

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN LAS
ESPECIES DE *DASYLIRION* DEL NORESTE DE MÉXICO

Tesis

Que presenta MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA
ZONAS ÁRIDAS

Saltillo, Coahuila

Noviembre 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO




CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN LAS
ESPECIES DE *DASYLIRION* DEL NORESTE DE MÉXICO

Tesis

Que presenta MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA
ZONAS ÁRIDAS



Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés
Director UAAAN



Dr. Octavio Martínez de la Vega
Director Externo

Saltillo, Coahuila.

Noviembre 2019

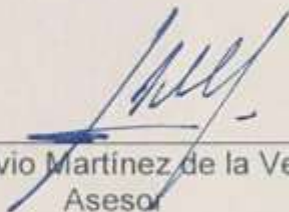
CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN LAS
ESPECIES DE *DASYLIRION* DEL NORESTE DE MÉXICO

Tesis

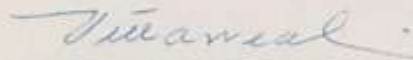
Elaborada por MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES como requisito
parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS
FITOGENÉTICOS PARA ZONAS ÁRIDAS con la supervisión y aprobación del
Comité de Asesoría



Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés
Asesor Principal



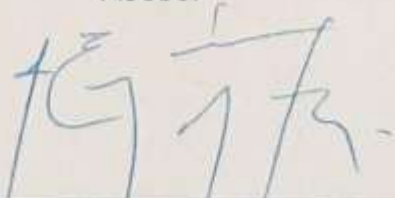
Dr. Octavio Martínez de la Vega
Asesor



Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla
Asesor



Dra. Francisca Ramírez Godina
Asesor



Dr. José Eduardo García Martínez
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado

Agradecimientos

A **Dios** por permitirme la vida y con ello la dicha de terminar mis estudios de doctorado, por las experiencias vividas, por ser mi refugio y sobre todo mi fortaleza en los momentos difíciles

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme la oportunidad de realizar un postgrado a nivel doctorado y a la cual ya considero mi segunda casa, donde he encontrado excelentes maestros y grandes amigos.

Al **CONACYT** por la oportunidad y el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo de investigación.

Al **Dr. Humberto Reyes Valdés** por la confianza depositada al permitirme realizar mis estudios de doctorado en el Laboratorio de Genomas. Muchas gracias por las experiencias vividas, por los conocimientos compartidos, por el apoyo económico brindado, por las palabras de aliento recibidas, por su gran disponibilidad para la realización de este trabajo, pero sobre todo por su paciencia y por su respeto.

Al **Dr. Octavio Martínez de la Vega** por todo el apoyo recibido durante las estancias de investigación, en el Laboratorio de Biología Computacional de la UGA, CINVESTAV-Irapuato, Gto, donde siempre fui recibida con un gran afecto, respeto y toda la disposición para obtener los mejores resultados en nuestro trabajo.

Al **Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla** cuya participación fue imprescindible en el proceso de identificación de especies vegetales. Muchas gracias por su participación siempre activa en las colectas realizadas, por su paciencia, por las charlas tan amenas, por los mensajes de apoyo, por su confianza y sobre todo por honrarme con su amistad.

A la **Dra. Francisca Ramírez Godina** por todo su apoyo durante mi estancia en el doctorado, tanto en la disponibilidad de equipo de laboratorio como en el aspecto moral. Muchas gracias por ser una persona tan abierta y sobre todo por tratar de buscar siempre soluciones a mis inquietudes.

Al **Dr. José Eduardo García Martínez** por la confianza y la libertad de trabajar en el Laboratorio de Nutrición Animal de la UAAAN, gracias por todas las facilidades para la obtención de resultados relevantes en esta investigación. Gracias por brindarme su amistad, por darme sus consejos, por su tiempo, por las buenas pláticas y sobre todo por permitirme conocerlo.

Al **Biol. Fernando Hernández**, cuya participación durante las estancias en el Laboratorio de Biología Computacional de la UGA, CINVESTAV-Irapuato, Gto fueron de vital importancia en la obtención de resultados moleculares. Gracias por tener siempre la mejor disposición para el trabajo, por su gran calidad humana y por ser un excelente amigo.

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 amiga.

Al **Técnico laboratorista Carlos Arévalo San Miguel** del Laboratorio de Nutrición Animal por la instrucción recibida durante el análisis bromatológico y mineral de semillas. Por su gran disponibilidad, por la supervisión siempre atenta, por ser una persona tan amable y un gran amigo.

Al **Ing. Fidel Ramírez Amador** por su colaboración durante las estancias en la UGA-CINVESTAV, Irapuato, Gto. Por la instrucción recibida en cuanto a técnicas de laboratorio, por sus atenciones en la obtención y envío de resultados, por su tiempo y por su amistad.

A la **Dra. Hermila Osuna** por su apoyo para alcanzar la culminación de este trabajo, por su amistad y por su trato siempre tan amable.

A **Don Miguel Ángel Rodríguez Armendáriz**, trabajador de campo de la UAAAN, por su participación activa y su grata compañía durante las colectas iniciales de esta investigación.

A mis amigos, en particular aquellos que siempre estuvieron al pendiente de mis estudios, que a pesar de que están un poco lejos, sé que cuento con ustedes, **Yzmary Martínez, Cirilo Cahuare Ramos, Luis Ovalle y Gabriela Hernández.**

A mi compañera de doctorado y amiga **Ana Bertha Meza Cota**, por las experiencias compartidas a lo largo del camino, por las clases en común, por los trabajos en equipo, por tu gran honestidad y porque siempre tienes un momento para mí, muchas gracias.

A mis compañeras de doctorado y laboratorio **Reina Rojas, Flor Pacheco, Ana Gómez y Martín Regino** con quienes conviví en el transcurso del doctorado y quienes además de ser excelentes personas son muy serviciales.

A **Areli González Cortés** por su compañía durante las últimas colectas de esta investigación y por el apoyo brindado durante el periodo del doctorado.

A las secretarías **Norma González y Norma Susana**, por estar siempre dispuestas a resolver nuestras dudas administrativas y quienes tratan de darnos siempre respuestas rápidas. Por su trato siempre amable, muchas gracias.

Dedicatoria

A mis hermosos padres, los pilares de mi vida
Martha L. Sifuentes Hernández y Armando Orozco Escobedo
por su amor y su apoyo incondicional.

*A mis abuelitas **María de Jesús Hernández Jaramillo †** y **María de Jesús Escobedo Miranda †**, que partieron de este mundo en el transcurso de este trabajo y que en vida me dieron su amor, su ejemplo, sus oraciones y sobre todo sus consejos.*

*A mis hermanos y cuñados tan amados, **Armando, Tomás, Erubiel, Roberto, Ana, Cesar, Isabel, Ely, Laura y Francisco** que siempre han respetado y apoyado mis decisiones.*

*A mis queridos sobrinos, **Israel, Ángel, Fátima, Karol, Gabriel, Fernanda, Angely, Axel, Melanie, Getsemaní y Lluvizela**, que son la luz de mis ojos y que con sus personalidades tan distintas siempre me dan lecciones de amor y vida.*

Índice General

Lista de Figuras	xi
Lista de Cuadros.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Importancia del género <i>Dasyilirion</i>	4
Distribución del género <i>Dasyilirion</i>	5
Descripción del género <i>Dasyilirion</i>	7
Clasificación taxonómica del genero <i>Dasyilirion</i>	9
Sistemática del género <i>Dasyilirion</i>	10
Código de barras de la vida.....	11
Aplicaciones del código de barras de la vida	12
Código de barras de la vida y el género <i>Dasyilirion</i>	12
Información de ADN y análisis filogenético	13
Especies de <i>Dasyilirion</i> colectadas	18
<i>Dasyilirion palaciosii</i>	18
<i>Dasyilirion texanum</i>	19
<i>Dasyilirion occidentalis</i>	20
<i>Dasyilirion leiophyllum</i>	21
<i>Dasyilirion quadrangulatum</i>	22
Potencial nutritivo de la semilla de sotol (<i>Dasyilirion cedrosanum</i>)	23
Germinados y sus propiedades	25
MATERIALES Y MÉTODOS	28
Código de barras de la vida.....	28
Colecta de material vegetal	28
Extracción de ADN.....	29
Análisis de complementariedad con iniciadores <i>matKF390</i> y <i>matKR1326</i> .30	

Diseño de iniciadores <i>matK</i>	31
Amplificación con nuevos iniciadores <i>matK</i>	32
Amplificación con iniciadores <i>rbcL</i>	32
Secuenciación	33
Calidad de secuencias nucleotídicas.....	34
Limpieza de secuencias.....	34
Complementariedad entre secuencias derechas e izquierdas.....	35
Traducción de secuencias	35
Alineamiento	35
Análisis filogenético	35
Estimación de tiempos de divergencia	36
Análisis bromatológico en semilla de <i>D. cedrosanum</i>	37
Colecta y procesamiento de la semilla.....	37
Molienda de la semilla	38
Materia seca total	39
Ceniza.....	39
Proteína cruda	39
Extracto etéreo	41
Fibra cruda.....	41
Extracto libre de nitrógeno.....	42
Análisis mineral en semilla de <i>D. cedrosanum</i>	42
Determinación de fósforo por espectrofotometría.....	44
Análisis bromatológico en germinado de <i>D. cedrosanum</i>	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
Código de barras de la vida.....	46
Calidad de ADN	46
Amplificación con iniciadores <i>matK</i> 390F y <i>matK</i> 1326R.....	47
Amplificación con nuevos iniciadores <i>matK</i> 335F y <i>matK</i> 1327R	48
Amplificación con iniciadores <i>rbcL</i>	49
Calidad de las secuencias	50
Traducción de secuencias	50

Alineamiento de secuencias	51
Obtención de matrices de sustitución nucleotídica	51
Obtención de dendrogramas	54
Análisis filogenético	57
Análisis bromatológico en semilla de <i>D. cedrosanum</i>	67
Análisis mineral en semilla de <i>D. cedrosanum</i>	72
Análisis bromatológico del germinado de semillas de <i>D. cedrosanum</i>	75
CONCLUSIONES	77
REFERENCIAS	78

Lista de Figuras

Figura	Descripción	Pág.
1.	Distribución geográfica del sotol en México.....	7
2.	Planta de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	9
3.	Ejemplo de árbol filogenético construido en base a características morfológicas, que muestra la diversificación de una especie ancestral en cinco especies presentes en la actualidad.....	14
4.	Ejemplo de árbol filogenético construido en base a distancias genéticas. Partiendo de un a) alineamiento múltiple, b) una matriz de distancias utilizada para estimar c) el árbol filogenético (Abascal et al., 2014).....	15
5.	Planta de <i>Dasyilirion palaciosii</i>	18
6.	Planta de <i>Dasyilirion texanum</i>	19
7.	Planta de <i>Dasyilirion occidentalis</i>	20
8.	Planta de <i>Dasyilirion leiophyllum</i>	21
9.	Planta de <i>Dasyilirion quadrangulatum</i>	22
10.	Semilla de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	25
11.	Germinado de semilla de sotol (<i>D. cedrosanum</i>).....	27
12.	Sitios de colecta de material vegetal de especies de <i>Dasyilirion</i> . Las localidades comprenden los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas.....	28
13.	a) Alineamiento del iniciador <i>matK</i> 390F con la secuencia del gen completo <i>matK</i> de <i>D. wheeleri</i> registrada en GenBank-NCBI, b) Alineamiento del iniciador <i>matK</i> 390F con la secuencia del gen completo <i>matK</i> de <i>D. serratifolium</i> registrada en el GenBank.....	31
14.	Sitios de colecta de la semilla de <i>Dasyilirion cedrosanum</i>	38
15.	Determinación de materia seca total.....	39
16.	Determinación de nitrógeno orgánico por método Kjeldahl.....	40
17.	Obtención de extracto etéreo.....	41

Figura	Descripción	Pág.
18.	Determinación de fibra: a) proceso de digestión, b) filtrado de la muestra, c) crisoles con fibra digerida, d) secado de la fibra y e) peso de crisoles con fibra seca.....	42
19.	Determinación de minerales: a) peso de muestras, b) digestión ácida de la muestra, c) obtención de sólidos no disueltos, d) filtrado de sólidos no disueltos y e) lectura en espectroscopia de absorción atómica.....	43
20.	Determinación de fósforo por espectrofotometría.....	44
21.	Obtención de germinados de semilla de <i>D. cedrosanum</i>	45
22.	Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen <i>matK</i> a partir de iniciadores <i>matK</i> 390F y <i>matK</i> 1326R (Cuénoud <i>et al.</i> , 2002) en especies de <i>Dasyilirion</i> : a) <i>D. palaciosii</i> , b) <i>D. texanum</i> , c) <i>D. occidentalis</i> y d) <i>D leiophyllum</i>	48
23.	Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen <i>matK</i> a partir de iniciadores <i>matK</i> 335F y <i>matK</i> 1327R en especies de <i>Dasyilirion</i> : a) <i>D. palaciosii</i> , b) <i>D. texanum</i> , c) <i>D. occidentalis</i> , d) <i>D. leiophyllum</i> y e) <i>D. quadrangulatum</i>	49
24.	Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen <i>rbcL</i> a partir de iniciadores <i>rbcLaF</i> y <i>rbcLaR</i> en especies de <i>Dasyilirion</i> : a) <i>D. palaciosii</i> , b) <i>D. texanum</i> , c) <i>D. occidentalis</i> , d) <i>D. leiophyllum</i> y e) <i>D. quadrangulatum</i>	50
25.	Dendrograma para especies de <i>Dasyilirion</i> construido con base en secuencias <i>matK</i>	55
26.	Dendrograma para especies de <i>Dasyilirion</i> construido con base en secuencias <i>rbcL</i>	56
27.	Dendrograma para las especies de <i>Dasyilirion</i> a partir de secuencias concatenadas <i>matK-rbcL</i>	57

Figura	Descripción	Pág.
28.	Dendrograma para especies de <i>Dasyllirion</i> a partir de secuencias <i>matK</i> , con <i>Asparagus officinalis</i> y <i>Acorus gramineus</i> (registro fósil, 132 Ma) como grupos externos.....	59
29.	Estimación de tiempos evolutivos en especies de <i>Dasyllirion</i> a partir de secuencias <i>matK</i> , con <i>Asparagus officinalis</i> y <i>Acorus gramineus</i> (registro fósil, 132 Ma) como grupos externos	60
30.	Subárbol para las especies de <i>Dasyllirion</i> , con tiempos evolutivos a partir de secuencias <i>matK</i>	62
31.	Árbol filogenético de las especies de <i>Dasyllirion</i> con errores estándar de los tiempos de divergencia estimados con base en secuencias <i>matK</i>	63
32.	Estimación de tiempos de divergencia en especies de <i>Dasyllirion</i> a partir de secuencias <i>matK-rbcL</i> concatenadas.....	64
33.	Subárbol para las especies de <i>Dasyllirion</i> , con tiempos evolutivos a partir de secuencias concatenadas <i>matK-rbcL</i>	66
34.	Árbol filogenético de las especies de <i>Dasyllirion</i> con errores estándar de los tiempos de divergencia estimados con base en secuencias concatenadas <i>matK-rbcL</i>	67

Lista de Cuadros

Cuadro	Descripción	Pág.
1.	Comparativo entre características morfológicas de cinco especies de <i>Dasyilirion</i>	23
2.	Georreferencias de las especies de <i>Dasyilirion</i> colectadas.....	29
3.	Iniciadores <i>matK</i> generados en Pirmer3Plus y probados en FastPCR.....	32
4.	Iniciadores <i>rbcL</i> utilizados para la amplificación.....	33
5.	Programa del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
6.	Concentraciones y calidad de ADN.....	46
7.	Matriz de sustitución nucleotídica para el gen <i>matK</i> entre especies de <i>Dasyilirion</i> y el grupo externo, <i>Asparagus officinalis</i>	53
8.	Matriz de sustitución nucleotídica para el gen <i>rbcL</i> entre especies de <i>Dasyilirion</i> y el grupo eterno, <i>Asparagus officinalis</i>	54
9.	Contenido nutricional de la semilla de <i>D. cedrosanum</i> de dos localidades del Sureste de Coahuila y una de Zacatecas. Los resultados son basados en 100 g de harina de semilla.....	71
10.	Contenido mineral de la semilla de <i>D. cedrosanum</i> de dos localidades del Sureste de Coahuila y una de Zacatecas. Los resultados son basados en 100 g de harina de semilla.....	74
11.	Contenido nutricional del germinado de semilla de <i>D. cedrosanum</i> . Los resultados son basados en 100 g de germinado deshidratado.....	76

RESUMEN

CÓDIGO DE BARRAS DE LA VIDA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO EN LAS
ESPECIES DE *DASYLIRION* DEL NORESTE DE MÉXICO

POR

MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

DOCTORADO EN RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA ZONAS ÁRIDAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. MANUEL HUMBERTO REYES VALDÉS – ASESOR

Saltillo, Coahuila

Noviembre 2019

Las especies de *Dasyilirion* comprenden un grupo de plantas muy importante del Desierto Chihuahuense. Existen 23 especies distribuidas al sur de USA y Norte de México. Su uso principal es la producción de una bebida alcohólica llamada “sotol”. No todas las especies de *Dasyilirion* son aptas para este propósito. Su identificación no es fácil, incluso a partir de la planta completa. El código de barras de la vida, basado en la secuenciación de genes de cloroplasto (*matK* o *rbcL*), en analogía a un código de barras comercial, sirve como identificador de especies. Esta investigación busca caracterizar especies de *Dasyilirion* y construir árboles filogenéticos, que sean útiles en la inferencia de su historia evolutiva, así como explorar el potencial nutritivo de la semilla de *D. cedrosanum*. Se secuenciaron fragmentos *matK* y *rbcL* de cinco especies de *Dasyilirion*, se construyeron árboles filogenéticos y se estimaron tiempos de divergencia a partir del registro fósil de *Acorus gramineus*. Las secuencias *matK* resultaron más útiles en el proceso de diferenciación entre especies, en comparación con las secuencias *rbcL*. Se estimó que las especies de *Dasyilirion* divergieron de un ancestro común hace mínimo 3.98 millones de años, durante el Plioceno, en la era Cenozoica. Se realizó análisis bromatológico y mineral en las semillas de acuerdo a la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Los contenidos de proteína (27.7 %), extracto etéreo (18.4 %), fibra cruda (16.2 %) y minerales fueron superiores que en trigo. Se deduce que las semillas tienen potencial como alimento humano y animal.

Palabras clave: sotol, código de barras de la vida, *matK*, *rbcL*, filogenia, valor nutricional.

ABSTRACT

BARCODE OF LIFE AND PHYLOGENETIC ANALYSIS IN *DASYLIRION*
SPECIES OF NORTHEASTERN MEXICO

BY

MARTHA MONZERRATH OROZCO SIFUENTES

PHD PROGRAM IN PHYTOGENETIC RESOURCES FOR ARID ZONES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. MANUEL HUMBERTO REYES VALDÉS – ADVISOR

Saltillo, Coahuila.

Noviembre 2019

Dasyliirion species comprise a very important group of plants from the Chihuahuan Desert. There are 23 species distributed to the south of the USA and Northern Mexico. Its main use is the production of an alcoholic beverage called “sotol”. Not all *Dasyliirion* species are suitable for this purpose. Its identification is not easy, even from the complete plant. The barcode of life, based on the sequencing of chloroplast genes (*matK* or *rbcL*), in analogy to a commercial barcode, serves as a species identifier. This research seeks to characterize *Dasyliirion* species and build phylogenetic trees, which are useful in the inference of their evolutionary history, as well as explore the nutritive potential of the seed of *D. cedrosanum*. *MatK* and *rbcL* fragments of five *Dasyliirion* species were sequenced, phylogenetic trees were constructed and divergence times were estimated from the fossil record of *Acorus gramineus*. *MatK* sequences were more useful in the process of differentiation between species, compared to *rbcL* sequences. It was estimated that *Dasyliirion* species diverged from a common ancestor at least 3.98 million years ago, during the Pliocene, in the Cenozoic era. Bromatological and mineral analysis was performed on the seeds according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). The contents of protein (27.7%), ethereal extract (18.4%), crude fiber (16.2%) and minerals were higher than in wheat. It follows that the seeds have potential as human and animal food.

Key words: sotol, barcode of life, *matK*, *rbcL*, phylogeny, nutritive value

INTRODUCCIÓN

El género *Dasyilirion* comprende un grupo de plantas muy parecidas a los agaves que se distribuyen en zonas áridas y semiáridas del Norte de México. Es uno de los géneros de mayor importancia económica, ecológica y cultural dentro del más grande desierto de Norteamérica, el Desierto Chihuahuense. Vestigios prehispánicos demuestran que grupos nativos del suroeste de Texas y del noreste de Chihuahua, como los anasazis, los tarahumaras, los tobosos y los apaches, lo cocinaban en hornos de tierra con piedras calientes y lo consumían como parte de su dieta (IMPI, 2002; Short *et al.*, 2015).

Los individuos de esta especie son conocidos comúnmente como sotoles y son utilizados por los pobladores de zonas áridas en la elaboración de cestería, como forraje para ganado en tiempo de sequía y de manera muy particular en la elaboración de una bebida alcohólica tradicional llamada sotol. Cuenta con protección derivada de la denominación de origen para los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango. Cabe aclarar que no todas las especies de *Dasyilirion* son aptas para este propósito (Bogler, 1994; IMPI, 2002).

En la actualidad existen 23 especies descritas y distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta Oaxaca en territorio Mexicano (Bogler, 1998; Trópicos, 2018; The plant list, 2013; Villarreal-Quintanilla *et al.*, 2016). El grupo se ha clasificado dentro de diferentes familias botánicas a lo largo de la historia, entre ellas: Liliaceae, Agavaceae y Nolinoaceae. Actualmente se le sitúa en la familia Asparagaceae y en la sub-familia Nolinoideae (Dahlgren *et al.*, 1985).

Las plantas de *Dasyilirion* son perennes, dioicas y policárpicas. Se caracterizan por poseer numerosas hojas largas, lineares, flexibles, arrosetadas con espinas en los bordes y cuentan con un tallo leñoso que aumenta en longitud y anchura. En algunas especies el tallo no parece crecer mucho sobre el nivel del suelo, mientras que en otras puede crecer en un tronco vertical de hasta 2 m de altura. En la mayoría de las especies el tronco no es muy ancho ni fuerte, y en las plantas más viejas el tronco tiende a inclinarse en el suelo y a menudo están apoyados y protegidos por una falda de hojas rígidas y muertas. Su escapo o garrocha puede llegar a medir hasta 6 m de altura, del cual se desprende una

inflorescencia con flores pequeñas en panículas y su fruto es una cápsula indehisciente que contiene una sola semilla (Bogler, 1994).

Las características morfológicas que comparten las especies de *Dasyilirion* a simple vista parecen ser muy similares, pero si éstas se observan a detalle, no lo son del todo. El color de las hojas, la dirección en la curvatura de las espinas, el tamaño de la piña, la forma y el tamaño de las semillas, son algunas de las variantes que nos ayudan a diferenciar entre especies. Pero incluso para profesionales entrenados como los taxónomos, el proceso de diferenciación e identificación no es una tarea fácil, en especial si no se cuenta con la planta completa o con ciertas estructuras con características peculiares como las reproductivas.

