 ml de gel. Se utilizó el marcador de peso molecular TrackIt 1 Kb Plus DNA Ladder-Life Technologies. La electroforesis se corrió en una cámara de tipo horizontal a 115 Volts durante 30 minutos, posteriormente se observó en un fotodocumentador.

Cuadro 2. Programa del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ciclos	Fases	Temperaturas	Tiempo (minutos)
		<i>MatK</i>	
	Desnaturalización inicial de DNA	94.0 °C	4:00
40	Desnaturalización	94.0 °C	0:30
	Hibridación	57.8 °C	0:35
	Extensión de iniciador	72.0 °C	0:35
	Extensión final del iniciador	72.0 °C	10:00

3.9. 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 tampon TAE 1x (Tris base, Acido acetico, EDTA) estéril. La mezcla se calentó en un horno de microondas por 90 segundos hasta que se transparento. Se dejó enfriar durante unos minutos hasta poder tocar el recipiente y se le agregaron 5 μ l de colorante Gel Red (BIOTIUM cat: 41003) como agente de tinción para visualizar los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta y se mezcló suavemente para obtener una mezcla homogénea. En seguida se vació la mezcla y se eliminaron posibles burbujas en el gel, se dejó enfriar por 20 minutos. Una vez formado el gel, se cubrió completamente con una solución de TAE 1x. Se cargaron 6 μ l de la muestra del producto de PCR y 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) y 1 μ l de buffer de carga. Se cerró el aparato, se conectaron los cables a la fuente de poder a una potencia de 115 Volts durante 30 minutos. Al finalizar este proceso se extrajo el gel y se llevó a un documentador de geles (io-Rad Gel Doc™ 170-8170) que consta de un transluminador y una cámara que capta la imagen del gel y la envía a una computadora con sistema operativo para su interpretación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Calidad de DNA

Mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de DNA basándose en la capacidad de absorción de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. De este modo la concentración de la muestra de DNA se calcula teniendo en cuenta el valor de absorción obtenido a una longitud de onda de 260nm. Mientras que la relación de absorciones A260/280 se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. De acuerdo a (Carlos III, 2020.) un DNA de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un DNA de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 >1.6. Un valor <1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. En el cuadro 3 se muestra; los parámetros de calidad de DNA de (>1.07 <1.4), esto nos indica que nuestras muestras están por debajo de un nivel de pureza aceptable. Posiblemente, la extracción del DNA se vio afectada ya que la mayoría de las especies estudiadas presentaban un material fibroso y probablemente interfirieron en el proceso de extracción. Sin embargo, se obtuvo una cantidad de DNA suficiente para poder realizar la amplificación del segmento del gen *matK* (Figura 9, 10, y 11).

Cuadro 3. Parámetros de la calidad de DNA.

Especie	ID	Concentración de ADN ng/ul	Relación 260/280
<i>Nolina cespitifera</i>	Nol-o1	3455.31	1.09
	Nol-02	3198.77	1.28
<i>Agave lechuguilla</i>	LEC-01	3281.3	1.13
	LEC-02	3118.87	1.08
<i>Yucca carnerosana</i>	YUC-01	2832.77	1.26
	YUC-03	3232.6	1.13
<i>Manfreda maculosa</i>	MAN-02	3160.3	1.4
	MAN-03	3112.0	1.09

<i>Agave salmiana</i>	AS-01	3402.05	1.12
	AS-02	3429.32	1.07
	A1	3091.99	1.11
<i>Hesperaloe palviflora</i>	HES-01	3137.06	1.21
	HES-02	3360.77	1.19

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

De los datos de calidad de DNA se obtuvieron los estadísticos básicos encontrando una media de 1.1661 y desviación estándar 0.0979. Se hizo un ANOVA con el paquete Agricolae en el lenguaje estadístico de R (R Core team, 2020) y se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias con un valor p de 0.652; no hay diferencias estadísticamente significativas en la calidad del DNA, con base en las absorbancias medidas de cada especie.