Los criterios en el proceso de caracterización e identificación de plantas pueden enriquecerse con información de la secuencia de ADN, tales como el código de barras de la vida. Iniciativa mundial que nace en la Universidad de Guelph, Canadá en 2004, la cual propone secuenciar un fragmento corto de ADN, de unos 500 nucleótidos, a partir de una porción de tejido vegetal que, en analogía a un código de barras comercial, sirva como identificador universal para cada una de las especies vegetales o animales (Hebert *et al.*, 2003). Esta iniciativa propone emplear información dentro de una misma región génica en todas las especies vivientes en condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas. La metodología fue propuesta inicialmente para identificar animales a partir del gen mitocondrial citocromo C oxidasa subunidad 1 (COI), pero no es utilizable para plantas ya que la tasa de substitución es muy baja a diferencia de animales. El Consortium for the Barcode of Life propone emplear como identificadores (barcode), para el caso de plantas terrestres, algunos genes provenientes de cloroplasto, entre los que destacan el gen de la maturasa K (*matK*) y el gen de la subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (*rbcL*), que han dado resultados favorables en la identificación de un gran número de especies (CBOL, 2009).

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtener códigos de barras de la vida y análisis filogenético de especies de *Dasyliirion* del Noreste de México

Objetivos específicos

- Caracterizar especies de sotol con los genes *matK* y *rbcL*.
- Evaluar la eficiencia de estos genes en la distinción de especies de *Dasyliirion*.
- Construir árboles filogenéticos para el género
- Estimar tiempos de divergencia evolutiva

Objetivos adicionales

- Evaluar la calidad alimenticia de la harina de la semilla de *D. cedrosanum*
- Evaluar la calidad alimenticia del germinado de semilla de *D. cedrosanum*

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del género *Dasyllirion*

El género *Dasyllirion* corresponde a un tipo de plantas parecidas a los agaves. Forman parte del paisaje de zonas áridas del Norte de México, principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León y Zacatecas. Son plantas perenes y dioicas, es decir, genera plantas que poseen flores pistiladas y plantas que poseen flores estaminadas, lo que hace que su reproducción sea cruzada. Estudios dirigidos a la proporción de sexos, con relación encontrada 1:1, la colocan como una especie de dioecia bien definida (Reyes-Valdés *et al.*, 2017). Su número cromosómico reportado para *D. wheeleri*, *D. texanum* y *D. micropterum* es de $2n = 38$ (Satô, 1935; Hernández-Quintero *et al.*, 2015).

Sus ejemplares son conocidos comúnmente como “sotoles”, el cual proviene de náhuatl Tzotollin y significa dulce de la calabaza, constituyendo uno de los géneros de mayor importancia económica, ecológica y cultural. Desde tiempos prehispánicos era consumido como alimento por grupos indígenas, quienes cocinaban el tallo en pozos con piedras calientes y del centro ya cocido obtenían una harina para preparar pan (Short *et al.*, 2015). Hoy en día sigue siendo materia para los habitantes de zonas áridas, quienes lo utilizan en la elaboración de cestería (Bogler, 1994), como alimento para animales en tiempo de sequía y de manera muy particular en la elaboración de una bebida alcohólica tradicional llamada “sotol”, a la cual fue otorgada la protección a la denominación de origen para los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2001).

Como sustituto de forrajes verdes de cultivo, los sotoles son empleados especialmente en época de sequía y en invierno, ya que es de fácil acceso. Se le considera como un forraje tosco con apreciable contenido de nutrientes. Sus bulbos basales o cabezas subterráneas constituyen un forraje succulento durante prolongadas sequías. Los ganaderos lo utilizan en sequías excepcionales, como única salvación, cuando ocurren muertes por hambre en sus ganados (Vázquez, 2001).

Como material de cestería, sus hojas son utilizadas para la elaboración de tejido de petates, sombreros, canastas, sopladores para el fuego y adornos en forma de flor conocidos como chimales, muy comunes en fiestas patronales. Su escapo es utilizado como material de construcción en áreas rurales y en la fabricación de bastones. Algunas especies se utilizan como ornamentales, tal es el caso *Dasyilirion occidentalis*, una especie que habita en los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro y Veracruz.

En la elaboración de la bebida alcohólica con el mismo nombre “sotol”, se emplean las “cabezas” o “piñas” de la planta. Las especies *D. cedrosanum*, y *D. duranguense*, *D. wheeleri*, y *D. leiophyllum* son las más utilizadas para la obtención de azúcares (De la Garza *et al.*, 2010). El proceso de elaboración del destilado es muy semejante al del tequila o el mezcal, el cual puede ser de tipo rústico o industrializado. Se logra mediante un proceso de cocción dentro de las 24 horas posteriores al corte de las piñas, para evitar deterioro de los azúcares. En esta etapa los carbohidratos complejos como fructooligosacáridos, inulinas y polímeros de fructosa se desnaturalizan en glucosa y fructosa. Al final de la cocción, las cabezas se cortan y llevan a molienda. Los jugos generados son transferidos a tanques de fermentación por 7 días y el producto se somete a un proceso de destilación. Obteniendo primero metanol proveniente de la cabeza y posteriormente etanol proveniente del corazón. Los destilados se etiquetan y son purificados a través de una segunda destilación, obteniendo hasta 85 grados de alcohol (Reyes-Valdés *et al.*, 2019).

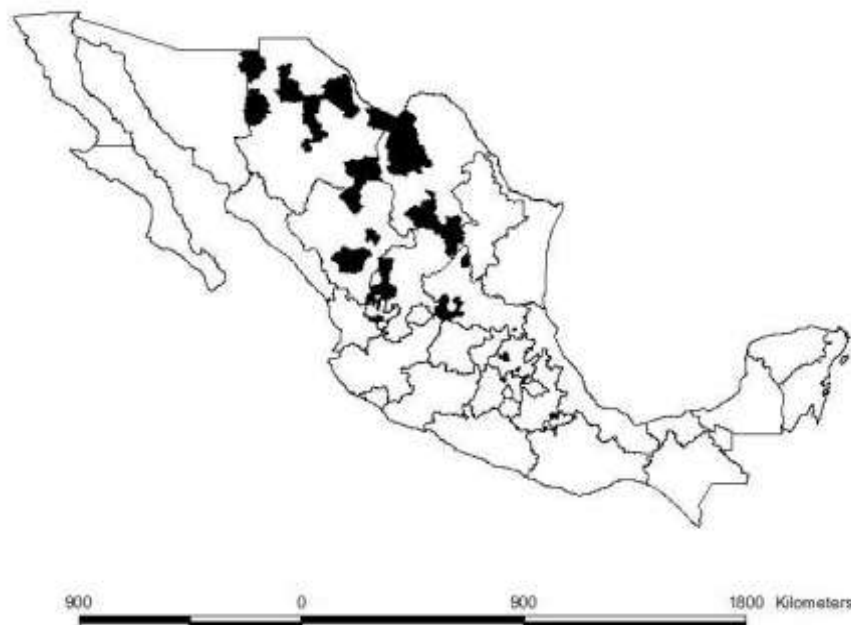
Distribución del género *Dasyilirion*

Las plantas del género *Dasyilirion* se extiende 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 (Figura 1). Forman parte del matorral desértico rosetófilo (MDR) que representa

aproximadamente el 12 % del área total del Desierto Chihuahuense (Rzedowski, 1965; Granados-Sánchez, 2011).

Para el estado de Coahuila se reportan cuatro especies; *D. cedrosanum* (en los municipios de Castaños, Cuatro Ciénegas, Monclova, Ocampo, Parras, Ramos Arizpe y Saltillo), *D. heteracanthum* (en Ocampo), *D. leiophyllum* (en Sierra Mojada) y *D. texanum* (en Monclova y Allende) (Bogler, 1994; Villarreal-Quintanilla *et al.*, 2001). La especie de mayor abundancia en el estado es *D. cedrosanum*, y a la par con *D. leiophyllum* y *D. duranguense* son especies con características y propiedades adecuadas para ser utilizadas en la producción de bebidas alcohólicas (López-Barbosa, 2005).

La zona de producción natural de *Dasyilirion* se ubica en la provincia fisiográfica de la Meseta Central, la cual se encuentra en un promedio de 1,000 a 2000 metros de altura sobre el nivel del mar, entre la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, zona compartida por los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2002). Las plantas se encuentran en laderas bajas, acantilados, terrenos planos, arroyos, en suelos bien drenados, calizos, calcáreos, en laderas de cenizas y afloramientos ígneos, rocosos o con grava, con contenido de arcilla (Bogler, 1994). Crecen en vegetación desértica, matorral, pastizal y bosque y se encuentran a 400-3000 m de altitud. En matorral xerófilo y submontano donde las condiciones de humedad relativa son bajas y la escasez de lluvias coincide con el tiempo más cálido del año. Las temperaturas diurnas son altas y pueden alternar con temperaturas nocturnas bajas. Los suelos presentan diversos grados de salinidad y tienen normalmente un pH superior a 7.0, son deficientes en materia orgánica y tienen baja capacidad de retención de agua (Reyes-Valdés *et al.*, 2019).



Fuente: Olhagaray (1994).

Figura 1. Distribución geográfica del sotol en México.

Descripción del género *Dasyllirion*

Son plantas perennes, dioicas, policárpicas que producen flores con estambres funcionales en las masculinas y con pistilos funcionales en las femeninas. Son de polinización cruzada y con número de 38 cromosomas reportados para las especies de *D. wheeleri*, *D. texanum* y *D. micropterum* (Satô, 1935; Hernández-Quintero *et al.*, 2015). Poseen numerosas hojas largas, lineares, flexibles y arrosetadas desde la base del tallo. Es posible ver algunas plantas con varios tallos, los cuales presumiblemente proceden de la misma semilla. Presenta tonalidad gris a verde pálido con espinas en los bordes, cuenta con un escapo o garrocha que puede llegar a medir hasta 6 m de altura, de la cual se desprende una inflorescencia con flores pequeñas en panícula, de color amarillo brillante

en las flores estaminadas y de color verde o púrpura en las flores pistiladas. Su fruto es una cápsula indehiscente que por lo general desarrolla una semilla o raramente dos, las cuales son trígonas, de color café oro y con una superficie más o menos plana y rugosa (Bogler, 1994; Hernández-Juárez *et al.*, 2008).

La inflorescencia es una característica distintiva del género *Dasyilirion*. Es una panícula angosta, compuesta, con forma de espiga, con un pedúnculo alargado y bráctido que varía de 1 a 6 m de longitud desde la base hasta la punta. Desde su proceso de germinación hasta la primera floración, transcurren de 12 a 15 años, por lo cual no es posible distinguir el sexo de una planta si no tiene escapo floral. Un estudio realizado en poblaciones de *D. cedrosanum*, muestra que la proporción de sexos se presenta en relación 1:1 sin encontrar sesgo en las proporciones entre los lugares de estudio (Reyes-Valdés *et al.*, 2017). A partir de la diferenciación de sexos, las plantas florecen de forma anual, excepto cuando se presentan sequias prolongadas. La inflorescencia del sotol se desarrolla en una estructura muy alta, llamada escapo o garrocha, las plantas hembra en un año productivo puede generar de 0.25 a 2.7 kg de semillas, las que caen de la inflorescencia al ser agitada por el viento. En promedio se pueden contar hasta 95,000 semillas por kilogramo (Sierra-Tristán *et al.*, 2008). Reyes-Valdés *et al.* (2012) encontraron que las flores masculinas como las femeninas presentan estructuras sexuales de su contraparte. Es decir, los machos tienen reminiscencias de pistilo, y las hembras los tienen de anteras, por lo cual la determinación sexual debe ser de tipo funcional más que anatómica.

Las flores estaminadas tienen una vida más larga que las pistiladas, y presentan seis estambres con filamentos más largos que el perianto. En las flores pistiladas el ovario es súpero, con tres lóculos simples, donde usualmente hay tres óvulos pequeños, de los cuales uno o raramente dos llegan a desarrollarse en semillas maduras.

Clasificación taxonómica del genero *Dasyllirion*

Actualmente el género *Dasyllirion* se encuentra clasificado dentro de la familia Asparagaceae y su nombre común depende del lugar en donde se encuentre (USDA, 2015). En Chihuahua se le llama sereque, que es un nombre indígena, en otros lugares como Coahuila se le llama sotol que es un nombre náhuatl, que proviene del vocablo Tzotollin. A los ejemplares de algunas especies se les llama varacuate (Coello-Coutino, 2003,).

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	<i>Dasyllirion</i>



Figura 2. *Dasyllirion cedrosanum*.

Sistemática del género *Dasyilirion*

El género *Dasyilirion* fue descrito por Zuccarini en 1838 y ha sido colocado en diferentes familias a lo largo de su historia, como Dracaenaceae (Takhtajan, 1980), Agavaceae (Cronquist, 1981), Nolinaceae (Dahlgren *et al.*, 1985) y Asparagaceae (APG-III, 2009). Las primeras descripciones se basaron solo en algunos pocos especímenes y algunas características que actualmente son más variables de lo que se suponía con anterioridad. Hutchinson (1934) y Cronquist (1981) lo relacionan fuertemente con los géneros *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus*, con los cuales comparte morfología, hábitat y características del fruto, incluyéndolo junto con *Agave* y *Yucca* en Agavaceae (*Agavaceae sensu lato*). Dahlgren *et al.* (1985) colocan a *Dasyilirion* y géneros relacionados en una familia separada, la Nolinaceae, y restringen a *Agave* y *Yucca* en la Agavaceae. Esto es soportado con un análisis filogenético realizado por Bogler en 1995, donde sus resultados indican claramente que *Dasyilirion*, *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus* se encuentran en un grupo que está más cercano a *Maianthemum*, *Polygonatum*, *Liriope*, *Dracaena* y *Sansevieria* que a *Yucca* y *Agave* (Actualmente *Yucca* y *Agave* se encuentran situados dentro de la familia Asparagaceae de acuerdo a APG III, 2009).

En la actualidad el género se ubica dentro de la familia Asparagaceae y subfamilia Nolinoideae (USDA, ARS, National Genetic Resources Program GRIN, 2015) e incluye 23 especies; *D. acrotrichum*, *D. berlandieri*, *D. cedrosanum*, *D. durangense*, *D. gentryi*, *D. glaucophyllum*, *D. graminifolium*, *D. leiophyllum*, *D. longissimum*, *D. longistylum*, *D. lucidum*, *D. miquihuanense*, *D. occidentalis*, *D. palaciosii*, *D. parryanum*, *D. quadrangulatum*, *D. sereke*, *D. serratifolium*, *D. simplex*, *D. texanum*, *D. treleasei*, *D. wheeleri* y *D. micropterum* (The plant list, 2013; Villarreal-Quintanilla *et al.*, 2016). Bogler (1994) menciona que las plantas de este género presentan algunas variaciones en cuanto a longitud y amplitud, la orientación de las espinas en el margen, la presencia o ausencia de cera epicuticular, así como la forma de su superficie foliar.

La identificación taxonómica de las especies en general es complicada e implica un adecuado conocimiento de caracteres morfológicos o rasgos singulares,

donde predominan las estructuras reproductivas como flores, frutos y semillas, que permiten separar o diferenciar una especie de otra (Figuroa-Yáñez *et al.*, 2012). La iniciativa de secuenciar un fragmento corto de ADN que sirva como identificador universal, mejor conocida como código de barras de la vida, es un complemento en la resolución e identificación de la variación existente entre las especies de *Dasyllirion*.

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 ADN 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 o taxonomía descriptiva, 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 (Gregory, 2005; Hebert y Gregory, 2005; Schindel y Miller, 2005).

Para poner en marcha este proyecto se creó la Secretaría del Barcode of Life en el National Museum of Natural History, Washington DC, USA y el CBOL (Consortium for the Barcode of Life) en el 2004, cuya función es igual a la de una biblioteca universal, que relaciona cada barcode o “secuencia de ADN diagnóstica” con especies de referencia o «vouchers» asignados a nombres de la clasificación linneana, depositados en instituciones científicas (Lanteri, 2007). La metodología de código de barras de ADN 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 lo cual la CBOL sugiere la combinación de dos regiones plastídicas; *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).

Aplicaciones del código de barras de la vida

La utilidad de las secuencias barcode, además de funcionar como medios de identificación y generación de inventarios de biodiversidad es auxiliar en la revisión de clasificaciones taxonómicas dudosas. Es un enfoque que ayuda en la identificación de especies que necesitan estudios taxonómicos detallados y permiten evaluar las relaciones filogenéticas entre especies. Un ejemplo de aplicación es la diferenciación taxonómica de plantas medicinales que por su similitud con otras pueda confundirse. Es un enfoque que se utiliza en el manejo de especies invasoras, en el control del 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 (Valentini *et al.*, 2009; Janzen *et al.*, 2009; Paz *et al.*, 2011).

Código de barras de la vida y el género *Dasyllirion*

Recientemente Villarreal-Quintanilla *et al.* (2016) lograron describir una nueva especie, *Dasyllirion micropterum*, auxiliándose con la secuenciación de los genes plastídicos *matK* y *rbcL*. Esta especie fue encontrada en las partes altas de la Sierra Madre Oriental entre los límites de Coahuila y Nuevo León a 2700 - 2850 m de altitud. Presenta algunas características morfológicas semejantes a *D. miquihuanense* como hojas ascendentes de color verde oscuro, frutos de menos de 7 mm de largo y alas de fruto de menos de 2 mm de ancho. Entre sus características distintivas destacan, hojas planas y papilosas, una inflorescencia más larga, menos ramas laterales en la inflorescencia y frutos más pequeños, con alas de fruto más estrechas. Para corroborar definitivamente como nueva

especie se compararon las secuencias plastídicas de ambas especies, así como de *D. serratifolium* y *D. wheeleri* del GenBank (NCBI). No se encontró variación en las secuencias *rbcL* entre especies, mientras que en las secuencias *matK* se encontraron de 2 a 6 sustituciones nucleotídicas entre especies pareadas

Actualmente se encuentran cinco registros del gen *matK* para especies de *Dasyllirion* en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Dos corresponden a *D. serratifolium*, uno para *D. wheeleri*, uno para *D. miquihuanense* y uno para *D. micropterum*. Para *rbcL* existen seis registros, tres de ellos de *D. wheeleri*, uno para *D. serratifolium*, uno para *D. miquihuanense* y uno para *D. micropterum*.

Información de ADN y análisis filogenético

Una de las concepciones fundamentales de la biología, es que los seres vivos contemporáneos están conectados entre sí por relaciones de parentesco y que descienden de ancestros comunes, más o menos alejados en el tiempo. Entre más reciente haya sido el ancestro entre dos seres vivos se espera una mayor similitud entre estos organismos. La representación gráfica de estas relaciones de parentesco se representa por un árbol filogenético, una estructura matemática que describe las relaciones de parentesco, ancestría y descendencia entre los diferentes elementos de un conjunto (Martínez-Castilla, 2007). Su construcción se basaba principalmente en el estudio de caracteres morfológicos y fisiológicos (Figura 3).

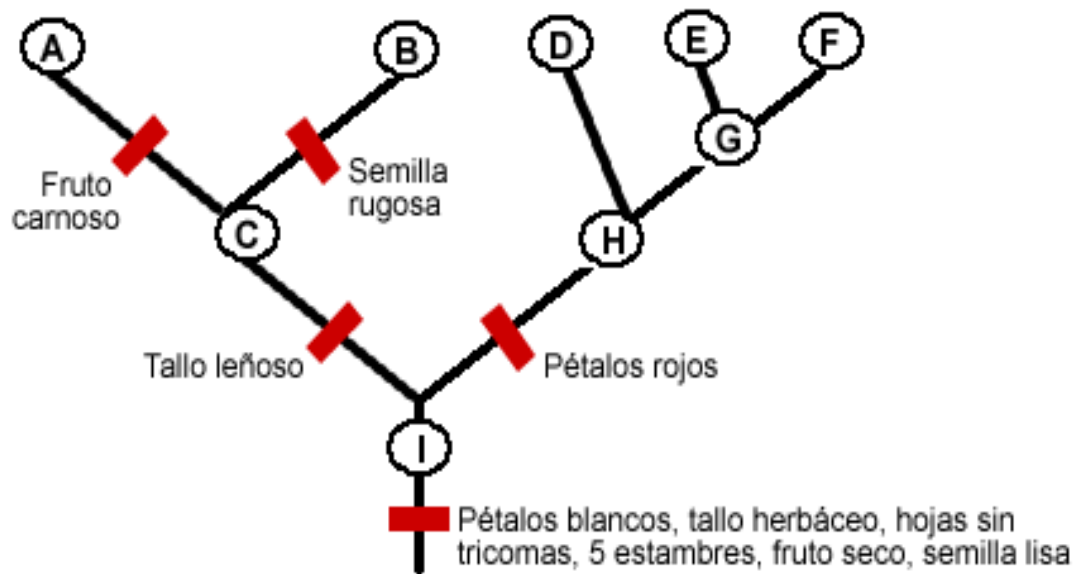


Figura 3. Ejemplo de árbol filogenético construido con base en características morfológicas, que muestra la diversificación de una especie ancestral en cinco especies presentes en la actualidad.

Con el advenimiento de la biología molecular que se desarrolló a partir del descubrimiento del ADN y su estructura (Watson y Crick, 1953) y con la obtención de las secuencias de las primeras proteínas y genes (Sanger *et al.*, 1977), la tendencia actual es la construcción de la filogenia basada en el estudio de la variabilidad del material genético, lo que da lugar a la filogenia molecular (Figura 4). Se basa en el estudio de los cambios heredados y no en los influenciados por el medio ambiente. Entre las técnicas moleculares que se pueden utilizar para la construcción de un árbol filogenético se encuentran, la secuenciación de un gen o región particular, ya sea nuclear, mitocondrial o de cloroplasto (*matK*, *rbcl*). También se usan marcadores polimórficos, entre los que se encuentran: RFLP, RAPD, AFLP y SNP o microsatélites.

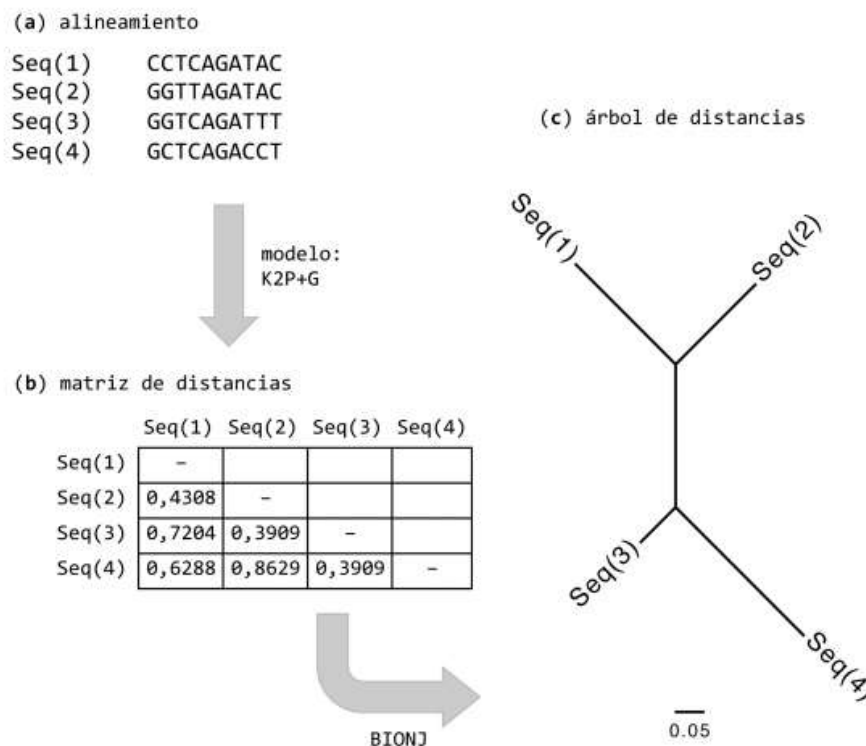


Figura 4. Ejemplo de árbol filogenético construido con base en distancias genéticas. Partiendo de un a) alineamiento múltiple, b) una matriz de distancias utilizada para estimar c) el árbol filogenético (Abascal *et al.*, 2014).

Generalmente un diagrama árbol está conformado por nodos conectados por ramas que unen a diferentes unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Estos, representan secuencias u organismos de entidades biológicas vivas o existentes. Los nodos internos representan a los ancestros hipotéticos y la longitud de las ramas representa la cantidad de cambio acumulado. La rama más interna es el ancestro común y representa la raíz del árbol (Martínez-Castilla, 2007). La construcción de árboles a partir de secuencias produce árboles sin raíz. Para enraizar el árbol se incluye una secuencia externa al grupo de interés que le confiera al árbol un sentido filogenético (Abascal *et al.*, 2014).

Existen diferentes métodos de reconstrucción filogenética, algunos más utilizados a partir de datos de secuencias de ADN o proteínas y otros más utilizados a partir de caracteres morfológicos. Estos pueden ser clasificados según se basen en: distancias genéticas, máxima parsimonia, máxima

verosimilitud y métodos bayesianos. La distancia es una medida del grado de divergencia entre dos secuencias homologas y se define como el número de sustituciones acumuladas entre ellas desde que divergieron de un ancestro común. Los métodos de máxima parsimonia operan seleccionando los árboles filogenéticos que minimizan el número de eventos evolutivos necesarios para explicar un conjunto de datos. Están implementados en una enorme variedad de algoritmos de búsqueda que tratan de encontrar el árbol más parsimonioso (el más simple). Dentro de los métodos basados en caracteres morfológicos, se incluyen máxima verosimilitud e inferencia bayesiana; ambos tratan la inferencia filogenética como un problema estadístico, y utiliza modelos explícitos de evolución molecular para el cálculo de probabilidades (Abascal *et al.*, 2014).

Existen diferentes modelos de sustitución nucleotídica que sirven para calcular distancias genéticas o probabilidades de cambio entre nucleótidos a lo largo de las ramas de un árbol filogenético. El punto de partida es el alineamiento múltiple, que consiste en el apareamiento de posiciones homólogas entre caracteres (nucleótidos) de las distintas secuencias (Abascal *et al.*, 2014; Schliep, 2011). Los modelos de sustitución nucleotídica son descripciones matemáticas de la evolución de las secuencias y constituyen el engranaje que permite conectar los datos (alineamientos) con los métodos de reconstrucción filogenética (Posada, 2008). Los modelos tienen dos tipos de parámetros principales: las probabilidades de cambios entre estados (nucleótidos, aminoácidos o codones) y las frecuencias de estos nucleótidos, aminoácidos o codones en nuestro alineamiento.

El modelo de evolución o sustitución de nucleótidos más sencillo es el propuesto por Jukes-Cantor y asume que cualquier cambio entre nucleótidos tiene la misma probabilidad de ocurrir y que las frecuencias de los cuatro nucleótidos son iguales. El modelo de Kimura de 2-parámetros distingue entre transiciones (purina a purina o pirimidina a pirimidina) y transversiones (purina a pirimidina y viceversa) y asume que la frecuencia de los diferentes nucleótidos es igual (Yang y Rannala, 2012). El modelo general es de los más complejos (GTR, "general time reversible"), ya que utiliza un parámetro distinto para

modelar cada una de las sustituciones entre nucleótidos y sus frecuencias, además de considerar que no todas las regiones de la secuencia evolucionan a la misma velocidad, la tasa de sustitución puede variar a lo largo de toda la secuencia. La variación de tasas entre sitios puede tenerse en cuenta en formas diferentes. Se puede describir como una distribución gamma +G (gamma shape), mientras que la otra forma es asumir que una proporción del alineamiento es invariable (completamente conservadas). Este parámetro se describe como +I (proportion of invariable sites), ambos pueden utilizarse en conjunto (+I+G). Programas como ModelTest ofrecen la facilidad de probar todos los modelos y recomendar cual utilizar (Abascal *et al.*, 2014).

A partir de la matriz de distancias podemos emplear métodos de agrupamiento para contruir arboles filogenéticos. Entre los más utilizados se encuentra el método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) basado en la identificación de las parejas más similares y en el cálculo de la media de las distancias entre ellas y el resto de las secuencias para construir el árbol. Se recomienda usarlo si se cumple la hipótesis de reloj molecular (todas las secuencias han evolucionado a la misma velocidad) ya que genera árboles ultramétricos. Por su parte el método Neighbor-Joining no genera árboles ultramétricos, por lo tanto, es más recomendable si no se cumple la hipótesis de reloj molecular (dos Reis *et al.*, 2016).

Existen diferentes métodos para calibrar árboles filogenéticos, es decir que la longitud de las ramas de dichos árboles sea proporcional al tiempo transcurrido de los eventos de divergencia que las delimitan. Para esto se utilizan datos de registros fósiles que ayudan a establecer las edades de las ramas y nodos. Es bien conocida la existencia de fósiles de monocotiledóneas desde el Cretácico temprano. Estructuras como, el polen asignado a *Liliacidites*, restos de hojas asignadas a *Acaciaephyllum* y polen perteneciente a Araceas son ejemplo de ello (Friis *et al.*, 2004; Magallón y Sanderson, 2001). Si se desconoce el registro fósil se puede emplear como dato de calibración la tasa de sustitución del fragmento (gen) que se está utilizando, que por lo general se reporta en sustituciones por sitio por millones de años (Luo y Ho, 2018).

Especies de *Dasyilirion* colectadas

Dasyilirion palaciosii

Es una planta de tallo corto de 0.5 m de altura. Hojas numerosas, planas, estriadas, hasta de 1 m de largo por 1.5 m de ancho; de color verde claro y ligeramente glauco, opacas: el margen amarillento, finamente denticulado, con espinas escasas antrorsas, rudimentarias y presentes en los primeros 10 cm de la parte verde de la hoja; parte apical cóncavo-hemisférica: punta roma pero no apinzelada. La inflorescencia es paniculada, leñosa, estrecha de 2 - 3 m de altura. Los frutos son cápsulas ovadas a redondas, contienen una semilla, de 7 a 9 mm de largo y de 6 a 8 mm de ancho. Las semillas son triangulares de color marrón claro de 3.5 mm de largo y 3 mm de ancho. Es endémico de San Luis Potosí en altitud de 1700 m. Crece en terreno abierto, plano o en bosques abiertos en laderas pedregosas asociadas con *Yucca potosina* y *Agave striata* (Figura 5). En apariencia es similar a *Dasyilirion glaucophyllum* Hook. (Rzedowski, 1955).



Figura 5. Planta de *Dasyilirion palaciosii* (Foto: Humberto Reyes).

Dasyilirion texanum

Es una planta de tallo corto usualmente menor a 0.5 m con una o varias rosetas medianas de 10 - 25 cm de diámetro. Hojas en cuchara estrechas y brillantes de 4 - 7 cm de ancho en la base y de 9-15 cm de largo, que se contraen gradualmente; miden de 0.8 a 1.5 (2) cm de ancho y de 70 a 130 cm de largo. Su superficie es lisa, glabra, generalmente brillante de color verde oscuro. Las puntas enteras intemperizadas. Las espinas por lo general se encuentran curvadas hacia la punta de la hoja. Su inflorescencia de 2 a 4 m de altura de color verde a bronceado, brácteas estériles lanceoladas, estraminosas muy suaves. Fruto elíptico obovado de 4 - 5 mm de ancho y 5 – 5.6 mm de largo. Se distribuye en el centro-sur de Texas y en Coahuila en la región de Monclova y Sierra del Pino, abundante en las laderas rocosas y secas, así como en las crestas a lo largo de la alta cordillera oriental de dicha sierra; al este de la Noria y en Nuevo León (Figura 6) (Bogler, 1994).



Figura 6. Planta de *Dasyilirion texanum* (Foto: Humberto Reyes).

Dasyilirion occidentalis

Forma un tallo de 0.4 a 0.8 m de altura. Las hojas lisas, gruesas, variables, finamente cerosas y azuladas con una longitud de 80 – 100 cm y de 8 - 16 mm de ancho. En los bordes de las hojas se reconocen las espinas finas, dispuestas irregularmente. La inflorescencia leñosa paniculada es de 3 – 4 m de altura. Las flores numerosas de color amarillo. El período de floración es de mayo a agosto. Los frutos son cápsulas ovadas conteniendo una semilla, con 5.5 a 6 mm de longitud y 3.5 a 6 mm de ancho. Las semillas son triangulares de 3 a 3.5 mm de largo y 2.5 mm de ancho (Figura 7). Se distribuye en los estados de Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco y Guanajuato a una altitud de 1900 – 2300 m. Crece en áreas desérticas en terreno abierto y plano, en laderas pedregosas asociadas con *Yucca decipiens*, *Agave durangensis* y algunas especies de *Opuntia*. Son típicas las hojas largas, suaves y variables con las puntas finas y espesas (Hochstätter, 2011).



Figura 7. Planta de *Dasyilirion occidentalis* (Foto: Martha Orozco).

Dasyilirion leiophyllum

Plantas típicamente grandes y robustas, con pequeñas coronas, troncos de 1 m, erectos o reclinados. Hojas elongadas, rígidas, de color verde brillante de 90 - 110 cm de largo por 1.5 - 2(3) cm de ancho, por encima de la base ensanchada, generalmente lisa, brillante, glabra, no cesora. Espinas en su mayoría retrorsas. Inflorescencias de 2.5 - 5 m, tallo de 3 – 5 cm de diámetro. Ramas en su mayoría basales, erectas de 4 – 10 cm; brácteas lanceoladas. Flores con receptáculos de 0.2 – 0.4 mm, tépalos blanquecinos o verdosos de 1.8 – 2 x 1 mm. Cápsulas elipsoidales a ovoides. Floración principalmente de junio a julio (Figura 8). Se distribuye al sur de Texas en la región del Río Grande, Nuevo México, centro de Chihuahua y Coahuila. Crece sobre grava caliza y laderas ígneas a 1200 – 1800 m (Flora of North America, 1993).



Figura 8. Planta de *Dasyilirion leiophyllum* (Foto: Martha Orozco).

Dasyilirion quadrangulatum

Planta perene con troncos verticales leñosos de hasta 3 m de altura, en ocasiones postrados, solitarios o con ramificaciones en la base. Sus hojas en rosetas densas son estrechas, frágiles, cuadranguladas, vaina de 5-6 cm en la base por 13-14 cm de largo, rectangulares, abruptamente constreñido en la unión con la lámina, ápice con 1-2 aurículas 1-1.5 cm; lamina en la base plana romboide 7-9 mm de ancho, rápidamente adelgazando y haciéndose cuadrangular hacia la punta de 4 – 6 mm de ancho, por 80-90 cm de largo, superficie lisa, con pocas papilas, verde oscuro opaco, espinas completamente ausentes. Inflorescencia de 3-6 m de altura, pedúnculo de 5-7 cm de diámetro en la base, frutos rojizos cuando inmaduros, elípticos – ovados de 7.5-8 mm de largo por 5-6 mm de ancho. Semillas simple u ocasionalmente dos de 2.5 x 2 mm. Crece en elevaciones de 1800-2000 m al sur de Nuevo León y suroeste de Tamaulipas (Figura 9) (Bogler, 1998).



Figura 9. Planta de *Dasyilirion quadrangulatum* (foto: Martha Orozco).

En el Cuadro 1, se presenta un comparativo entre las cinco especies de *Dasyllirion* que se incluyen en esta investigación, en el presentan de forma resumida algunas de las características más representativas y distintivas de cada una de las especies.

Cuadro 1. Comparativo entre características morfológicas de cinco especies de *Dasyllirion*

Especie	<i>D. palaciosii</i>	<i>D. texanum</i>	<i>D. occidentalis</i>	<i>D. leiophyllum</i>	<i>D. quadrangulatum</i>
Tallo	0.5 m	< 0.5 m	0.4-0.8 m	1 m	3 m
Hojas	Planas y anchas	Planas y anchas	Planas y anchas	Planas y anchas	Cuadrangulares y estrechas
Espinas en bordes	Presentes	Presentes	Presentes	Presentes	Ausentes
Longitud de hojas	1-1.5 m	0.7-1.3 m	0.8 -1.0 m	0.9 -1.1 m	0.8-0.9 m
Inflorescencia	2-3 m	2-4 m	3-4 m	2.5-5 m	3-6 m
Fruto	7-9 x 6-8 mm	5-5.6 x 4-5 mm	5.5-6 x 3.5-6 mm	6-7 x 4-4.5 mm	8-12 x 5-8 mm
Semilla	3.5-3 mm	--	3-3.5 x 2.5 mm	--	7.5-8 x 5-6 mm
Altitud	1700 m	600-1800 m	1900 m	1200-1800 m	1800-2000 m
Distribución	San Luis Potosí	Sur de Texas, Coahuila y Nuevo León	Zacatecas Aguascalientes Jalisco y Guanajuato	Sur de Texas, Nuevo México, Chihuahua y Coahuila	Nuevo León

Potencial nutritivo de la semilla de sotol (*Dasyllirion cedrosanum*)

Las plantas del género *Dasyllirion* se caracterizan principalmente por su uso en la elaboración de la bebida alcohólica llamada sotol. Esta actividad requiere la obtención completa de la planta sin necesidad que esta llegue a floración. Para que de una planta de sotol emerja la primera inflorescencia deben pasar de 12 a 15 años después de su germinación. La demanda de plantas para la

producción de alcohol evita que éstas lleguen a la producción de semilla, estructura de vital importancia para su reproducción.

La producción de semilla en las plantas de *Dasyllirion* es muy variable, cada una llega a producir entre 0.25 y 2.75 kg por inflorescencia con cerca de 95,000 semillas por kg (Reyes-Valdés *et al.*, 2012). Se caracterizan por ser trígonas, de color café oscuro, de superficie plana y rugosa. Su mejor época de cosecha es entre octubre y diciembre, dependiendo del temporal de lluvias (Sierra-Tristán y Morales-Nieto, 2003). Las semillas son el medio de propagación de esta planta y fuente de alimento para aves y animales silvestres (Figura 10). Los estudios dirigidos a la semilla de sotol se han centrado principalmente en su capacidad de germinación (Villavicencio-Gutierrez *et al.*, 2007) y no se tienen antecedentes de formas de aprovechamiento de su semilla como recurso natural.

Una de las características de las espermatofitas es su capacidad para transformar un porcentaje de su energía en energía alimenticia la cual es concentrada en sus semillas en forma de proteínas, carbohidratos y lípidos. En general, las semillas son fuentes de diferentes compuestos lipídicos, incluyendo ácidos grasos, tocoferoles, triglicéridos, fosfolípidos y esteroides. Dependiendo de la especie, tales compuestos se encontrarán en diferentes concentraciones (Matthäus *et al.*, 2003).

Las semillas contienen una cierta cantidad de proteínas importantes en el desarrollo de estructuras celulares y el metabolismo humano (Herman, 2014). Algunas semillas contienen elementos de gran importancia para los seres humanos, incluidos los macro y micro elementos como el hierro (Fe), de importancia en el crecimiento y metabolismo de las células; magnesio (Mg), el cual interviene en la formación de neurotransmisores y en el funcionamiento de las coenzimas, manganeso (Mn); importante en la formación enzimática, zinc (Zn); necesario para el sistema inmunológico, cobre (Cu); contribuye a la formación de glóbulos rojos, calcio (Ca); en la formación de huesos y dientes e imprescindible en el proceso de coagulación de la sangre y fósforo (P) que forma parte de las moléculas de la energía como el ATP y ADP (Tyler y Zohlen,

1998). Uno de los objetivos adicionales de esta investigación es determinar el contenido nutricional de la semilla de sotol en tres localidades del Noreste de México, encaminado a la probable utilización de esta semilla como fuente alimenticia para humanos o animales.



Figura 10. Semilla de *Dasyliirion cedrosanum*.

Germinados y sus propiedades

El proceso de germinación se define como el proceso natural biológico que llevan a cabo las plantas superiores, por medio del cual la semilla sale de su estado de latencia una vez que las condiciones ambientales mínimas para su crecimiento, como humedad, temperatura y concentración de oxígeno se dan (Sangronis y Machado, 2007). Las semillas germinadas de cultivos comestibles como las legumbres o los cereales son también llamadas brotes comestibles o germinados y han sido consumidos desde tiempos milenarios por culturas asiáticas, quienes además los consideraban como remedios medicinales en el tratamiento del escorbuto (deficiencia de vitaminas). Una enfermedad muy común entre los tripulantes de barcos que realizaban viajes por un periodo prolongado de tiempo.

De manera natural las semillas son fuente de compuestos nutritivos como proteínas, minerales, grasas y carbohidratos. Sin embargo, para que estos compuestos puedan ser digeridos por el organismo humano, las semillas necesitan pasar por un proceso de cocción que facilite su consumo. El proceso de germinación además de aumentar significativamente el contenido y tipo de nutrientes dentro de la semilla, los hace más fácil de digerir y aumenta la disponibilidad de los mismos.

Cuando un grano o semilla germina, se llevan a cabo numerosas reacciones químicas y enzimáticas que darán lugar a la nueva plántula, transformando en pocas horas su composición química. Aumenta la concentración de agua en su interior, los almidones se transforman en azúcares simples (dextrosa y maltosa), aumenta la concentración de proteínas que fácilmente se descomponen en aminoácidos, se incrementan aminoácidos y se sintetizan algunos que no existían, se incrementa el volumen de alimento (se obtiene gran cantidad de brotes a partir de pocas semillas), aumenta el contenido vitamínico, las grasas se convierten en ácidos grasos libres, los minerales se incrementan y son biológicamente asimilables, se incrementa la síntesis de clorofila, se eliminan sustancias tóxicas (ácido fítico y ácido oxálico) y los brotes se convierten en producto pre digerido, lo que facilita su asimilación digestiva y mejora la energía corporal (Jensen, 1994; Botero, 2015).

Los germinados son considerados alimentos vivos y entre los más apreciados por su blandura y su sabor se encuentran los de legumbres y cereales, como alfalfa, amaranto, arveja, brócoli, cebada, frijol, garbanzo, girasol, lenteja, maíz, quinua, rábano, soya, trébol, trigo, ajonjolí entre otros (Urbano *et al.*, 2004; Botero, 2015; Sangronis y Machado, 2007).

D. cedrosanum es la especie más abundante dentro del género *Dasyilirion* y su semilla es comúnmente consumida por roedores o animales silvestres en zonas áridas. Son numerosas y su producción podría representar una alternativa en la obtención de germinados de calidad nutritiva (Figura 11). Esta fuente sería de gran aporte a la dieta humana, siempre y cuando se descarte la presencia de compuestos tóxicos para la salud. En esta investigación se busca dar el primer

paso en la obtención de germinados de semilla de sotol, con enfoque hacia la obtención de brotes para consumo humano, que aporten sustancias de interés nutricional.



Figura 11. Germinado de semilla de sotol (*D. cedrosanum*)

MATERIALES Y MÉTODOS

Código de barras de la vida

Colecta de material vegetal

Se utilizó material vegetativo de cinco especies diferentes del género *Dasyilirion*, el cual fue colectado de cinco localidades al norte de México (Figura 12). Cada ejemplar fue etiquetado, georreferenciado y las muestras se recolectaron de hojas sanas y jóvenes de seis ejemplares diferentes de cada especie (Cuadro 2). Previo a la extracción de ADN, el material fue lavado con una solución de hipoclorito al 1 % y posteriormente con etanol al 70 % por un minuto. Al final se lavó con agua estéril y se dejó secar sobre toallas de papel.

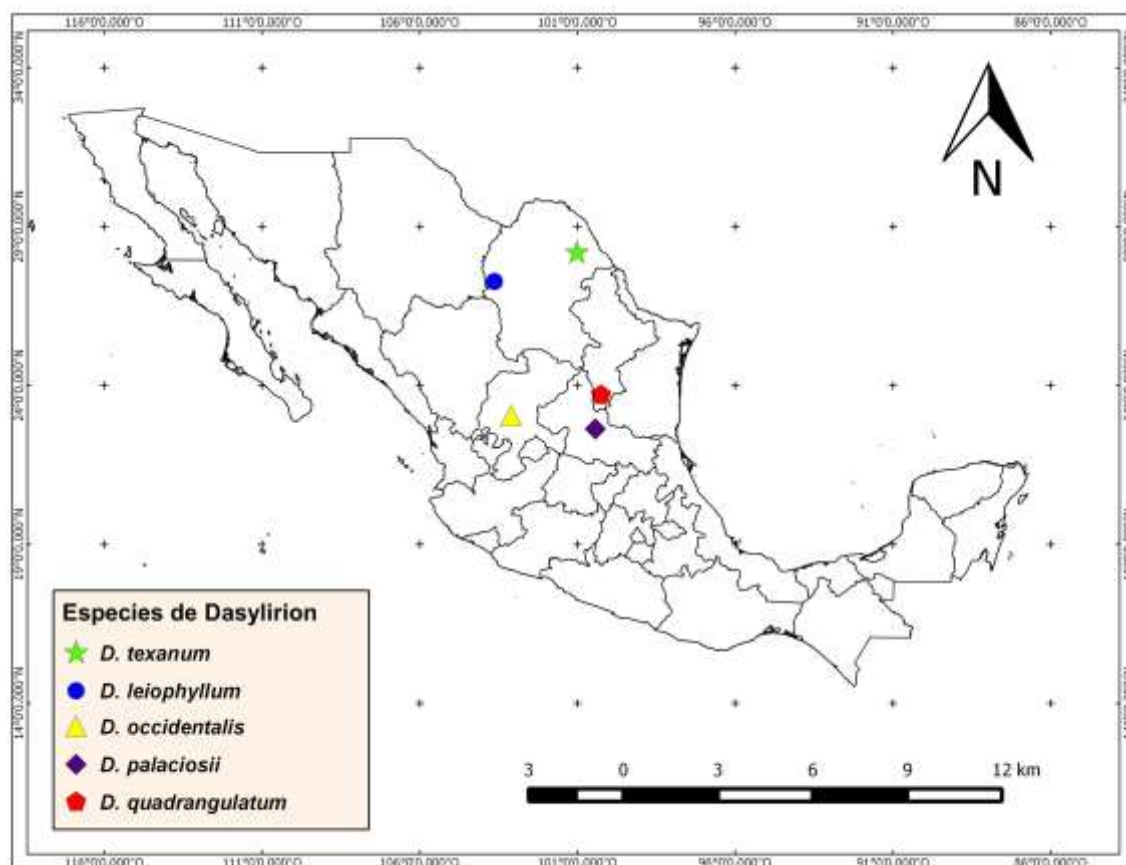


Figura 12. Sitios de colecta de material vegetal de especies de *Dasyilirion*. Las localidades comprenden los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas.