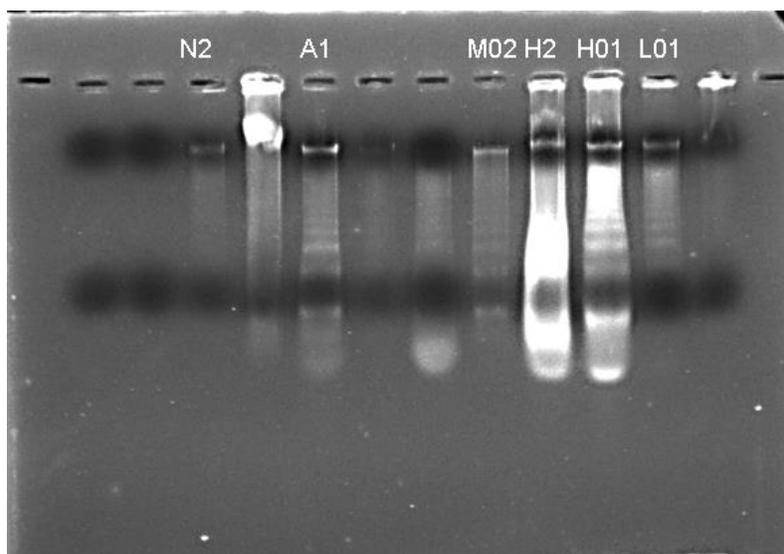


Figura 9. Gel de agarosa para visualizar la integridad del DNA de las especies *N. cespitifera*, *A. salmiana*, *M. maculosa*, *H. funifera* y *A. lechuguilla*.

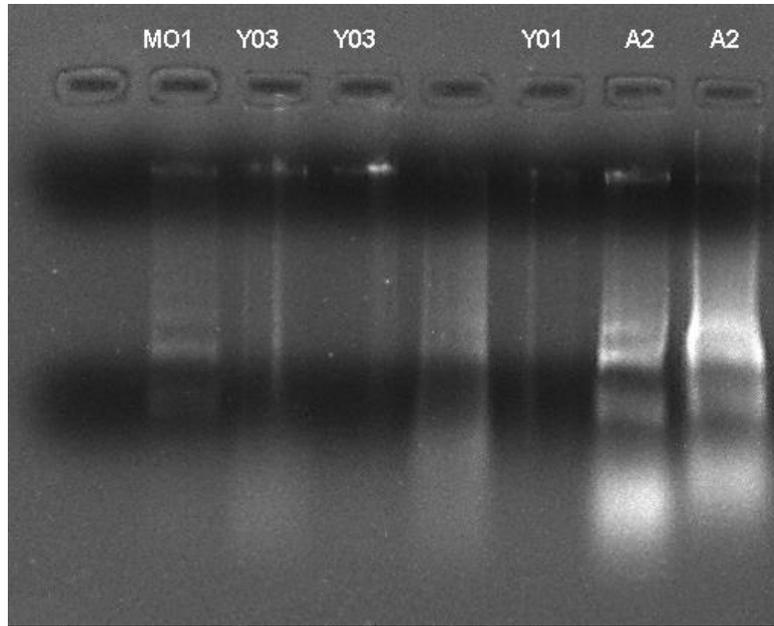


Figura 10. Gel de agarosa para visualizar la integridad del DNA de las especies *A. salmiana*, *Y. carnerosana* y *M. maculosa*.

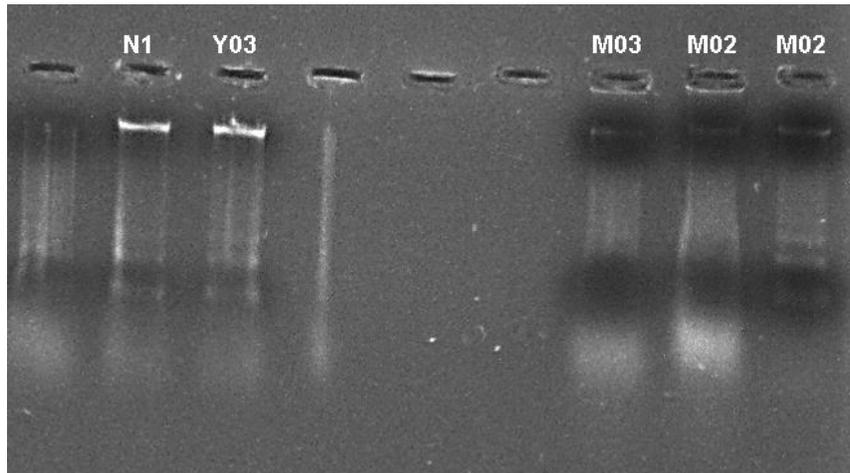


Figura 11. Gel de agarosa para visualizar la integridad del DNA en las especies *M. maculosa*, *Y. carnerosana* y *N. cespitifera*

4.2. Amplificación con nuevos iniciadores *matK* 335 F y *matK* 1327R con técnica de PCR.

En la Figura 12 se presentan los productos de PCR a partir de los iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R diseñados para la especie de *Dasyilirion* (Orozco-Sifuentes *et al.*, 2019). Todas las muestras presentan bandas bien definidas de 1000 pb, lo cual indica que los iniciadores (*matK* 335F y *matK* 1327R), son efectivos en el proceso de amplificación en las seis especies pertenecientes a la familia Asparagaceae. Algunas bandas se presentan con más intensidad que otras, lo cual puede atribuirse a la cantidad de DNA agregada en el coctel de amplificación.