Cuadro 2. Georreferencias de las especies de *Dasyilirion* colectadas

Especies	Lugar de colecta	Coordenadas		Altitud (msnm)
		Latitud	Longitud	
<i>D. texanum</i>	Allende, Coahuila	28°10'12.6"	101°00'49.6"	520
<i>D. leiophyllum</i>	Sierra Mojada, Coahuila	27°16'19.3"	103°38'2.9"	1344
<i>D. occidentalis</i>	San Juan de Hornillos, Zacatecas	23°03'645"	103°06'286"	2280
<i>D. palaciosii</i>	Guadalcazar, San Luis Potosí	22°37'57.8"	100°25'57.0"	1885
<i>D. quadrangulatum</i>	Dr. Arroyo, Nuevo León	23°41'55.0"	100°15'9.3"	1857

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de las diferentes especies, se utilizó la metodología de Lopes *et al.* (1995) modificada. Se colocaron 20 mg de tejido fresco en un mortero estéril y se molieron con N₂ líquido; el polvo resultante se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se agregaron 800 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH = 8, NaCl 20 mM, EDTA 20 mM pH = 8.0 y N-Lauril-sarcosina al 1 %), se mezcló completamente y se dejó reposar por 10 minutos. Se agregaron 800 µl de fenol (Sigma, Phenol Solution, equilibrado con Tris HCL 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) para biología molecular, se agitó en un vortex y se centrifugó por 20 min a 4 °C a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 100 µl de ARNasa en concentración de 10 mg/ml y se mezcló por inversión. Se agregaron 800 µl de isopropanol frío (-20 °C), se mezcló hasta formar la madeja de ADN, la cual se colectó con un gancho de pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo nuevo eppendorf de 1.5 ml. La pastilla se lavó con 200 µl de alcohol al 70 % (-20 °C) y se decantó. Se dejó secar por 15 minutos y se resuspendió en agua destilada estéril, donde se mantuvo en refrigeración a 4 °C. Para su visualización se corrió un gel de agarosa al 1%, con solución TBE 0.5 X (Tris base, ácido bórico y EDTA) al cual

se adicionó colorante Gel Red Nucleic Acid BIOTUM, en proporción de 1µl por cada 10 ml de gel de agarosa. Se cargaron 6 µl de la muestra más 3 µl de buffer de carga (Trackit™).

Para determinar la concentración y calidad de las muestras de ADN obtenidas, se utilizó un NanoDrop ND-1000 (Software ND-1000), el cual proporciona lecturas a partir de 1 µl de muestra concentrada. Los valores de concentración son reportados en ng/µl y la calidad se determina por la relación entre la lectura de absorbancia a 260nm, para ácidos nucleicos y a 280nm para proteínas (260/286), donde valores entre 1.6 y 1.8 son indicativos de pureza en las muestras. Para llevar a cabo el proceso de amplificación se prepararon diluciones de ADN a una concentración final de 50 ng/µl en agua estéril.

Análisis de complementariedad con iniciadores *matKF 390* y *matKR 1326*

Los iniciadores universales *matK 390F* (5'- CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C- 3') y *matK 1326R* (5'- TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T-3') propuestos por Cuénoud *et al.*, (2002), fueron útiles en la amplificación del gen *matK* en las especies de *D. micropterum* (KU535883.1) y *D. miquihuanense* (KU535884.1), registradas actualmente en el GenBank del NCBI. Sin embargo, no funcionaron para las especies de *D. texanum*, *D. leiophyllum*, *D. occidentalis* y *D. palaciosii*. Para determinar la falla en el proceso de amplificación se realizó un análisis de complementariedad, con la herramienta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool).

Los oligonucleótidos *matK 390F* y *matK 1326R* se alinearon con las secuencias completas del gen *matK* de *D. wheeleri* (HM640588.1) y *D. serratifolium* (HM640587.1), dos únicos registros de genes completos para el género *Dasyllirion* en el GenBank (Kim y Kim, 2010). Se encontró un error de coincidencia entre dos de las bases nucleotídicas del iniciador *matK 390F* con respecto a las secuencias del GenBank mencionadas (Figura 13). Este resultado explica en gran parte la ausencia de bandas de amplificación en algunas especies y en otros casos la obtención de secuencias de baja calidad.

Por lo anterior se propuso diseñar nuevos iniciadores *matK* para las especies de *Dasyilirion* colectadas.

a) *Dasyilirion wheeleri* voucher Chase 3469(K) maturase K (*matK*) gene, complete cds; chloroplast

Sequence ID: [HM640588.1](#) Length: 1560 Number of Matches: 11

▶ [See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 400 to 421 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.004	20/22(91%)	0/22(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	22		
Sbjct 400	CGATCAATTCATTCAATTTTTC	421		

b) *Dasyilirion serratifolium* voucher Abisai et al., s.n.(RSA) maturase K (*matK*) gene, complete cds; chloroplast

Sequence ID: [HM640587.1](#) Length: 1560 Number of Matches: 11

Range 1: 400 to 421 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.004	20/22(91%)	0/22(0%)	Plus/Plus
Query 1	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	22		
Sbjct 400	CGATCAATTCATTCAATTTTTC	421		

Figura 13. a) Alineamiento del iniciador *matK* 390F con la secuencia del gen completo *matK* de *D. wheeleri* registrada en GenBank-NCBI, b) Alineamiento del iniciador *matK* 390F con la secuencia del gen completo *matK* de *D. serratifolium* registrada en el GenBank.

Diseño de iniciadores *matK*

Para la obtención de los nuevos iniciadores se utilizaron los programas Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000), FastPCR Professional 6.6 (Kalendar *et al.*, 2017) y la secuencia completa del gen *matK* de la especie *D. wheeleri* (HM640588.1) registrada en el Gen Bank (Kim y Kim, 2010). De los iniciadores generados se eligieron aquellos que presentaron el mayor porcentaje de complejidad lingüística y mayor eficiencia en PCR *in silico* (*matK* 335F y *matK* 1327R), evaluados a través del programa FastPCR (Cuadro 3). Se buscó que la zona amplificada coincidiera con la mayor parte de la región intercalada entre los dos iniciadores universales (Jing *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Iniciadores *matK* generados en Pirmer3Plus y probados en FastPCR.

Iniciador	Secuencia (5'- 3')	Complejidad	Eficiencia PCR <i>in</i>
		lingüística	<i>silico</i>
			%
<i>matK</i> 335F	TTTCATTCTCGTTGCGATTAG	85	80
<i>matK</i> 1327R	ACTTTATTCGATACAAACCCTGTT	93	80
<i>matK</i> 413F	CAATTTTTCCCTTTTTAGAGGACA	79	81
<i>matK</i> 1409R	GAACCCAATCTTCGCAAAA	71	79

Amplificación con nuevos iniciadores *matK*

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

Amplificación con iniciadores *rbcL*

Para la amplificación del gen *rbcL*, se utilizaron los iniciadores reportados por Levin *et al.*, (2003) y Kress y Erickson, (2007) (Cuadro 4). Cada reacción contenía 5 μ l de Standard *Taq* Buffer 10X, 0.25 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de primer Forward 10 μ M, 1 μ l de primer Reverso 10 μ M, 0.25 μ l de *Taq* polimerasa, 11.0 μ l de agua libre de nucleasas, 25 μ l de Trehalosa, 2.5 μ l de MgCl y 4 μ l de ADN templado (50 ng/ μ l en agua estéril).

Cuadro 4. Iniciadores *rbcL* utilizados para la amplificación.

Iniciador	Secuencia 5´- 3´	Sentido	Tm (°C)	Referencia
<i>rbcLaF</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Derecho	61.3	Soltis <i>et al;</i> (1992) modificado por Levin <i>et al;</i> (2003)
<i>rbcLaR</i>	GTAAAATCAAGTCCACCRCG	Izquierdo	57.9	Fofana <i>et al;</i> (1997) modificado por Kress and Erickson; (2007)

El programa de termociclador utilizado para cada iniciador se presenta en la Cuadro 5. En ambos casos para la visualización de los productos de PCR, se corrió un gel de agarosa al 1% con TBE 0.5 X, adicionado con GelRed Nucleid Acid BIOTUM en proporción de 1µl 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 min, posteriormente se observó en un fotodocumentador.

Cuadro 5. Programa del termociclador para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ciclos	Fases	Temperaturas		Tiempo (min)
		<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	
	Desnaturalización inicial de ADN	94.0 °C	94.0 °C	4:00
40	Desnaturalización	94.0 °C	94.0 °C	0:30
	Hibridación	61.0 °C	57.8 °C	0:35
	Extensión	72.0 °C	72.0 °C	0:35
	Extensión final	72.0 °C	72.0 °C	10:00

Secuenciación

El proceso de secuenciación de los productos de PCR obtenidos para cada especie, se llevó al cabo en el Laboratorio de Servicios Genómicos

(LabSerGen) de la Unidad de Genómica Avanzada-CINVESTAV, Irapuato, Gto. La secuenciación se realizó en ambos sentidos, con un secuenciador 3730xl DNA Analyzer Applied Biosystems.

Calidad de secuencias nucleotídicas

Las secuencias *matK* y *rbcL* obtenidas para cada especie se evaluaron a través del programa FinchTV versión 1.4.0. Permite visualizar los electroferogramas de cada reacción de secuenciación, donde cada base nucleotídica está representada por un pico de diferente color (verde para adenina, rojo para timina, azul para citosina y negro para guanina). La intensidad de cada pico determina el orden más probable de las bases dentro de la cadena. El programa proporciona un valor de calidad denominado como “valor de calidad Q”. Este valor calculado como el logaritmo base 10 de la probabilidad de error multiplicado por -10, representa la factibilidad de identificar una base nitrogenada en una posición específica dentro de una secuencia. De manera que valores de $Q = 10$ (Q_{10}), representan la probabilidad de error de uno en diez ($1/10$), valores de $Q = 20$, representa la probabilidad de error de uno en cien ($1/100$), valores de $Q = 30$, representa la probabilidad de error de uno en mil ($1/1000$) y $Q = 40$ de uno en 10 000 ($1/10\ 000$). Secuencias con valores promedio de $Q = 30$ o mayores, se consideran de buena calidad para ser utilizadas como código de barras de la vida (NABR, 2012).

Limpieza de secuencias

Con la finalidad de remover fracciones de baja calidad de las secuencias de estudio, se llevó al cabo un proceso de limpieza, el cual consistió en cortar los extremos donde generalmente se presentan bases nucleotídicas con valores de $Q < 30$ y lo que se conoce comúnmente como “background peaks” o ruido, el cual está marcado como una línea roja desordenada, que por lo general se presenta al inicio y al final del electroferograma. El proceso se realizó tanto en las secuencias derechas como en las secuencias izquierdas de los fragmentos *matK* y *rbcL* para cada especie.

Complementariedad entre secuencias derechas e izquierdas

Las secuencias derechas de cada ejemplar de las diferentes especies fueron alineadas con sus respectivas secuencias izquierdas, con la herramienta Blastn, para verificar la correcta correspondencia entre nucleótidos en ambos sentidos.

Traducción de secuencias

Para verificar que las secuencias obtenidas fueran codificantes, éstas se tradujeron a su secuencia proteica. El proceso se realizó por medio del paquete seqinr del programa estadístico R, con lo cual se obtienen tres marcos de lectura abierta. Se verificó que por lo menos uno de ellos presentara ausencia de codones STOP.

Alineamiento

Para verificar la uniformidad entre las secuencias de una misma especie y proceder a su análisis, se realizó un alineamiento en el programa ClustalX 2.1, para cada especie (*D. palaciosii*, *D. texanum*, *D. occidentalis*, *D. leiophyllum* y *D. quadrangulatum*), de aproximadamente 800 pb para el fragmento matK y de 500 pb para el gen rbcL. En casos sin completa uniformidad se generó una secuencia consenso.

Análisis filogenético

Se generaron dos archivos fasta, uno con las secuencias que corresponden al gen *matK* y el segundo con las secuencias que corresponden al gen *rbcL*. Las secuencias incluidas en cada archivo corresponden a las especies de *D. palaciosii*, *D. texanum*, *D. occidentalis*, *D. leiophyllum*, *D. quadrangulatum*, *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*, las últimas dos resultados de investigaciones previas. Asimismo, se incluyeron las secuencias del GenBank (NCBI) correspondientes a *D. whelerii* HM640588.1, *D. serratifolium* HM640587.1, *D. micropterum* KU535883.1 y *D. miquihuanense* KU535884.1. Se usaron dos grupos externos *Asparagus officinalis* (esparrago) KX677472.1) y *Acorus*

gramineus DQ008864.1, ambas registradas en el GenBank-NCBI. Con ayuda de los paquetes *seqinr* y *ape* del programa estadístico R (R Core Team, 2018), se leyeron los alineamientos, se transformaron a formato binario con el comando “DNAbin” y se generaron matrices de distancias genéticas utilizando el modelo de evolución de Kimura de 2-parámetros. Para la reconstrucción de los árboles filogenéticos se utilizó el algoritmo UPGMA.

Estimación de tiempos de divergencia

Para estimar tiempos de divergencia entre especies de *Dasyllirion*, se linearizó el dendrograma construido en base a las secuencias *matK* con respecto al tiempo. Se utilizaron dos grupos externos para enraizar el árbol filogenético, *Asparagus officinalis* y *Acorus gramineus*, este último como dato absoluto de calibración interna (registro fósil) con una edad calculada de 132 millones de años. A partir de esta información, Good-Avila *et al.*, (2006) obtuvieron límites filogenéticos para la familia Agavaceae de 20 a 26 millones de años y de < 10.1 millones de años para *Agave sensu lato*. Como modelo de evolución nucleotídica se utilizó Kimura de 2-parámetros, el cual se seleccionó en función del criterio de información de Akaike (Akaike information criterion, AIC) (Abascal, 2014). Una medida de la cantidad de la información que perdemos al explicar un conjunto de datos utilizando un modelo en particular. Este dato se puede obtener a través del programa ModelTest del paquete phangorn de R, donde se prueban todas las opciones (JC, F81, K80, HKY, TrNe, TPM, TVM, GTR), el modelo de evolución que mejor se ajusta a los datos es aquel que tiene un valor de AIC menor (Schliep, 2011). A partir del modelo seleccionado, se construyó una matriz de distancias genéticas y con el método de agrupamiento UPGMA se generó un árbol filogenético con las relaciones evolutivas entre especies de *Dasyllirion* y grupos externos. El nodo correspondiente a *Acorus gramineus*, se calibró con el registro de 132 millones de años, dando como resultado estimaciones de tiempo de divergencia dentro y fuera del género *Dasyllirion*. Los tiempos estimados se reportaron en millones de años (Ma) para cada especie.

Análisis bromatológico en semilla de *D. cedrosanum*

Se realizó análisis químico proximal en semilla de sotol (*D. cedrosanum*) y trigo (línea experimental del Dpto. de Cereales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro) para determinar su calidad nutricional, de acuerdo al manual de técnicas utilizadas como estándar internacional de la A.O.A.C. (1980 Association of Official Analytical Chemist Official Methods of Analytical Chemist) Washington, D. C.

Colecta y procesamiento de la semilla

Se colectaron semillas de *D. cedrosanum* al término de la temporada de verano, durante los años 2011 y 2015 en tres localidades del noreste de México: Buenavista, Coahuila (25°20'56.86" N, 101°2'16.49" O; 1769 msnm), San Miguel, Coahuila (25°35'35.80" N, 101°5'40.30" O; 1120 msnm) y El Novillo, Zacatecas (24°43'2.80" N, 101°30'7.90" O; 1945 msnm) (Figura 14). Se eligieron tres plantas al azar por localidad, se recolectaron sus escapos florales y se extrajeron las semillas de cada uno de ellos. Las semillas se limpiaron de forma manual a través de fricción entre dos bases de madera, seguida de un proceso de soplado para eliminar los residuos de la cubierta. Se dejaron secar sobre una superficie aireada por 24 h y se almacenaron en bolsas de papel cubiertas con plástico bajo refrigeración a 4 °C, hasta su procesamiento.

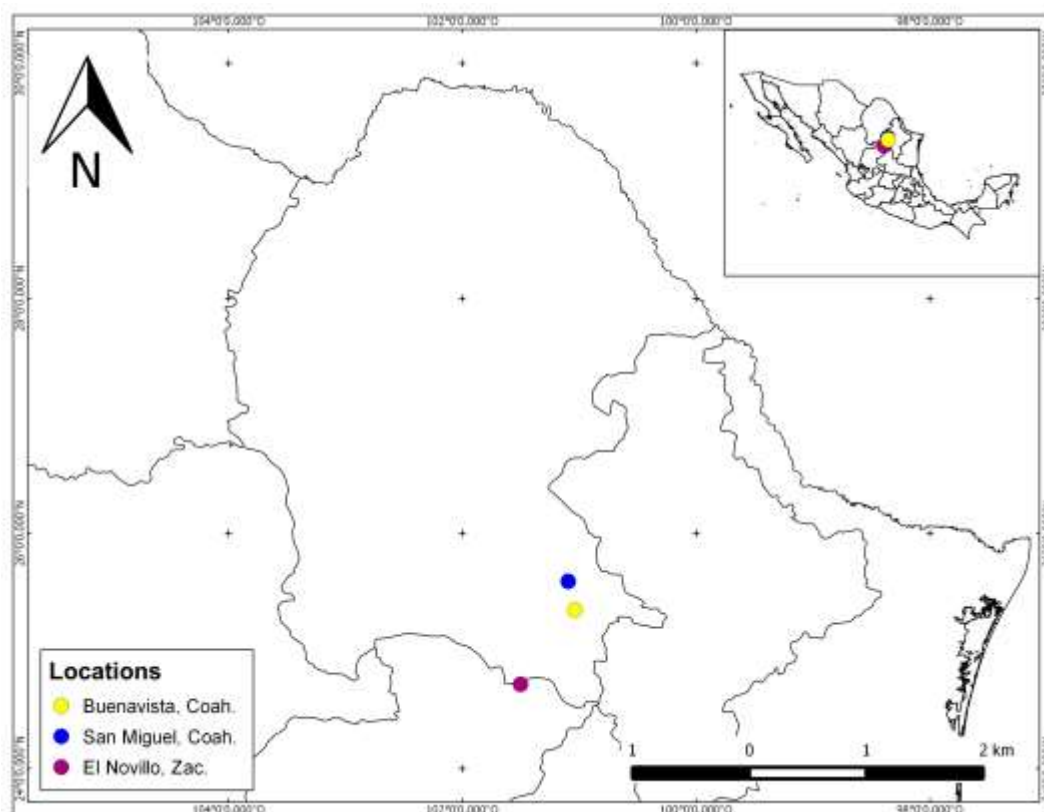


Figura 14. Sitios de colecta de la semilla de *Dasyliirion cedrosanum*.

Molienda de la semilla

Los análisis se llevaron al cabo en muestras de 100 g de semilla por planta, se pulverizaron en molino Thomas –Wiley Modelo 4 (Arthur H. Thomas Company Philadelphia PA., USA) y se guardaron en recipientes de plástico, limpios y secos en refrigeración hasta su procesamiento. Se determinó el porcentaje de materia seca total (MST), porcentaje de humedad (H), porcentaje de cenizas (C), porcentaje proteína cruda (PC), porcentaje de extracto etéreo (EE), porcentaje de fibra cruda (FC) y porcentaje de extracto libre de Nitrógeno (E.L.N). Para cada muestra y control, el análisis se realizó por triplicado y se utilizó trigo (línea experimental del Programa de Cereales de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro) como control.

Materia seca total

Se colocaron 2 g de harina de semilla de sotol en crisoles de porcelana de peso conocido y se secaron en estufa a temperatura de 100 – 105 °C hasta obtener un peso constante (ISTA, 2018) (Figura 15) y se realizó el siguiente cálculo.

$$\% \text{ MST} = [(\text{Peso crisol con materia seca} - \text{Peso crisol}) / \text{g muestra}] \times 100.$$

El porcentaje de humedad se obtuvo por diferencia en base a la materia seca total, a través del siguiente cálculo.

$$\% \text{ H} = 100 - \% \text{ MST}.$$



Figura 15. Determinación de materia seca total.

Ceniza

Se incineraron 2 g de harina de semilla en crisol de porcelana a 600 °C hasta obtener peso constante (2 horas). Para determinar el porcentaje de ceniza se utilizó el siguiente cálculo.

$$\% \text{ C} = [(\text{Peso crisol con cenizas} - \text{Peso crisol}) / \text{g muestra}] \times 100.$$

Proteína cruda

Se utilizó el método de Kjeldahl (AOAC 7.031) para determinar el contenido de nitrógeno. Se pesó 1 g de harina de semilla en un pedazo de papel filtro, se colocó en matraz Kjeldahl de 1L con tres perlas de vidrio y se agregaron 30 ml de H₂SO₄ concentrado con 5 g de mezcla reactiva de selenio. Se colocaron en equipo de digestión Kjeldahl y se calentó, aproximadamente 40 min, hasta

obtener un cambio de color de la reacción (verde). Se agregó agua destilada (300 ml), tres granallas de Zinc y 100 ml de NaOH al 45 %. La mezcla se destiló en equipo Kjeldahl recuperando el destilado (200 ml) en matraz Erlenmeyer de 500ml, el cual contenía 50 ml de ácido bórico al 4% y seis gotas de indicador mixto (verde de bromocresol y rojo de metilo). El destilado obtenido (250 ml total) se tituló con H_2SO_4 0.1 N y se registró la cantidad de ácido necesario para obtener un viraje de color, de azul a amarillo claro (Figura 16). Con los datos anteriores se calculó el porcentaje de N y de proteína en la muestra a partir de las fórmulas:

$$\% \text{ N} = (\text{ml de } \text{H}_2\text{SO}_4) (0.014) (\text{N})$$

$$\% \text{ PC} = (\% \text{ N}) (6.25)$$

Donde:

% N = porcentaje de nitrógeno (N_2)

ml de H_2SO_4 = ml utilizados para titular la muestra

0.014 = miliequivalente de nitrógeno (N_2)

N = Normalidad del H_2SO_4

6.25 = factor de conversión para proteína.

% PC = porcentaje de proteína cruda



Figura 16. Determinación de nitrógeno orgánico por método Kjeldahl.

Extracto etéreo

Se pesaron 4 g de harina de semilla de sotol en papel filtro, el cual se dobló y se colocó dentro de un dedal de asbesto. El dedal se introdujo dentro del Soxhlet y se colocó el matraz bola de fondo plano previamente pesado, el cual contenía 200 ml de hexano. La muestra se sifoneó durante 16 h continuas y posteriormente se retiró el solvente (Figura 17). El matraz conteniendo solo la grasa se dejó secar en estufa a 100 °C por 24 h y se pesó en balanza analítica (AOAC 7.055). Para cuantificar el contenido de grasa se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ EE} = (\text{Peso de matraz con grasa} - \text{Peso de matraz/g de muestra}) * 100.$$



Figura 17. Obtención de extracto etéreo (EE).

Fibra cruda

A partir del residuo desengrasado que quedó en el dedal en la determinación del extracto etéreo, se pesaron 2 g en vasos Berzelius de vidrio de 500 ml. A cada vaso se agregaron 100 ml de H_2SO_4 0.2 N, realizando un proceso de digestión durante 30 min. El residuo se filtró a través de un cedazo de tela colocado en embudo de vidrio. Con ayuda de una piseta llena de agua caliente se lavó varias veces el residuo hasta quitar el exceso de ácido. El filtrado se regresó al vaso Berzelius, se agregaron 100 ml de NaOH 0.3 N y se hirvió durante 30 min más. El residuo se filtró a través del cedazo y se lavó varias veces con agua caliente hasta quitar el exceso de hidróxido. Con ayuda de una espátula se pasó la muestra a un crisol limpio y seco y se llevó a estufa a 100

°C por 24 h. Posteriormente se pesó el crisol y se registraron los datos. El crisol con la muestra seca se quemó y se llevó a incineración en mufla a 600 °C por 2 h y después de enfriar se volvió a pesar registrando los datos (Figura 18). Finalmente se calculó el % FC de acuerdo a la siguiente fórmula (AOAC 7.061).

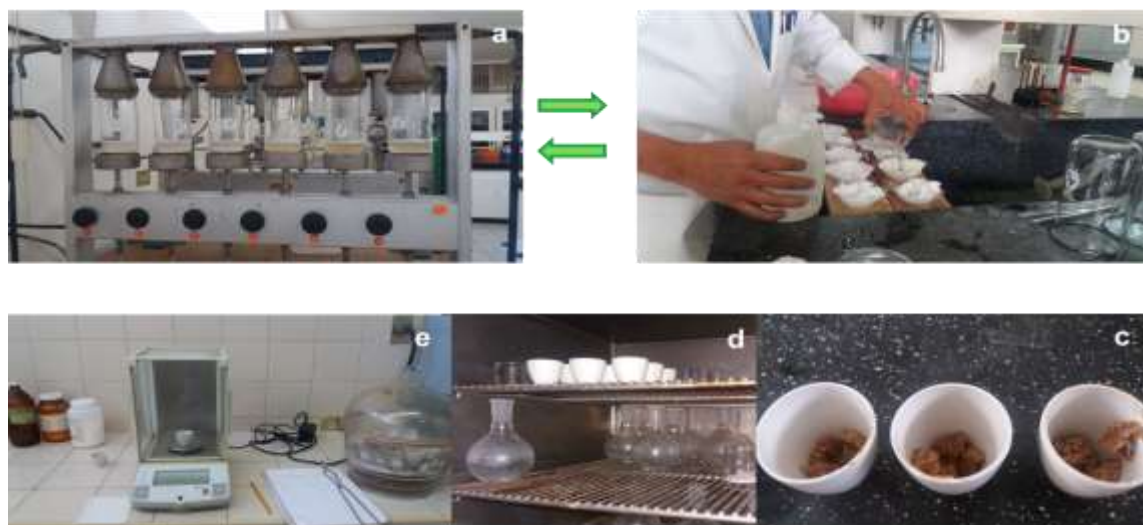
$$\%FC = [(Peso\ crisol\ con\ fibra\ seca - Peso\ crisol\ con\ ceniza) / g\ muestra] * 100$$


Figura 18. Determinación de fibra: a) proceso de digestión, b) filtrado de la muestra, c) crisoles con fibra digerida, d) secado de la fibra y e) peso de crisoles con fibra seca.

Extracto libre de nitrógeno

Se determinó por diferencia del 100 % con el resto de las determinaciones, donde ELN = extracto libre de nitrógeno.

$$ELN = 100 - [\%C = \text{porcentaje de cenizas} + \%PC = \text{porcentaje de proteína cruda} + \%EE = \text{porcentaje de extracto etéreo} + \%FC = \text{porcentaje de fibra cruda} + \%H = \text{porcentaje de humedad}]$$

Análisis mineral en semilla de *D. cedrosanum*

Para determinar el contenido mineral en harina de semilla de sotol y trigo, se preparó una solución de sólidos no disueltos al 1 % en agua destilada. Los sólidos no disueltos se obtuvieron mezclando un gramo de harina de semilla con 40 ml de una mezcla de ácido nítrico (HNO₃) y ácido perclórico (HClO₄) 3:1 en un vaso de pp. La mezcla se calentó a 200 °C hasta que la muestra fue

digerida completamente quedando solo un residuo de color blanco (sólidos no disueltos) y 20ml de la mezcla ácida. Se agregaron 20 ml de agua desionizada y se pasó el contenido a través de un papel filtro whatman # 42, recuperando el filtrado en un matraz de aforación de 100 ml. Se aforó a 100 ml con agua desionizada y se tomó un 1 ml de dicha solución. El ml se pasó a un nuevo matraz de aforación de 100 ml y se aforó con agua desionizada, obteniendo así una solución al 1%. Ambas soluciones, concentrada y diluida (1 %) se llevaron a un espectrofotómetro de absorción atómica Varian AA-1275 series.

A través de lámparas de cátodo hueco multielementales y unielementales a longitud de onda (λ) específica para cada elemento, se detectaron los minerales presentes en cada muestra (AOAC 7.091). Para detectar la mayoría de los elementos se utilizó gas acetileno (C_2H_2) y aire, mientras que para detectar el calcio (Ca) se utilizó óxido nitroso (N_2O) y acetileno (C_2H_2). De acuerdo los minerales analizados se prepararon soluciones estándar para cada elemento a 1, 2 y 3 ppm (Figura 19). El equipo proporciona la concentración de cada elemento en ppm el cual multiplicado por el factor de dilución (0.1) nos proporciona la concentración del elemento en mg/g de muestra.

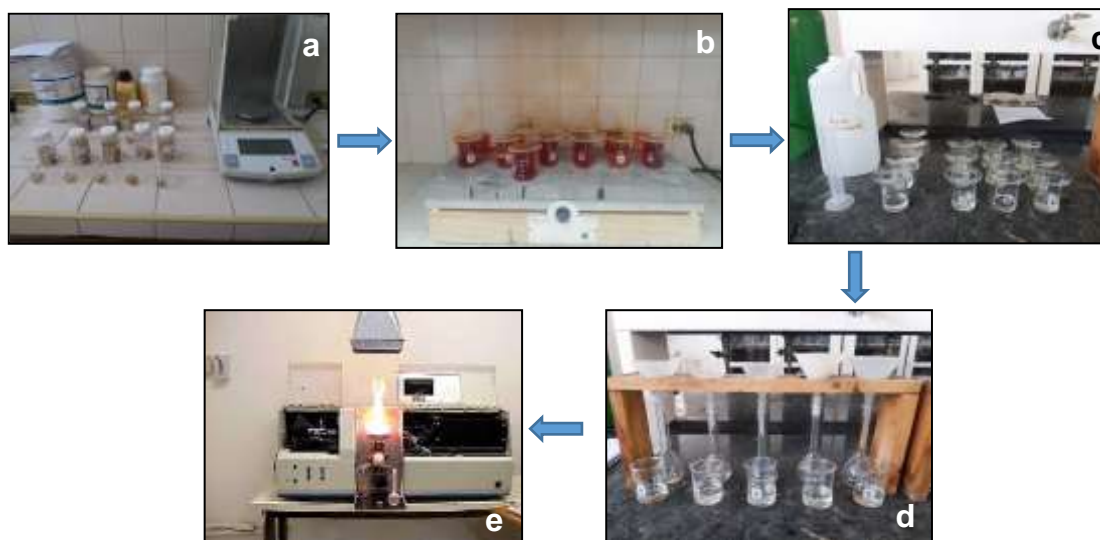


Figura 19. Determinación de minerales: a) peso de muestras, b) digestión ácida de la muestra, c) obtención de sólidos no disueltos, d) filtrado de sólidos no disueltos y e) lectura en espectroscopia de absorción atómica.

Determinación de fósforo por espectrofotometría

A partir de la solución de sólidos no disueltos al 1 % se colocó 1 ml de muestra en tubo de ensaye de 15 x 100 mm, se agregaron 5 ml de molibdato de amonio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ y 2 ml de ácido aminonaftol sulfónico (ANSA), se agitaron en vortex y se dejaron reposar por 20 minutos, al término se obtuvo un viraje de color azul y se leyeron en espectrofotómetro (Thermo Spectronic) a longitud de onda de 640 nm. Para determinar la concentración del elemento en cada muestra se realizó una curva de calibración de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm a partir de un estándar de fosforo de 100 ppm (Figura 20).



Figura 20. Determinación de fósforo por espectrofotometría.

Análisis bromatológico en germinado de *D. cedrosanum*

Se realizó un análisis químico proximal del germinado de semilla de sotol (*D. cedrosanum*), de acuerdo al manual de técnicas utilizadas como estándar internacional de la A.O.A.C (1980). Para la obtención del germinado se colectaron semillas de una planta de *D. cedrosanum* ubicada en el jardín botánico de la UAAAN con clave 2011-3-1. Se tomaron porciones de 500 semillas y se lavaron en vaso de precipitado con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, seguido de un lavado con alcohol al 70% por un minuto y finalmente se lavaron con agua estéril hasta quitar el exceso de los lavados anteriores. Las semillas se extendieron de manera uniforme sobre un pedazo de manta humedecida, dentro de una charola de aluminio (Figura 21). La charola se

cubrió con papel aluminio y se colocó en incubadora a 25 °C por 20 días. Las plántulas se pesaron directamente para obtener su peso fresco y se colocaron en estufa a 60 °C para obtener su peso seco. Las plántulas deshidratadas se molieron en mortero y el pulverizado se almacenó en un recipiente limpio y seco hasta su procesamiento.



Figura 21. Obtención de germinados de semilla de *D. cedrosanum*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Código de barras de la vida

Calidad de ADN

Los resultados de calidad basados en la relación de absorbancia 260/280, se presentan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Concentraciones y calidad de ADN

Especie	ID	Concentración de ADN ng/μl	Absorbancia 260	Absorbancia 280	Relación 260/280
<i>D. leiophyllum</i>	ES-01	4844.88	96898	52556	1.84
	ES-02	3962.66	79253	41806	1.90
	ES-03	1511.99	30240	22201	1.36
	ES-04	4964.15	99283	55242	1.80
	ES-05	3809.7	76194	40042	1.90
	ES-06	3981.35	79627	41354	1.93
<i>D. occidentalis</i>	HO-01	2639.77	52795	33018	1.60
	HO-02	3339.83	66797	38947	1.72
	HO-03	2857.43	57149	35333	1.62
	HO-04	3323.59	66472	40086	1.66
	HO-05	2116.27	42325	26577	1.59
	HO-06	4634.75	92695	54482	1.70
	HO-07	4515.97	90319	53422	1.69
<i>D. palaciosii</i>	GU-01	3877.5	77550	45019	1.72
	GU-02	4168.44	83369	48054	1.73
	GU-03	3270.73	65415	40076	1.63
	GU-04	3899.54	77991	46727	1.67
	GU-05	4709.94	94199	55488	1.70
	GU-06	4475.9	89518	52017	1.72
<i>D. texanum</i>	AL-01	4134.98	82700	47141	1.75
	AL-02	4901.04	98021	58790	1.67
	AL-03	4782.59	95652	56366	1.70
	AL-04	3890.21	77804	45105	1.72
	AL-05	3531.45	70629	40648	1.74
	AL-06	5236.59	104732	71708	1.46
<i>D. quadrangulatum</i>	DA-08	3354.48	3354	2610	1.29
	DA-09	3142.45	3142	2557	1.23
	DA-10	3075.27	3075	2689	1.14
	DA-11	3130.81	3131	2281	1.37
	DA-12	2497.02	2497	1755	1.42

Se obtuvieron concentraciones de ADN en el rango de 2497.02 ng/μl a 5236.59 ng/μl, que fueron relativamente altas y suficientes, ya que para llevar al cabo el proceso de amplificación solo se necesitan concentraciones cercanas a los 50 ng/μl. En cuanto a la calidad del ADN, las muestras presentaron una relación de absorbancia (260/280) en el rango de 1.14 a 1.90, la cual es suficiente para ser consideradas como de buena calidad, ya que el valor estimado como ideal es de 1.80.

Amplificación con iniciadores *matK* 390F y *matK* 1326R

En la Figura 22 se presentan cuatro patrones electroforéticos. Cada uno muestra los productos de PCR a partir de los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1326R (Cuénoud *et al.*, 2002) para cada especie de *Dasyllirion*. Las Figuras 19a y 19b, corresponden a las especies de *D. palaciosii* y *D. texanum*, respectivamente. En ambas imágenes se muestra la ausencia de bandas de amplificación, excepto en el caso de los controles positivos (C+) que corresponden a *D. cedrosanum*, donde es evidente que los iniciadores amplifican para esta especie. Las Figuras 22c y 22d corresponden a las especies *D. occidentalis* y *D. leiophyllum*. Se aprecian bandas con mayor definición, sobre todo en la especie *D. occidentalis*, donde se lograron amplificar muestras de siete ejemplares. Sin embargo, en *D. leiophyllum* el bandeo es intermitente y muestra bandas débiles y marcadas de forma alternada.

Para llevar al cabo un proceso efectivo de PCR es necesario que uno de los iniciadores tenga la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN y el otro iniciador tenga la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (Espinosa-Asuar, 2007). Lo anterior no se cumple con el iniciador *matK* 390F, la prueba de complementariedad realizada con las secuencias de *D. wheeleri* y *D. serratifolium* (Figura 9) aunado a la presencia de bandas intermitentes y la obtención de secuencias de mala calidad con valores promedio de Q < 30, son evidencia de que los iniciadores propuestos por Cuénoud *et al.* (2002) no son efectivos en todas las especies de *Dasyllirion* incluidas en este estudio.

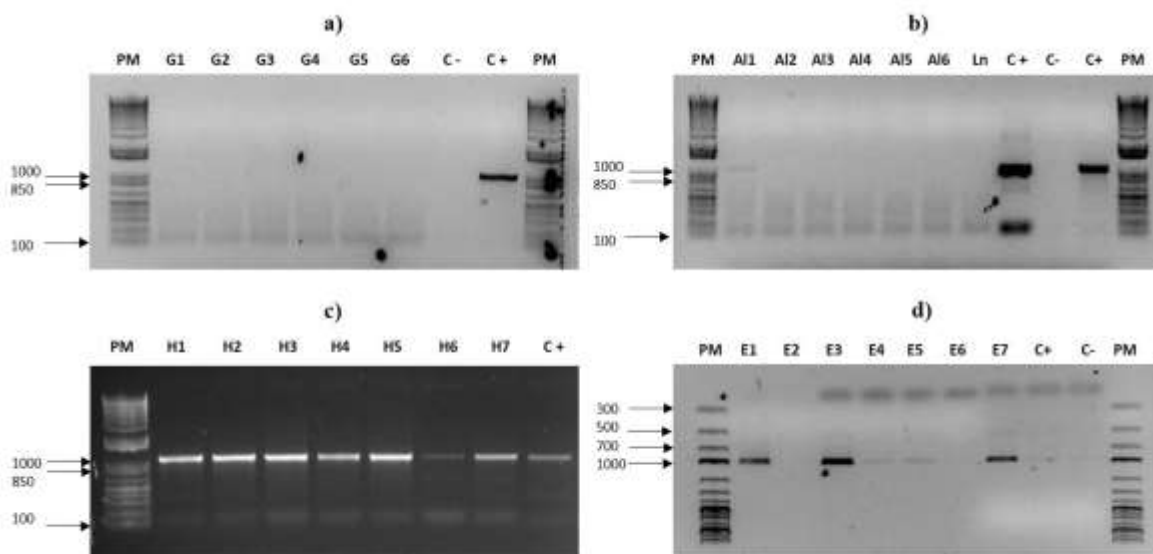


Figura 22. Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen *matK* a partir de iniciadores *matK* 390F y *matK* 1326R (Cuénoud *et al.*, 2002) en especies del género *Dasyliiron*; a) *D. palaciosii*; b) *D. texanum*; c) *D. occidentalis* y d) *D. leiophyllum*.

Amplificación con nuevos iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R

En la Figura 23 se presentan cinco patrones electroforéticos. Cada uno corresponde a la amplificación del gen *matK* en diferentes especies de *Dasyliiron*. Para cada especie se amplificó el gen en 5 o 7 ejemplares. Para el proceso de amplificación se utilizaron los nuevos iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R en las especies de estudio de *D. palaciosii*, *D. texanum*, *D. occidentalis*, *D. leiophyllum* y *D. quadrangulatum*. La amplificación resultó exitosa con bandas de amplificación bien definidas de 1000 pb para las cinco especies. Solamente en *D. occidentalis* (Figura 23 c) se presentó una banda débil (H5), lo cual puede deberse a una dilución de baja concentración.

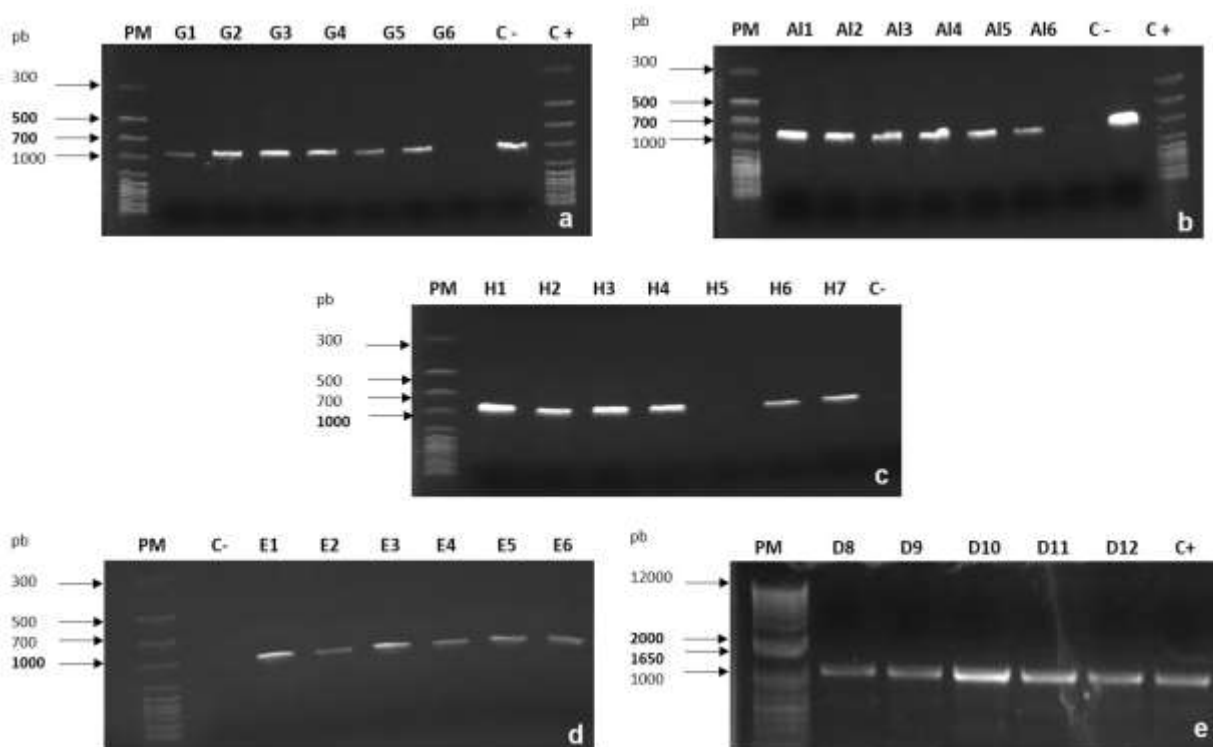


Figura 23. Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen *matK* a partir de iniciadores *matK* 335F y *matK* 1327R en especies de *Dasyliiron*: a) *D. palaciosii*, b) *D. texanum*, c) *D. occidentalis*, d) *D. leiophyllum* y e) *D. quadrangulatum*.

Amplificación con iniciadores *rbcL*

En la Figura 24 se presentan cinco patrones electroforéticos. Cada uno corresponde a la amplificación del gen *rbcL* en diferentes especies de *Dasyliiron*. *D. palaciosii*, *D. texanum*, *D. occidentalis*, *D. leiophyllum* y *D. quadrangulatum*. La amplificación resultó exitosa presentando bandas de amplificación bien definidas de 650 pb para las cinco especies.

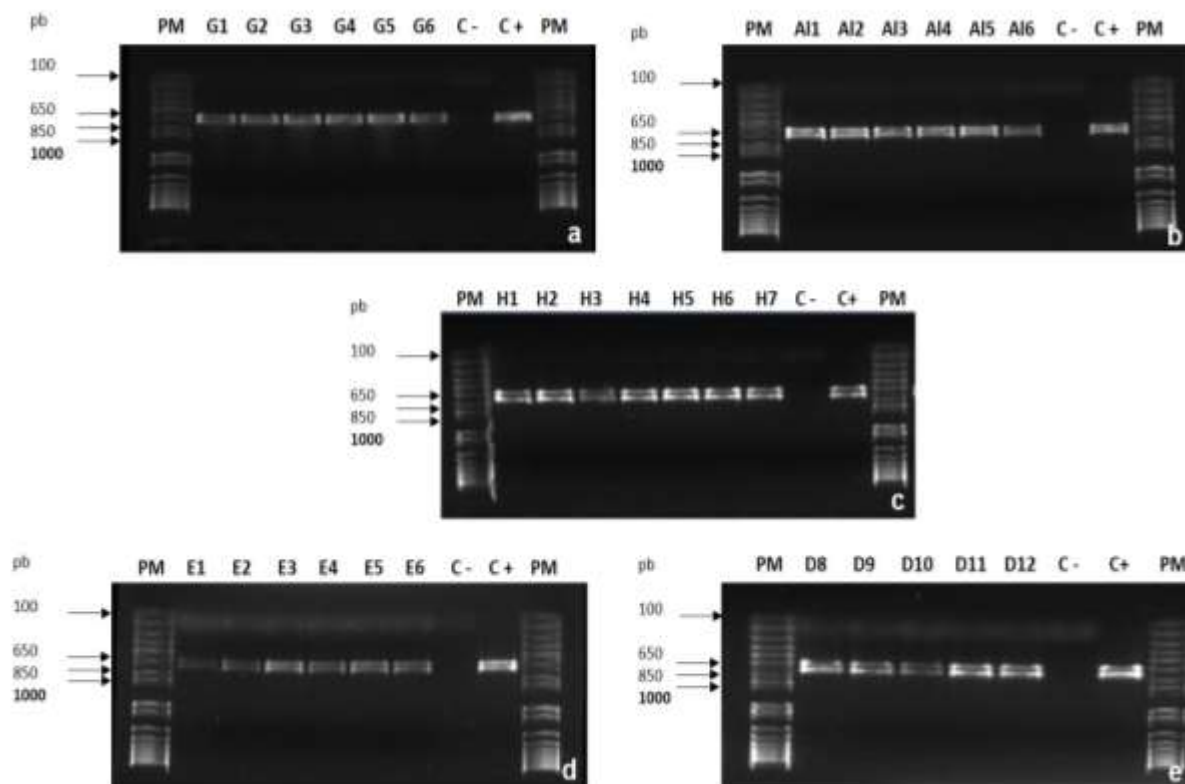


Figura 24. Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen *rbcL* a partir de iniciadores *rbcLaF* y *rbcLaR* en especies de *Dasyliirion*: a) *D. palaciosii*, b) *D. texanum*, c) *D. occidentalis*, d) *D. leiophyllum* y e) *D. quadrangulatum*.