Figura 12. PCR de una secuencia parcial del gen *matK* a partir del par de iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R en especies de *Agave salmiana* (AS01 y AS02), *Yucca carnerosana* (YUC01 y YUC03), *Manfreda maculosa* (MAN02 y MAN03), *Agave lechuguilla* (LEC01 y LEC02) y *Nolina cespitifera* (NOL01 y NOL02), utilizando como control positivo (C+) a *Dasyilirion cedrosanum* (DC)

El éxito en el proceso de amplificación del gen *matK* en las especies de *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe palviflora* a partir de iniciadores diseñados específicamente para el género *Dasyilirion*, demuestra su utilidad en la probable

obtención de código de barras de la vida en especies relacionadas en la misma familia.

Como dato adicional podemos mencionar que en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) se encuentran registradas las secuencias *matK* de las especies, *Agave salmiana*, *Yucca carnerosana* y *Agave lechuguilla*. Mientras que las especies *Manfreda maculosa*, *Hesperaloe parviflora* y *Nolina cespitifera* aún no cuentan con un registros de gen *matK*. Por lo cual, con la obtención de buenos resultados en este trabajo es probable la utilización de estos iniciadores (*matK* 335F y *matK* 1327R) en un futuro para la obtención de código de barras de la vida en las especies mencionadas.

V. CONCLUSIONES

En este trabajo comprobamos que los iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R diseñados específicamente para el género *Dasyliirion* son útiles en el proceso de amplificación y obtención de la secuencia parcial del gen *matK* para código de barras de la vida de las especies *Nolina cespitifera*, *Agave lechuguilla*, *Yucca carnerosana*, *Manfreda maculosa*, *Agave salmiana* y *Hesperaloe parviflora* que se encuentran estrechamente relacionadas con el género *Dasyliirion*, dentro del mismo grupo taxonómico de la familia *Asparagaceae*. Esto facilitará el uso de la secuencia parcial del gen *matK* para la identificación de estas especies y muy probablemente para otras especies pertenecientes a la misma familia *Asparagaceae*.

VI. LITERATURA CITADA

- Berlanga, C., L. González y H. Franco-López.** 1992. Métodos para la evaluación y manejo de poblaciones naturales de lechuguilla (*Agave lechuguilla*). 22 p.
- Blando-Navarrete, J.L. y S. Baca-Marín.** 2001. Determinación del potencial productivo de la lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). Pp100-105.
- Castillo QD.** 1994. Determinación de turno técnico de cortadillo *Nolina cespitifera*. Pp. 31-32.
- Castillo QD.** 1995. Establecimiento de plantaciones de cortadillo en la región Ixtlera del sur de municipio de Saltillo. 153 pp.
- Castillo Q. D., C. A. Berlanga R., Pando M. M.y Cano P. A.** 2008.Regeneración del cogollo de *Agave Lechuguilla* Torr. de cinco procedencias bajo cultivo. P 188
- Castillejos, C.** 2009. Sistemática del género *Manfreda* salisb. (*Agaveceae*). (*Tesis de Doctorado*).
- CBOL (Plant Working Group).**A DNA barcode for land plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.2009,106(31), 12794-12797.DOI: 10.1073/pnas.0905845106.
- Chapin, F.S.** 1980. The mineral nutrition of wild plants. Ann. Pp 165-173.
- Cracraft, J.** 1983. Species concepts and speciation analysis in R. F. Johnston (ed.). Current Ornithology, New York: Plenum Press. Pp159-187.
- Cuenoud, P., V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer and M. W. Chase.** Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and

plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences. American Journal of Botany.2002,89(1), 132-144.

Espejo, SA, López FAR. 1996. Las Monocotiledóneas Mexicanas. Una Sinopsis Florística. Tomo I. Parte VI. Dioscoreaceae-Nolinaceae. Consejo Nacional de la Flora de México, Universidad Autónoma Metropolitana, CONABIO. México. pp. 101-104.

Castillo-Quiroz, David, & Avila Flores, Diana Yemilet, & Castillo-Reyes, Francisco, & Antonio Bautista, Adriana, & Martínez-Burciaga, Oscar Ulises (2015). Nolina cespitifera Trel. Recurso forestal no maderable de importancia económica y social del noreste de México. Interciencia, 40(9),611-617.[fecha de Consulta 20 de Mayo de 2021]. ISSN: 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33940998005>

García MA, Galván VR (1995) Riquezas de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Bol. Soc. Bot. Méx. 56: 7-24.