Calidad de las secuencias

Las secuencias originales de los fragmentos *matK* y *rbcL* presentaron valores promedios de Q de entre 36 y 64. Mientras que las secuencias limpias para las diferentes especies de *Dasyliirion*, presentaron valores de calidad (valor Q) por arriba de 30, lo cual indica probabilidades de error $< 1/1000$. Son valores suficientes para considerar que las secuencias son buena calidad (NABR, 2012).

Traducción de secuencias

Se obtuvieron tres marcos de lectura para cada secuencia. La ausencia de codones de stop garantiza la obtención de lectura de una proteína completa por

secuencia. Todas las secuencias que se tradujeron presentaron al menos un marco de lectura sin codones de stop.

Alineamiento de secuencias

A partir de los alineamientos de las secuencias obtenidas para cada especie, se observó que son uniformes entre sí, excepto en el caso de *D. texanum*, donde las secuencias resultaron no uniformes, con diferencia en una base nucleotídica, por lo cual hay dos tipos de secuencias para la especie. En este caso se obtuvo una secuencia consenso (secuencias representativas de los nucleótidos con mayor frecuencia). Para cada especie se obtuvieron secuencias *matK* de hasta 734- pb para *D. leiophyllum*, 809 pb para *D. occidentalis*, 871 pb para *D. palaciosii*, 805 pb para *D. texanum* y 703 para *D. quadrangulatum*. En el caso de *rbcL* se obtuvieron secuencias de 525 pb para *D. leiophyllum*, 517 pb para *D. occidentalis*, 517 pb para *D. palaciosii*, 516 pb para *D. texanum* y 516 pb para *D. quadrangulatum*.

Obtención de matrices de sustitución nucleotídica

En el Cuadro 7 se presenta la matriz de sustituciones nucleotídicas para el gen *matK*. Los pares de especies con más sustituciones fueron *D. berlandieri* y *D. cedrosanum*, así como *D. micropterum* y *D. leiophyllum*, ambos casos con 6 sustituciones nucleotídicas.

Las comparaciones con 5 sustituciones nucleotídicas ocurrieron en *D. berlandieri* con respecto a *D. occidentalis* y *D. serratifolium*, *D. micropterum* con respecto a *D. cedrosanum* y *D. wheeleri*, así como *D. leiophyllum* con respecto a *D. wheeleri*.

Las comparaciones entre especies que comparten 4 sustituciones nucleotídicas son *D. occidentalis* con respecto a *D. micropterum* y *D. leiophyllum*, *D. texanum* y *D. berlandieri*, *D. cedrosanum* y *D. wheeleri*, *D. quadrangulatum* y *D. leiophyllum*, *D. micropterum* y *D. serratifolium*, *D. miquihuanense* y *D. leiophyllum*, *D. serratifolium* y *D. leiophyllum* y por último *D. leiophyllum* con respecto a *D. occidentalis* y *D. palaciosii*

Por otro lado, *D. occidentalis* presenta diferencia de 3 sustituciones nucleotídicas con respecto a *D. cedrosanum* y *D. wheeleri*, así como *D. texanum* con respecto a *D. micropterum* y *D. leiophyllum*, de igual manera *D. berlandieri* presenta 3 diferencias nucleotídicas con *D. quadrangulatum*, *D. micropterum*, *D. miquihuanense* y *D. palaciosii*. La especie *D. cedrosanum* presenta el mismo número de sustituciones con *D. occidentalis*, *D. quadrangulatum*, *D. miquihuanense*, *D. serratifolium* y *D. palaciosii*; así como *D. wheeleri* con respecto a *D. quadrangulatum*, *D. miquihuanense* y *D. palaciosii*.

Por su parte *D. occidentalis* presenta diferencia de 2 sustituciones con respecto a *D. quadrangulatum*, *D. miquihuanense*, *D. serratifolium* y *D. palaciosii*. Al igual que *D. texanum* con respecto a *D. cedrosanum* y *D. wheeleri*. La especie *D. quadrangulatum* presenta diferencia de 2 con *D. micropterum* y *D. serratifolium*; *D. micropterum* con *D. miquihuanense* y *D. palaciosii*; *D. serratifolium* con *D. miquihuanense* y *D. palaciosii*

Las comparaciones con solo una sustitución nucleotídica fueron entre *D. texanum* y las especies *D. occidentalis*, *D. quadrangulatum*, *D. miquihuanense*, *D. serratifolium* y *D. palaciosii*, Así como *D. cedrosanum* y *D. leiophyllum*, *D. serratifolium* y *D. wheeleri*.

Las especies que al ser comparadas no presentaron sustituciones entre sí (0) fueron *D. miquihuanense*, *D. palaciosii* y *D. quadrangulatum*. La especie de referencia externa, *Asparagus officinalis*, tiene de 38 a 41 sustituciones nucleotídicas con respecto a las especies de *Dasyllirion*.

Cuadro 7. Matriz de sustitución nucleotídica para el gen *matK* entre especies de *Dasyilirion* y el grupo externo, *Asparagus officinalis*.

	Docci	Dtex	Dber	Dcedro	Dqua	Dmicro	Dmiq	Dserr	Dwhe	Dleio	Dpala
Docci	0	1	5	3	2	4	2	2	3	4	2
Dtex	1	0	4	2	1	3	1	1	2	3	1
Dber	5	4	0	6	3	3	3	5	6	7	3
Dcedro	3	2	6	0	3	5	3	3	4	1	3
Dqua	2	1	3	3	0	2	0	2	3	4	0
Dmicro	4	3	3	5	2	0	2	4	5	6	2
Dmiq	2	1	3	3	0	2	0	2	3	4	0
Dserr	2	1	5	3	2	4	2	0	1	4	2
Dwhe	3	2	6	4	3	5	3	1	0	5	3
Dleio	4	3	7	1	4	6	4	4	5	0	4
Dpala	2	1	3	3	0	2	0	2	3	4	0
AsparagusO	39	38	41	38	38	40	38	39	40	39	38

Para el caso de la matriz construida para el gen *rbcL* (Cuadro 8), solo las especies de *D. cedrosanum* y *D. leiophyllum* presentaron diferencia, la cual corresponde a una sustitución nucleotídica, al ser comparadas con cada una de las especies restantes de *Dasyilirion*. La especie *Asparagus officinalis* presentó entre 19 y 20 sustituciones nucleotídicas con respecto a las especies de *Dasyilirion*.

Cuadro 8. Matriz de sustitución nucleotídica para el gen *rbcL* entre especies de *Dasyilirion* y el grupo externo, *Asparagus officinalis*.

	Dcedro	Dmicro	Dmiq	Dwhe	Dserr	Dquad	Dpala	Docci	Dtexa	Dleio	Dber
Dcedro	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Dmicro	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dmiq	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dwhe	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dserr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dqua	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dpala	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Docci	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dtex	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Dleio	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
Dber	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AsparagusO	20	19	19	19	19	19	19	19	19	20	19

Obtención de dendrogramas

En esta parte del estudio se buscó la representación jerárquica de especies de *Dasyilirion*, con base en sus secuencias *rbcL*, *matK* y la concatenación de *matK* con *rbcL*. En la Figura 25 se pueden observar las asociaciones entre las especies de *Dasyilirion*, donde *D. berlandieri* (distribuida en Nuevo León) y *D. micropterum* (distribuida en Coahuila y Nuevo León) comparten un mayor parecido entre sí que con el resto de los subgrupos formados, estas especies tienden a crecer en montaña, dentro o cerca de bosque de coníferas y encinos. De la misma forma *D. cedrosanum* (Coahuila) y *D. leiophyllum* (Coahuila y Chihuahua), se encuentran estrechamente relacionadas y se caracterizan por crecer en matorral desértico. Por su parte *D. texanum* (Coahuila) y *D. occidentalis* (Zacatecas) forman un subgrupo de afinidad geográfica moderada, ambas especies se desarrollan en substratos rocosos. Las especies de *D. serratifolium* (Oaxaca) y *D. wheeleri* (Chihuahua y Sonora) se agrupan en un clado, y tienen parecido entre secuencias, a pesar de ser de lugares alejados. Mientras tanto, las secuencias de *D. palaciosii* (San Luis Potosí), *D. miquihuanense* (Tamaulipas) y *D. quadrangulatum* (Nuevo León), especies del centro-este del país, comparten un mayor parecido evolutivo, agrupándose en

un solo clado. De manera general las especies de *Dasyilirion* forman tres subgrupos, uno de ellos formado por especies del noreste de México (Coahuila y Nuevo León) y los otros dos se unen en un grupo más grande que comprende especies ubicadas en el norte, centro y sur del país (Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí y Oaxaca). Cabe aclarar que solamente los datos de secuencia de *D. wheeleri* y *D. serratifolium* no fueron obtenidos por el grupo de trabajo de la UAAAN. Es solamente para estas especies donde no hay consistencia entre la cercanía genética y la geográfica, y las secuencias requieren verificación en un futuro.

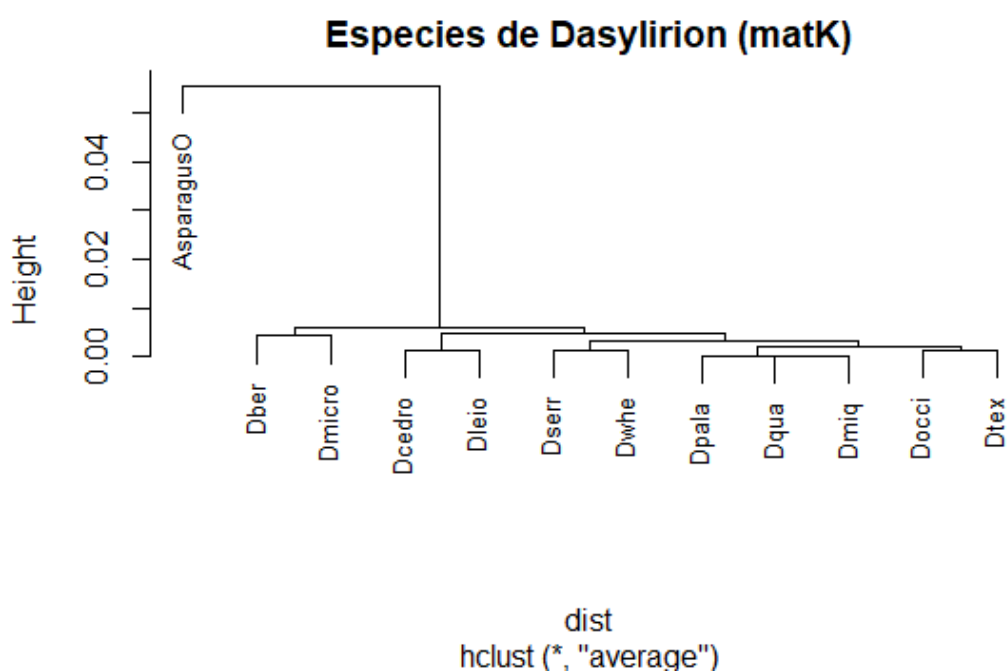


Figura 25. Dendrograma para especies de *Dasyilirion* construido con base en secuencias *matK*.

Villarreal-Quintanilla *et al.* (2016) utilizaron secuencias de cloroplasto *matK* y *rbcL* como medio complementario de caracterización de una nueva especie de *Dasyilirion* (*D. micropterum*) y construyeron dendrogramas a partir de las secuencias, con inclusión de *D. miquihuanense*, *D. wheeleri* y *D. serratifolium*. La topología de los árboles mostró la formación de dos subgrupos, uno formado por *D. miquihuanense* y *D. micropterum* y el segundo entre *D. wheeleri* y *D. serratifolium*, esta última asociación coincide con la encontrada en nuestro estudio, donde ambas especies se conservan en un mismo clado.

En la Figura 26 se presenta el dendrograma obtenido para las especies de *Dasyilirion* de acuerdo con las secuencias *rbcL*. Las especies forman un grupo muy consistente, resultado de la escasa variación encontrada en los fragmentos *rbcL* amplificados. El algoritmo agrupa las secuencias en solo 2 clados, uno formado por *D. cedrosanum* y *D. leiophyllum*, cuya asociación coincide con la generada por *matK* (Figura 25) y el segundo grupo formado por el resto de las especies (*D. berlandieri*, *D. texanum*, *D. occidentalis*, *D. palaciosii*, *D. quadrangulatum*, *D. serratifolium*, *D. wheeleri*, *D. micropterum* y *D. miquihuanense*). Este resultado refuerza la cercanía genética entre *D. cedrosanum* y *D. leiophyllum*, ambas especies de matorral desértico y de utilidad en la elaboración de la bebida.

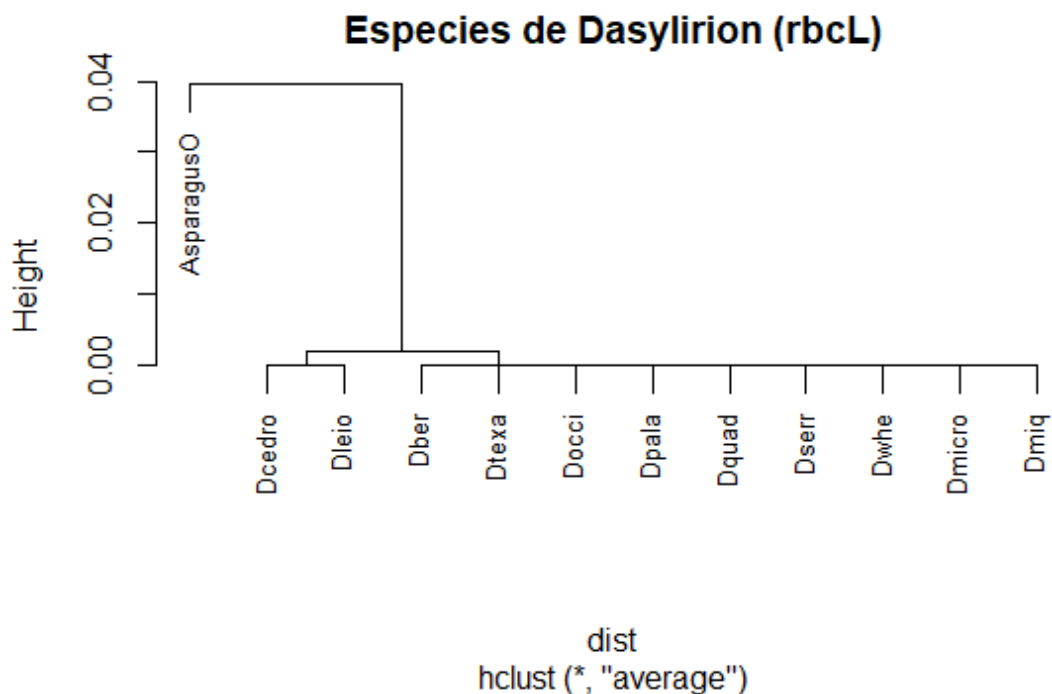


Figura 26. Dendrograma para especies de *Dasyilirion* construido con base en secuencias *rbcL*.

En la Figura 27 se presenta el dendrograma construido con base en las secuencias concatenadas *matK* y *rbcL* para cada especie de *Dasyilirion*. El agrupamiento del dendrograma conserva la formación de subgrupos con pares de especies estrechamente relacionadas como *D. cedrosanum* y *D. leiophyllum*, cuya relación cercana es evidente en los tres dendrogramas y forman un clado

único. Por otra parte *D. berlandieri* y *D. micropterum* comparten un mayor parecido entre sí, que con el resto de los subgrupos. Las especies *D. texanum* y *D. occidentalis* se encuentran mayormente emparentados formando un subgrupo, al igual que *D. serratifolium* y *D. wheeleri*. Las especies *D. palaciosii*, *D. quadrangulatum* y *D. miquihuanense* se agrupan en un solo clado con un mayor parecido entre sus secuencias, ya que no presentaron variación nucleotídica entre ellas.

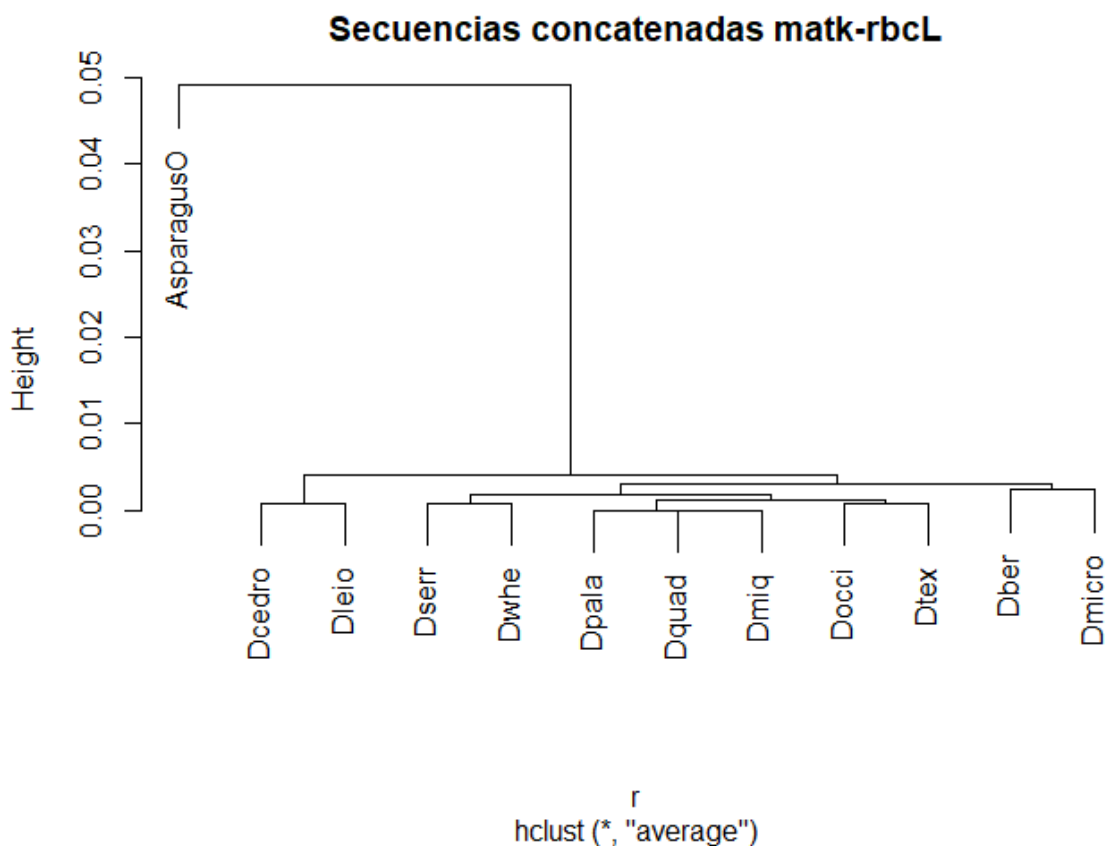


Figura 27. Dendrograma para las especies de *Dasylirion* a partir de secuencias concatenadas *matK-rbcL*.

Análisis filogenético

La construcción de árboles filogenéticos busca representar la mejor hipótesis sobre cómo evolucionó un conjunto de especies a partir de un ancestro común. Existen pocos estudios dirigidos a las relaciones evolutivas del género *Dasylirion*. Autores como Hutchinson (1934), Cronquist (1981) y Dahlgren *et al.*

(1985) realizaron estudios de clasificación taxonómica con base en sus características morfológicas. Encontraron una fuerte relación entre *Dasyilirion* y los géneros *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus* (Bogler, 1995).

Con el surgimiento de la biología molecular, se dio paso a la inferencia de la historia evolutiva de las especies a partir de la información contenida en el genoma. Bogler (1995) realizó estudios filogenéticos dentro y fuera del género *Dasyilirion* con base en secuencias de cloroplasto ITS1 e ITS2. Confirmó relaciones evolutivas a nivel de género con *Nolina*, *Beaucarnea* y *Calibanus* y a nivel de especie encontró la formación de dos grupos. Uno que contiene a las especies del sur, centro y noreste de México y otro que contiene a las especies del sur de Texas, una especie de Coahuila y una de Sonora.

La variación nucleotídica existente, sobre todo en las secuencias *matK* de las especies de *Dasyilirion*, nos dan la opción de profundizar en las relaciones de emparentamiento, las cuales se presentan en la Figura 28. En el dendrograma se muestra las relaciones existentes entre las especies de *Dasyilirion* y los grupos externos *Asparagus officinalis* y *Acorus gramineus*, este último como registro fósil de calibración interna, a partir del cual se determinaron tiempos evolutivos para el género. La edad de la corona es de 132 Ma. Cabe mencionar que las secuencias *matK* de *D. palaciosii* y *D. quadrangulatum*, no se integraron a dicho dendrograma ya que son redundantes con *D. miquihuanense*. Por ello solo se muestra la asociación de *D. miquihuanense* con *D. texanum* y *D. occidentalis*. El resto de los subgrupos formados por *D. micropterum* y *D. berlandieri*, así como los conformados por *D. leiophyllum* y *D. cedrosanum*, además de *D. wheeleri* y *D. serratifolium* se mantienen.

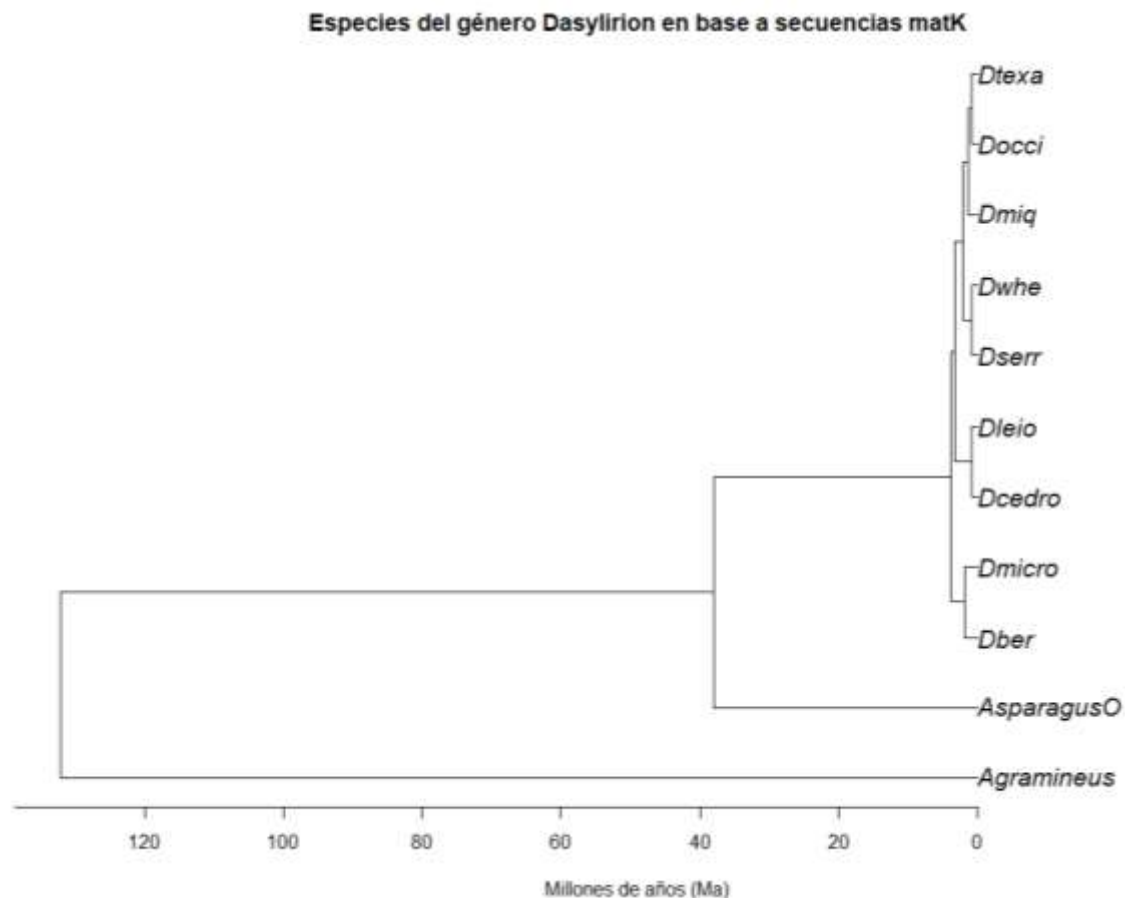


Figura 28. Dendrograma para especies de *Dasyilirion* a partir de secuencias *matK*, con *Asparagus officinales* y *Acorus gramineus* (registro fósil, 132 Ma) como grupos externos.

En la Figura 29 se presenta el árbol filogenético obtenido con base en secuencias *matK* y las longitudes de tiempo de las ramas estimadas a partir del registro fósil de *Acorus gramineus* de 132 millones de años (Ma). De acuerdo con los datos estimados, el género *Dasyilirion* compartió un ancestro común con *A. officinales* (género *Asparagus*) hace aproximadamente 38.09 millones de años (Ma). Ambas taxa pertenecen a la familia Asparagaceae, y en este sentido el dato está dentro de lo estimado por Good-Avila *et al.* (2006) quienes estiman una edad en el rango de 60 a 69 millones de años para el orden Asparagales, a partir de un registro fósil reportado por Henredeen y Crane (1995) de 37.5 millones de años (Magallón y Sanderson, 1998).

La existencia del ancestro común entre *Dasyilirion* y *A. officinales* muy probablemente se ubica durante la transición de la época del Eoceno (hace 55.8 Ma) al Oligoceno (hace 33.9 Ma) durante la era Cenozoica. Al parecer durante éstas épocas se experimentaron cambios climáticos y geográficos, con cambios de clima cálido a un clima global más frío y heterogéneo que los experimentados en la era Mesozoica (Fenero *et al.*, 2010). Es común que después de un evento geológico se extingan y surjan nuevas especies. Este hecho podría marcar la divergencia de *Dasyilirion* a partir de su ancestro común con *A. officinalis*.

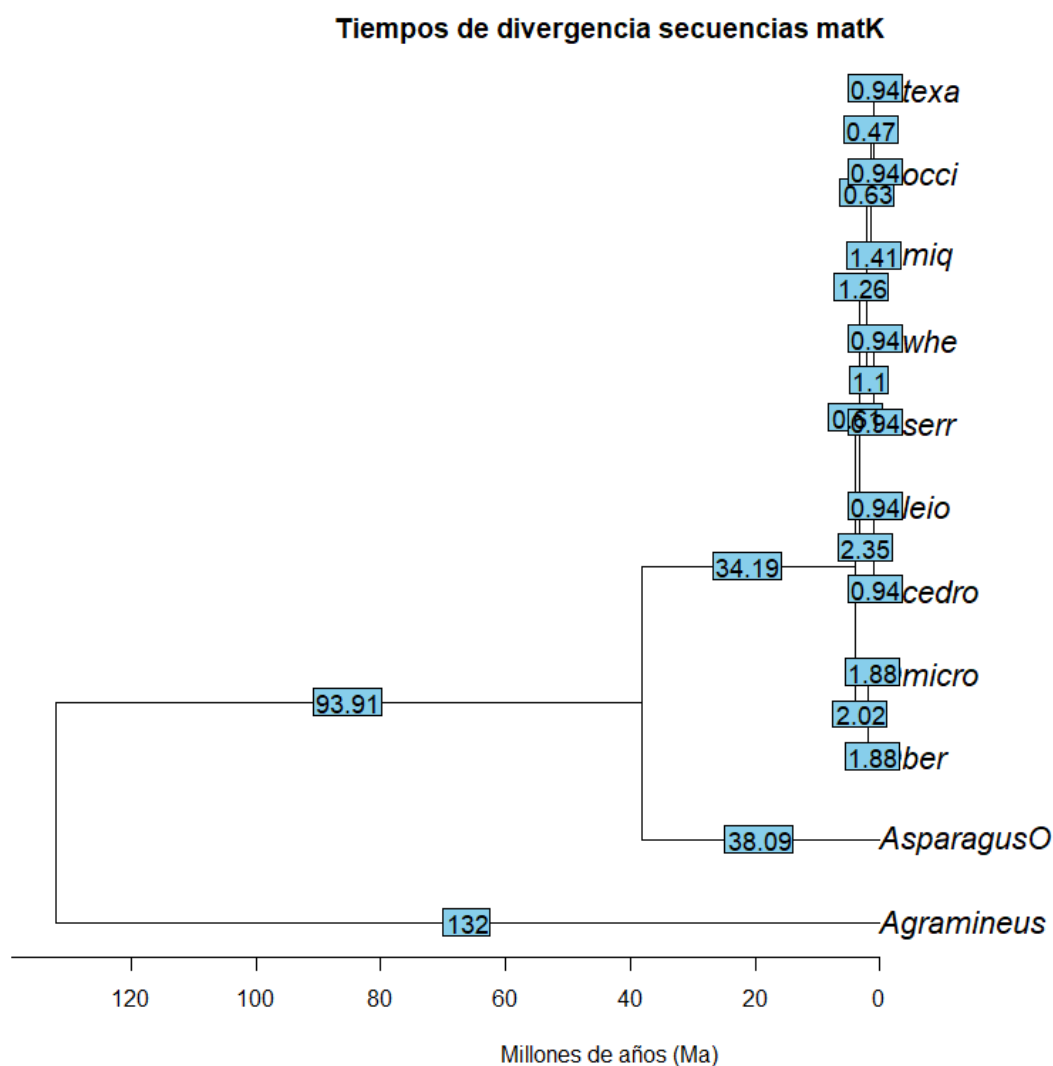


Figura 29. Estimación de tiempos evolutivos en especies de *Dasyilirion* a partir de secuencias *matK*, con *Asparagus officinales* y *Acorus gramineus* (registro fósil, 132 Ma) como grupos externos.

Para observar el agrupamiento específico en el género *Dasyilirion*, se presenta un subárbol con tiempos evolutivos en la Figura 30. Se estima que las especies de *Dasyilirion* divergieron a partir de un ancestro común al menos hace aproximadamente 3.90 Ma. Justamente dentro de la época del Plioceno, entre 2.58 y 5.33 Ma, que se ubica durante la era Cenozoica (Stratigraphy.org, 2019). Esta es una estimación mínima ya que no están incluidas todas las especies de *Dasyilirion*.

Por otra parte, se estimaron edades de divergencia entre las diferentes especies de *Dasyilirion*. Se estimó un tiempo de 1.88 millones de años, entre *D. berlandieri* y *D. micropterum*. El segundo grupo contiene al resto de las especies, donde se estimó un tiempo de divergencia entre *D. leiophyllum* y *D. cedrosanum* de 0.94 Ma. Para *D. serratifolium* y *D. wheelerii* se estimaron tiempos de divergencia de 0.94 Ma, al igual que para la divergencia entre *D. texanum* y *D. occidentalis*. Al parecer estas dos últimas especies comparten un ancestro común con *D. miquihuanense*, para el cual se estima una edad de divergencia de 1.41 Ma.

Con base en los tiempos estimados para las especies de *Dasyilirion*, se deduce que *D. berlandieri* y *D. micropterum* presentan una divergencia más temprana (1.88 Ma) que el resto de las especies. Por su parte *D. serratifolium* y *D. wheeleri*, así como *D. texanum* y *D. occidentalis*, presentan básicamente tiempos de divergencia iguales de 0.94 Ma.

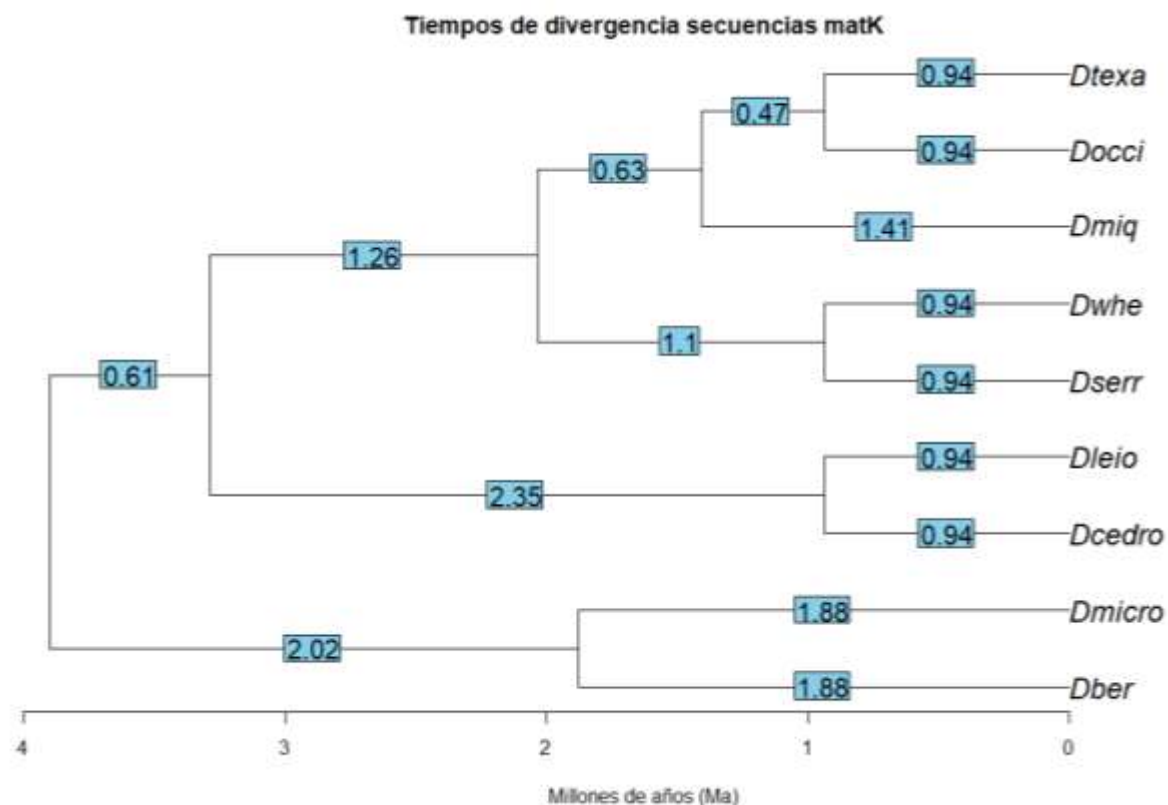


Figura 30. Subárbol para las especies de *Dasyliirion*, con tiempos evolutivos a partir de secuencias *matK*.

En la Figura 31 se presenta el árbol filogenético para las especies de *Dasyliirion* a partir de secuencias *matK*, donde el valor en cada nodo representa el error estándar (EE) para los tiempos de divergencia calculados entre las diferentes especies (Figura 29). De acuerdo con los datos obtenidos, se deduce que *Dasyliirion* y *A. officinales* (género *Asparagus*) divergieron a partir de un ancestro común hace 38.09 millones de años (Ma) \pm 2 EE (5.39) = 10.78, que lo ubica en un rango de 27.31 a 48.87 Ma. Mientras que para las especies de *Dasyliirion* se estima su divergencia a partir de un ancestro común al menos hace 3.90 Ma \pm 2 EE (1.119) = 2.23, en un rango de 1.67 a 6.13 Ma.

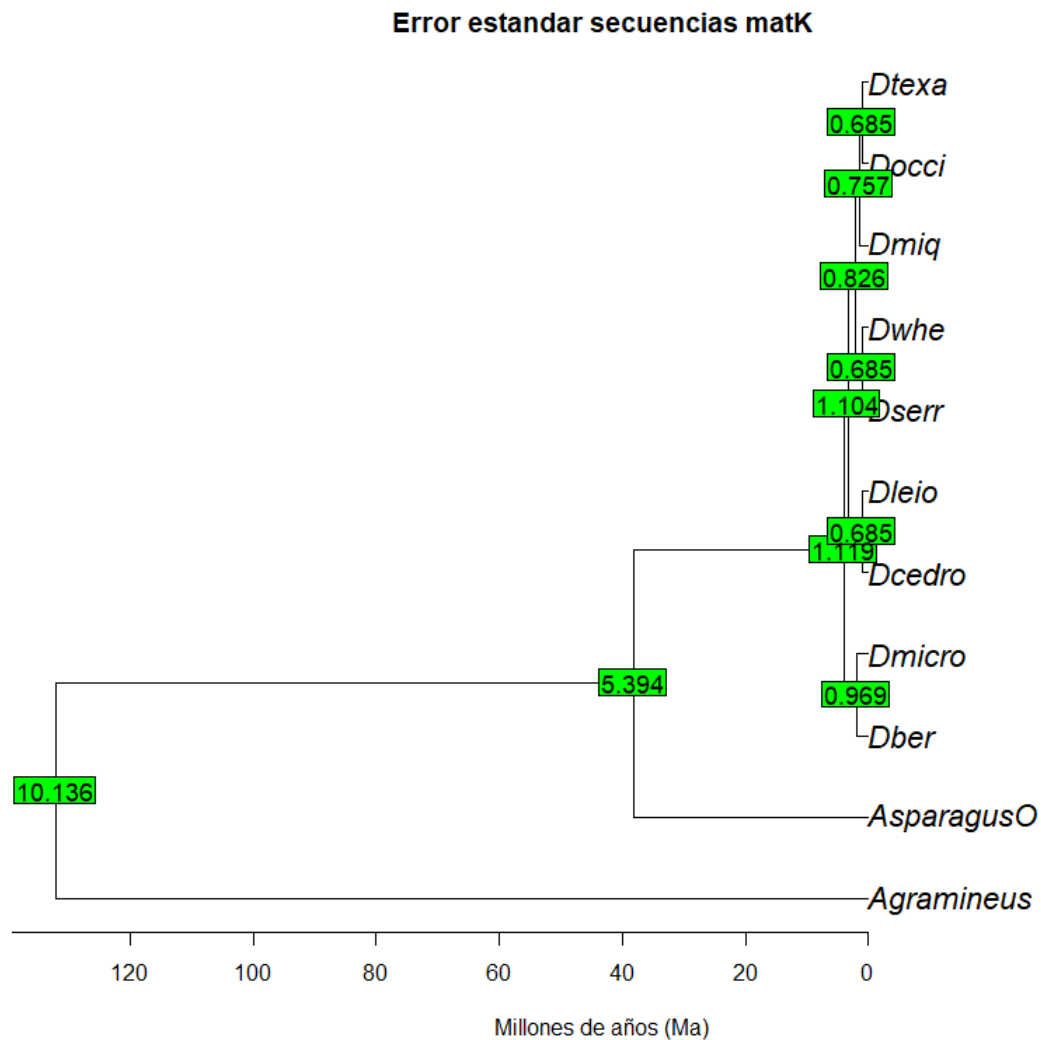


Figura 31. Árbol filogenético de las especies de *Dasyliirion* con errores estándar de los tiempos de divergencia estimados con base en secuencias *matK*.

En la Figura 32 se presenta el árbol filogenético construido con base en las secuencias *matK* y *rbcL* concatenadas. La topología del árbol es igual a la obtenida solo con secuencias *matK* (Figura 29). Esto se debe a que las secuencias *rbcL* no presentaron variación entre las especies de *Dasyliirion*, por lo tanto, no se modificaron las asociaciones obtenidas con base en secuencias *matK*. Los tiempos calculados con base en las secuencias concatenadas *matK-rbcL* son muy cercanos a los obtenidos solo con secuencias *matK*. Se calculó un tiempo de divergencia de 47.27 Ma entre *Dasyliirion* y el ancestro común con *Asparagus officinales*. Este valor es mayor al estimado solo con secuencias

secuencias *matK*. Este evento se ubica en la época del Plioceno durante la era Cenozoica entre 2.58 y 5.33 Ma (Stratigraphy. org, 2019). Cabe mencionar que esta estimación es mínima, ya que no se incluyen todas las especies de *Dasyilirion* en este estudio.

Se sabe que, durante el Plioceno, se formó el Istmo de Panama que unió a Sudamérica con Norteamérica hace 3.5 Ma. Este evento trajo consigo la extinción de fauna marsupial sudamericana y cambios en la temperatura global. Las corrientes ecuatoriales cálidas fueron cortadas y comenzó un ciclo de enfriamiento en el Atlántico. Se experimentaron cambios hacia un clima más frío, seco y estacional, lo cual ocasiono la reducción de las especies tropicales a nivel mundial. Los bosques caducifolios, de coníferas y tundra proliferaron, mientras que los pastizales se esparcieron y aparecieron la sabana y los desiertos en Asia y África.

El género *Dasyilirion* es uno de los grupos más adaptados a climas fríos y secos actualmente en zonas áridas y semiáridas de Norteamérica. Su tiempo mínimo de divergencia datado en 3.98 Ma corresponde con los eventos del Plioceno (2.58 a 5.33 Ma), marcado por cambios en el clima y la generación de vegetación adaptada a climas secos. Algunos autores refieren que la generación de climas secos y la vegetación adaptada a ellos, parece ser una de las circunstancias que contribuyeron a la diferenciación de los antepasados del género *Homo* en el este de África.

Las estimaciones de edades de divergencia entre algunas especies de *Dasyilirion* son menores a partir de secuencias concatenadas. Se estimó un tiempo de 0.78 Ma, entre *D. leiophyllum* y *D. cedrosanum*. Para *D. berlandieri* y *D. micropterum* se estimó un tiempo de 1.57 Ma. Para las especies de *D. serratifolium* y *D. wheeleri* se estimaron tiempos de divergencia de 0.78 Ma, al igual que la asociación entre *D. texanum* y *D. occidentalis*. Estas dos últimas comparten un ancestro común con *D. miquihuanense*, con una edad de divergencia de 1.18 Ma.

Algunos investigadores han realizado estudios para determinar tiempos de divergencia en familias como la Agavaceae. Bogler (2006) estima el origen de la

familia < 40 Ma. Otros estudios indican que la familia Cactaceae probablemente se originó hace 30 Ma (Nyfeller, 2002). De acuerdo a la edad datada para el género *Dasyilirion*, es probable que éste se haya originado hace aproximadamente 3.98 Ma, estimación mínima ya que no se incluyen todas las especies de *Dasyilirion*, con lo cual se puede considerar como género relativamente joven.

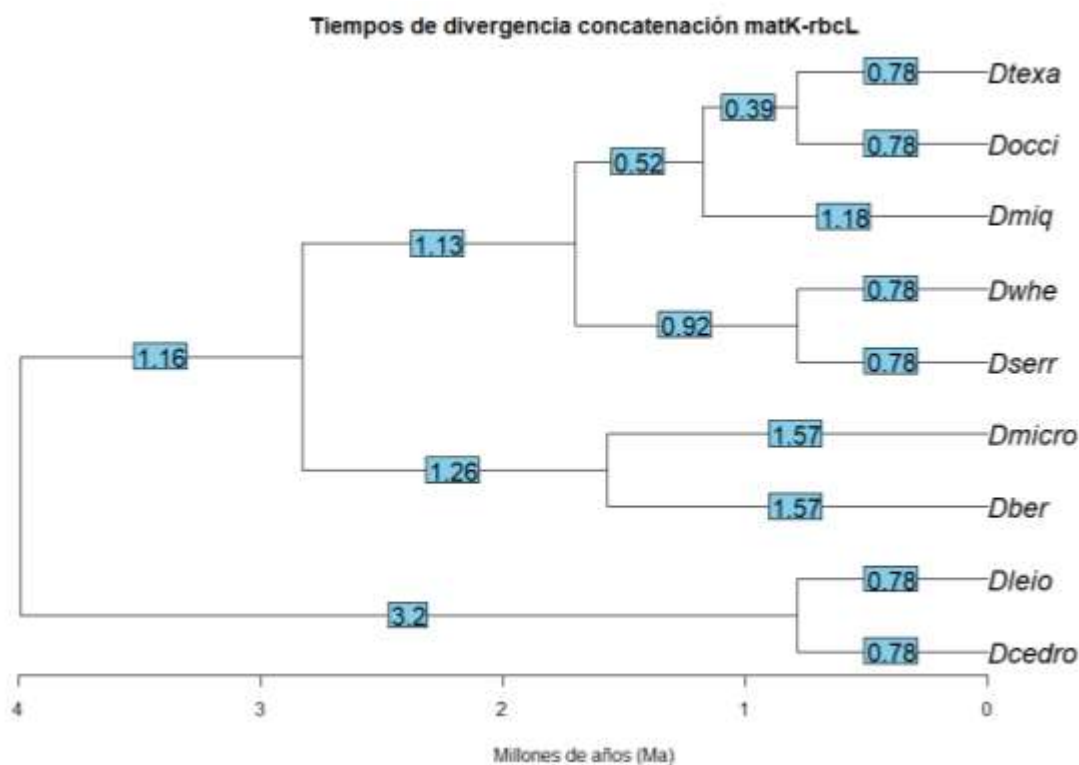


Figura 33. Subárbol para las especies de *Dasyilirion*, con tiempos evolutivos a partir de secuencias concatenadas *matK-rbcL*.

En la Figura 34 se presenta el árbol filogenético para las especies de *Dasyilirion* a partir de secuencias concatenadas *matK-rbcL*, donde el valor en cada nodo representa el error estándar (EE) para los tiempos de divergencia calculados en la Figura 32. De acuerdo a los datos obtenidos, se deduce que *Dasyilirion* y *A. officinales* (género *Asparagus*) divergieron a partir de un ancestro común hace 47.27 millones de años (Ma) \pm 2 EE (6.06) = 12.12, en un rango de 35.15 a 59.39 Ma. Mientras que para las especies de *Dasyilirion* se estima un tiempo de

divergencia a partir de un ancestro común, al menos hace 3.98 Ma \pm 2 EE (1.22) = 2.44, en un rango de 1.54 a 6.42 Ma.