García-Mendoza, A. J. 2011. Agaváceas, Flora del Valle de Tehuacán, México. 95 p

Gentry, S. H. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. 670 p.

González MG, Durán R, Martínez del Real C, Quintanilla JM. 1980. Estimaciones de biomasa a partir de la altura y la cobertura de las plantas xerófitas. General Technical Report. WO- 28: 416-420. Developing CostEfficient Service U.S.A

Granados-Sánchez, D., A. Sánchez-González, R. L. Granados-Victorino y A. de la Rosa. 2011.Ecología de la vegetación del desierto Chihuahuense. Pp 111-130.

Hebert, P. D. N and T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding

fortaxonomy. Systematic Biology. Pp 852-859.

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball and J. R. Dewaard. 2003. Biological identification through DNA barcodes. Pp270. DOI:10.1098/rspb.2002.2218

Hernández R., E. C. Lugo, L. Díaz y S. Villanueva. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. e-Gnosis 3: 1-9.

Janzen, D.A. 2009. DNA barcode for land plants. PNAS. P106

Janzen, D. H., W. Hallwachs, P. Blandin, J. M. Burns, J. M. Cadiou, I. Chaco Netal. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. Mol Ecol Resour. Pp 1-26. DOI:10.1111/j.1755-0998.2009.02628.

Jing, Y., X. Jian-Hua. and Z. Shi-Liang. 2001. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. Pp 49(3), 176-181. DOI: 10.1111/j.1759-6831.2011.00134.

Juárez A. C. A. y Rodríguez L. P. 2004. Uso de fibras naturales de lechuguilla como refuerzo en concreto. p. 7-19.

Kress, W. J. and D. L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. P 2(6), e508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>.

Lanteri, A. 2007. DNA barcoding and its possible applications to the field of Entomology. Pp 66(3-4), 15-25.

- Lopes**, M. A., K. Takasaki, D. E. Bostwick, T. Helentjaris and B. A. Larkins. Identification of two opaque modifier loci in quality protein maize. *Molecular and General Genetics*. 1995, 247(5): 603-613.
- Matuda**, E. I. Piña. 1980. Las plantas mexicanas del género *Yucca*. 145 p.
- Mayorga** H. E., D. Rössel K., H. Ortiz L., A. R. Quero C. y A. Amante O. 2004. Análisis comparativo de la calidad de la fibra de *Agave lechuguilla* Torr. Procesada manual y mecánicamente. *Agrociencia* 38: 219-225.
- McCleary**, J. A. 1955. Lechuguilla or lecheguilla, a nomenclatural problem. *Saguaroland Bulletin* 9:80-81.
- Michaux** A. 1803. *Flora Boreali-Americana, Sistens Characteres Plantarum Quas in America Septentrionali Collegit et Detexit. Parissis et Argentorati, apud fratres Levrault*. 416 pp.
- Nobel**, P. S. 1988. *Environmental biology of agaves and cacti*. New York: Cambridge University Press. 270 p. (12163).
- Orozco-Sifuentes**, M. M., Mendoza-Rodríguez, D.V., Hernández-Godínez, F., Martínez, O., Villarreal-Quintanilla, J.A. Y Reyes-Valdés, M.H. 2019. Nuevos iniciadores matK para código de barras de la vida en especies del género *Dasylirodon*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(6): 1313-1324.
- Paz**, A., M. Gonzalez y A. J. Crawford. Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*. 2011, 16(3), 161-176. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/19782/27968>.
- Piña**, E. y Matuda, E. 1980. *Las plantas mexicanas del género Yucca*. Toluca, estado

de México: gobierno del estado de México. 145 p.

Reyes, A., J. A; Aguirre R. J. R. y Peña V., C. B. 2000. Biología y Aprovechamiento de Agave lechuguilla Torrey. Bol. Soc. Bot. México 67:75- 88. pp. 75-86.

Rzedowski, J. 1965. Relaciones geográficas y posibles orígenes de la flora de México. Pp 29, 121-177.

Standley PC. 1920. Trees and shrubs of Mexico. Nat. Herb. 23: 1-1723.

Tropicos. 2014. <http://www.tropicos.org/>(Cons. 15/01/2014).

Watson, J. D. and F. H. C. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature. Pp 171, 737-738.

Yang, Z. and B. Rannala. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. Nature Reviews Genetics. Pp 13, 303-314.

Zamora MMC, Velasco BE, Cano PA, Villavicencio GE, Castillo QD. 2009. Criterios Técnicos para el Aprovechamiento Sustentable de Recursos Forestales No Maderables de Clima Árido y Semiárido. 124 pp.