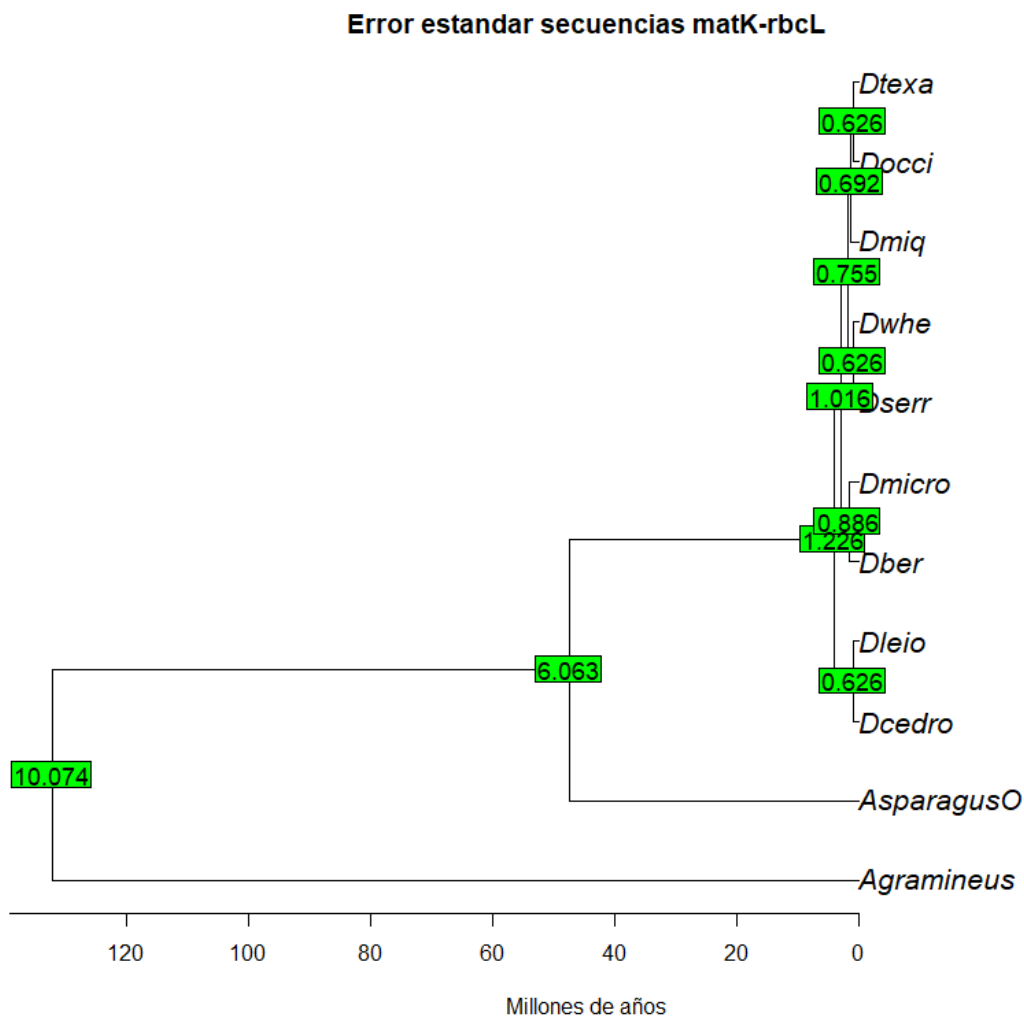


Figura 34. Árbol filogenético de las especies de *Dasyliirion* con errores estándar de los tiempos de divergencia estimados con base en secuencias concatenadas *matK-rbcL*.

Análisis bromatológico en semilla de *D. cedrosanum*

En el Cuadro 9 se presenta el contenido nutricional de la harina de semilla de sotol y trigo, con porcentajes basados en 100 g de muestra. Uno de los factores importantes en la conservación y el almacenamiento de semillas es el contenido de humedad. En los cereales, el porcentaje de humedad ideal para prevenir el desarrollo de insectos es entre 10 y 15%. Los bajos contenidos de humedad,

así como las temperaturas inferiores a 10 °C, ayudan a evitar el deterioro de las semillas durante el almacenamiento, ya que las condiciones mínimas de agua impiden el desarrollo de microorganismos como hongos, bacterias e insectos (Rao *et al.*, 2007; Roberts y Ellis, 1989). El contenido de humedad de las semillas de sotol (9%) fue similar al contenido de humedad encontrado en el trigo. El contenido de humedad encontrado en trigo concuerda con datos reportados en tablas de composición de alimentos (9.1%) (Muñoz de Chávez, 2010). Sin embargo, este parámetro puede variar según el proceso de secado de las semillas después de la cosecha.

El contenido promedio de proteína en las semillas de sotol (27.7%) superó en gran medida el contenido en harina de trigo (16.0%), los valores encontrados en trigo fueron moderadamente más altos que los reportados (10.6%) por Muñoz de Chávez (2010) y muy cercanos (14.2%) a los reportados por NRC (Nutriment Requirements of Dairy Cattle, 2001). Cabe mencionar que existe la posibilidad de que el trigo que se utilizó como control, provenga de un programa de mejoramiento, por lo cual pueda aumentar su contenido proteico a diferencia del reportado por Muñoz de Chávez (2010). El alto contenido de proteínas en el sotol implica un mayor contenido de aminoácidos, así como la presencia potencial de enzimas, cuya importancia depende de su funcionalidad.

El trigo tiene algunas enzimas hidrolíticas que descomponen los carbohidratos, como las amilasas α y β , y otras enzimas proteolíticas que incluyen lipasas, esterases, fosfatasas, fitasas y lipoxigenasas (Koehler y Wieser, 2013). En la actualidad no existe literatura sobre el contenido nutricional de las semillas de sotol, por lo tanto, se desconoce el tipo de proteínas. Además del trigo, el contenido de proteína en sotol fue mayor que el reportado en otros cereales importantes, como el maíz (9.4%) y el arroz (7.4%) (Muñoz de Chávez, 2010).

El contenido de proteína de las semillas de sotol de las diferentes localidades presentó pequeñas diferencias significativas. Las diferencias en el contenido de proteína de Buenavista 30.5%, San Miguel 27.5% y El Novillo 25.0% pueden deberse a que las plantas de Buenavista tienen una mejor distribución e irrigación, lo que se traduce en una mayor disponibilidad y un mayor flujo de

nitrato (NO₃) o nitrógeno amónico (NH₄⁻) en el suelo, lo que lleva a una absorción de nitrógeno superior de la planta.

De manera general, el contenido de cenizas representa la materia inorgánica, o la concentración mineral en los alimentos. El contenido de ceniza en las semillas de sotol (2.2%) es muy similar al determinado en trigo (2.1%) y al reportado por NRC (2001) para trigo (2.0%). Se presentaron diferencias significativas en el contenido de ceniza entre las ubicaciones, donde Buenavista presentó una mayor concentración de minerales (2.4%) que San Miguel (2.1%) y El Novillo (2.1%). El porcentaje de ceniza depende en gran medida de la composición o el tipo de suelo donde crece la especie (Hidalgo *et al.*, 2009).

El contenido de grasa en las semillas de sotol fue once veces mayor (18.4%) que en el trigo (1.6%). Muñoz de Chávez (2010) reporta un valor para el trigo (2.6%), cercano al registrado en esta investigación. El contenido de grasa en la harina de sotol implica una alta probabilidad de encontrar lípidos que son nutricionalmente importantes. En general, las semillas tienen ácidos grasos que proporcionan consistencia y estructura a los alimentos. También contribuyen con el aroma, el sabor, el color y la sensación de saciedad.

Entre los ácidos grasos, los más beneficiosos son los ácidos poliinsaturados, con más de un doble enlace, incluido el ácido linoleico (Omega 6, C18: 2n6c) y el ácido linolénico (Omega 3, C18: 3n3) (Calder, 2001). Estos ácidos son muy importantes porque el cuerpo humano ya que no puede sintetizarlos y los alimentos son su única fuente. Son precursores de ácidos como el eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) que tienen muchos efectos beneficiosos para la salud. Como parte de la dieta humana, estos ácidos reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, mejoran la neurotransmisión al mejorar la función de sinapsis y ayudan a inhibir el crecimiento de las células cancerosas (Mantzioris *et al.*, 2000).

Las partículas de fibra no digeribles y no absorbibles sirven como vehículos para otros nutrientes. Añaden volumen a la dieta y ayudan a eliminar los residuos. Las semillas de sotol mostraron diez veces más fibra (16,2%) que el

trigo (1,7%). Muñoz de Chávez (2010) reporta un contenido de fibra en el trigo de 3.3%, que no está muy lejos del que se encuentra en esta investigación.

El extracto libre de nitrógeno (hecho principalmente de carbohidratos solubles, almidón y hemicelulosa) se ha encontrado en altas concentraciones en cereales como el trigo, el sorgo y el maíz (Surco-Almendras y Alvarado-Kirigin, 2010). El sotol contiene (35.5%), comparativamente menos de la mitad en comparación con el trigo (78.6%). En las tablas de composición de alimentos, los valores de trigo (73.4%) (Muñoz de Chávez, 2010), son cercanos a los encontrados en este trabajo.

Cuadro 9. Contenido nutricional de la semilla de *D. cedrosanum* de dos localidades del Sureste de Coahuila y una de Zacatecas. Los resultados son basados en 100 g de harina de semilla.

Localidad	Materia seca	Humedad	Proteína cruda	Ceniza	Extracto etereo	Fibra cruda	Extracto libre de nitrógeno
	(%)*						
Buenavista	91.6 ± 0.2	8.4 ± 0.2	30.5 ± 1.0	2.4 ± 0.0	16.9 ± 0.3	14.2 ± 0.5	36.0 ± 1.5
San Miguel	90.8 ± 0.1	9.2 ± 0.1	27.5 ± 1.1	2.1 ± 0.0	17.8 ± 1.0	16.8 ± 1.2	35.8 ± 1.8
El Novillo	90.5 ± 0.2	9.5 ± 0.2	25.0 ± 0.6	2.1 ± 0.0	20.5 ± 1.4	17.8 ± 0.7	34.6 ± 0.3
Promedio (sotol)	91.0 ± 0.1 a	9.0 ± 0.0 a	27.7 ± 0.6 a	2.2 ± 0.0 a	18.4 ± 0.6 a	16.2 ± 0.5 a	35.5 ± 0.1 b
Control (trigo)	90.2 ± 0.0 a	9.8 ± 0.1 a	16.0 ± 0.0 b	2.1 ± 0.0 a	1.6 ± 0.0 b	1.7 ± 0.1 b	78.6 ± 0.7 a

Los valores son medias ± error estándar; *Medias dentro de columnas seguidas por letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Para el promedio de sotol y trigo, los números en letra negrita son significativamente más altos que su contraparte (Tukey, 0.05).

Análisis mineral en semilla de *D. cedrosanum*

El contenido mineral de macroelementos y microelementos en harina de sotol y trigo se muestra en el Cuadro 10. Los minerales participan en una gran cantidad de funciones, tanto en plantas como en humanos. Los macronutrientes (K, Na, Mg, Ca y P) se encuentran en los tejidos de las plantas a concentraciones superiores al 0,1% en materia seca (Marles, 2017; Martínez-Ballesta *et al.*, 2010). El calcio es uno de los elementos nutricionales humanos más valiosos, y en combinación con el fósforo, proporciona resistencia a las estructuras óseas. La leche materna contiene 32 mg de calcio por cada 100 g (0.32 mg g⁻¹). En la harina de semilla de sotol, la concentración de calcio alcanzó los 7.0 mg g⁻¹, mientras que en la harina de trigo la concentración de calcio fue de 0.2 mg g⁻¹. Por lo tanto, 100 g de harina de semilla de sotol tienen 700 mg de Ca; treinta y cinco veces más Ca que el trigo (20 mg por 100 g) y veintitrés veces más Ca que la leche materna. Los niveles de ingesta diaria recomendada de Ca para niños son de 400 a 700 mg y la ingesta diaria recomendada de Ca para adultos es de 400 a 500 mg. Todavía no sabemos si el calcio en el sotol se puede digerir. Por lo tanto, es necesario estudiar la naturaleza de este importante macroelemento nutricional para evaluar su disponibilidad con fines nutricionales (Latham, 1997).

El hierro es uno de los microelementos que se encuentran en niveles bajos en seres humanos (3 a 4 g en adultos, en peso corporal kg⁻¹). La tarea principal del hierro es transportar oxígeno, y el cuerpo pierde 1 mg al día. La leche materna tiene 2 mg de hierro por litro; que es una cantidad relativamente baja, ya que la ingesta diaria recomendada es de 15 mg (mujeres en edad fértil). Las semillas de sotol contienen 5,5 mg 100 g⁻¹ de hierro, que es más alto que el trigo (0,8 mg 100 g⁻¹) y más alto que el contenido de leche materna (2 mg L⁻¹) (Latham, 1997).

El zinc es uno de los elementos de las enzimas esenciales en el metabolismo humano. La falta de zinc puede conducir a enfermedades congénitas y problemas de crecimiento en los seres humanos. La ingesta diaria recomendada de zinc en adultos es de 15 mg. La harina de sotol contiene 79.2

$\mu\text{g g}^{-1}$ de zinc, mientras que el trigo solo $31.6 \mu\text{g g}^{-1}$, valor muy cercano al reportado por NRC (2001) de $40 \mu\text{g g}^{-1}$; por lo tanto, la harina de sotol tiene dos veces más zinc que la harina de trigo, lo que ofrece el beneficio potencial de contribuir con nutrientes adicionales a la dieta humana y / o animal.

El sodio y el potasio son sales que se encuentran en los líquidos corporales. El sodio es extracelular, el potasio es intracelular y ambos forman parte del proceso de regulación osmótica. El Na se cuantificó en mayor proporción (1.7 mg g^{-1}) en la harina de sotol que en el trigo (0.04 mg g^{-1}).

El fósforo es uno de los macroelementos nutricionales importantes y se encuentra principalmente en huesos y dientes, en proporción 1: 2 con Ca, que forma parte de las moléculas involucradas en el metabolismo energético, como el ATP, y también desencadena reacciones en diferentes partes del cuerpo y forma parte de las membranas celulares. La ingesta diaria recomendada en adultos es de 800 g. La harina de sotol (2.9 mg g^{-1}) y la harina de trigo (2.5 mg g^{-1}) presentaron cantidades muy bajas en fósforo. La inclusión de otros tipos de alimentos en la dieta puede complementar esas cantidades bajas de fósforo. De manera resumida, se puede decir que los contenidos de Ca, Na, Zn, Fe y Cu fueron más altos en sotol que en harina de trigo.

Con respecto al P, Mg y K, las concentraciones de sotol y trigo fueron muy similares sin diferencias significativas, mientras que el Mn fue mayor en trigo que en sotol. La composición mineral varía entre cultivos y depende en gran medida del suelo donde crecen. Con respecto al contenido de nutrientes en la harina de semillas de sotol, se puede decir que el sotol tiene el potencial de contribuir con macro y micronutrientes a la dieta humana y animal, siempre que un análisis posterior descarte la presencia de elementos antinutricionales que pueden restringir su uso como alimento y fuente de alimentación. La concentración de minerales obtenidos del trigo, coincide con los reportados por Muñoz de Chávez (2010) en tablas de composición de alimentos.

Cuadro 10. Contenido mineral de la semilla de *D. cedrosanum* de dos localidades del Sureste de Coahuila y una de Zacatecas. Los resultados son basados en 100 g de harina de semilla.

Localidad	K	Na	Mg	Ca	P	Zn	Fe	Cu	Mn
	Macroelementos (mg g ⁻¹)*					Microelementos (µg g ⁻¹)*			
Buenavista	4.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.0 ± 0.4	7.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1	90.0 ± 4.3	71.0 ± 8.8	20.6 ± 1.8	12.0 ± 0.5
San Miguel	3.4 ± 0.8	2.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2	7.3 ± 0.1	2.6 ± 0.1	80.0 ± 4.6	47.0 ± 4.9	17.3 ± 0.8	10.0 ± 0.0
El Novillo	3.2 ± 0.1	1.4 ± 0.8	1.4 ± 0.3	6.5 ± 0.1	2.7 ± 0.2	67.6 ± 5.6	49.0 ± 5.1	20.3 ± 3.3	11.6 ± 0.6
Promedio (sotol)	3.6 ± 0.2 a	1.7 ± 0.2 a	1.8 ± 0.0 a	7.0 ± 0.1 a	2.9 ± 0.1 a	79.2 ± 4.0 a	55.6 ± 5.0 a	19.4 ± 1.2 a	11.2 ± 1.4 b
Control (trigo)	3.9 ± 0.3 a	0.04 ± 0.0 b	2.0 ± 0.2 a	0.2 ± 0.0 b	2.5 ± 0.2 a	31.6 ± 1.4 b	8.0 ± 0.5 b	4.0 ± 0.0 b	29.6 ± 0.4 a

Los valores son medias ± error estándar; *Medias dentro de columnas seguidas por letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Para el promedio de sotol y trigo, los números en letra negrita son significativamente más altos que su contraparte (Tukey, 0.05).

Análisis bromatológico del germinado de semillas de *D. cedrosanum*

En el Cuadro 11 se presenta el contenido nutricional del germinado de semilla de *D. cedrosanum*, comparado con el contenido nutricional de germinados de semillas como alfalfa, lenteja, soya y trigo (tipo comercial), algunos de los más consumidos en la actualidad. Las determinaciones en germinado de sotol fueron basadas en 100 g de germinado deshidratado.

El contenido nutricional de los germinados varía de acuerdo a la semilla de la que provienen. El contenido de proteína cruda en el germinado de sotol fue de 49.36%. Esta cantidad es menor a la publicada en germinados de tipo comercial, como el de alfalfa (54.0%) y el de soya (62.0%), dos de los germinados de mayor consumo humano. Mientras que el germinado de sotol supera a otros tipos como el de lentejas con 28.0% y trigo con 13.4 %, que a pesar de no superar el 50% de proteína, también son de consumo común como complemento en la dieta.

Un segundo componente que aportan los germinados es su contenido de grasa, que por lo general es bajo. El contenido de grasa en el germinado de sotol es de 10.47%, superior al cuantificado en germinados comerciales de lenteja (4.0%), soya (0%) y trigo (4.2%), pero relativamente inferior al cuantificado en germinado de alfalfa (24%). Germinados con bajos contenidos calóricos suelen ser recomendados para personas que necesitan dietas reducidas en calorías.

Un tercer componente que aportan los germinados es el contenido de azúcares estos son de vital importancia en la dieta y además proporcionan sabor. Estos se incluyen en la cuantificación del extracto libre de nitrógeno (ELN). El germinado de sotol contiene 17.42% de ELN, valor cercano al etiquetado en germinados de alfalfa (22.0%) y soya (38.0%). Mientras que los germinados de lenteja (68.0%) y trigo (58.15%) registran cantidades superiores a las cuantificadas en sotol.

El aporte de fibra en conjunto con los bajos contenidos de grasa hace de los germinados, alimentos imprescindibles en dietas de adelgazamiento. Favorecen el tránsito intestinal y ayuda a reducir los niveles de colesterol en la sangre. El

contenido de fibra en el germinado de sotol se cuantificó alrededor de 18.88%, valor semejante al del germinado de trigo con 23.80%.

Cuadro 11. Contenido nutricional del germinado de semilla de *D. cedrosanum*. Los resultados son basados en 100 g de germinado deshidratado.

Germinado	Materia seca	Humedad	Proteína cruda	Ceniza	Extracto etéreo	Fibra cruda	Extracto libre de nitrógeno
	(%)*						
Sotol	87.07	12.93	49.36	3.87	10.47	18.88	17.42
Alfalfa)	-----	-----	54.00	-----	24.00	-----	22.00
Lenteja	-----	-----	28.00	-----	4.00	-----	68.00
Soya	-----	-----	62.00	-----	0.0	-----	38.00
Trigo	-----	-----		-----	4.20	23.80	58.15
			13.40				

Los contenidos del germinado de alfalfa, lenteja, soya y trigo provienen de germinados de tipo comercial. Los contenidos del germinado de sotol (*D. cedrosanum*), se determinaron en el laboratorio de nutrición animal de la UAAAN.

CONCLUSIONES

Los nuevos oligonucleótidos, *matK* 335F y *matK* 1327R son de valor para la obtención de código de barras de la vida en especies de *Dasyllirion*. El diseño de iniciadores específicos facilita la tarea de identificación de las especies. La variación nucleotídica encontrada en el gen *matK* fue de gran utilidad para la construcción filogenética y estimación de tiempos de divergencia entre especies de *Dasyllirion*.

Con la excepción de *D. serratifolium* y *D. wheeleri*, el agrupamiento de especies tiene una concordancia ecológica y geográfica. El tiempo de divergencia mínimo estimado para el género *Dasyllirion* en aproximadamente 3.98 Ma, coincide con los cambios generados en el Plioceno de la era Cenozoica entre 2.58 y 5.33 Ma. En este periodo el cambio de clima hacia uno más frío y seco trajo consigo el surgimiento de vegetación más adaptada a zonas áridas. La edad estimada es relativamente joven y coincide con el tiempo de diferenciación del género *Homo*, relacionado con la aparición de climas secos.

Las semillas de sotol poseen macro y microelementos comparables a los encontrados en las semillas de otros cereales de consumo humano como el trigo y el maíz. Incluso los contenidos como el de proteínas, grasa y fibra son superiores en la semilla de sotol, lo cual lo coloca como un proveedor de aminoácidos y ácidos grasos potencial para la dieta humana, sobre todo para habitantes de zonas rurales, que podrían utilizarlo en un futuro como un complemento alimenticio. El germinado a base de semilla de sotol es una opción para consumir los macro y micronutrientes de la semilla en formas fácilmente digeribles, y con la mayor seguridad, ya que durante la germinación por lo general las semillas disminuyen considerablemente las concentraciones de antinutrientes existentes.

REFERENCIAS

- ABASCAL, F., I. IRISARRI y R. ZARDOYA. Filogenia y evolución molecular. En: Sebastián A. y Pascual-García A. (eds.). Bioinformática con Ñ. 2014, 231-258.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 20 th Edition, Washington DC. 1980.
- APG-III. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot. J. Linn. Soc. 2009, 161, 105-121.
- BOGLER, D.J. Taxonomy and phylogeny of *Dasyilirion* (Nolinaceae). Ph.D. dissertation. University of Texas at Austin, 1994, 586 pp.
- BOGLER, D.J. Three new species of *Dasyilirion* (Nolinaceae) from Mexico and a clarification of the *D. longissimum* complex. *Brittonia*.1998, 50 (1), 71-86.
- BOGLER, D.J., J. C. PIRES and J. FRANCISCO-ORTEGA. Phylogeny of Agavaceae based on *ndhF*, *rbcL* and ITS sequences: implications of molecular data for classification. In: Columbus J. T., Friar, E. A., Porter, J. M., Prince, L. M and Simpsom M. G. (eds). *Monocots: Comparative Biology and Evolution* (Rancho Santa Ana Botanicals Gardens, Claremont, CA). 2006, 313-328.
- BOTERO-MEJIA, B. A. Los germinados como alimento excepcional y medicina natural. 3ra edición. Bogotá, Colombia: Germinados Cosecha Sagrada, 2015.
- CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids*. 2001, 36, 1007-1024. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601478>
- 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.

- COELLO-COUTINO, J. Oportunidades comerciales del sotol (*Dasyliirion* spp.) como alternativa a la producción campesina del Estado de Coahuila. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2003, Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.
- CUÉNOUD, 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.
- DAHLGREN, R. M. T., H. T CLIFFORD and P. F. YEO. The families of the monocotyledons: structure, evolution, and taxonomy. Springer. 1995. 520 pp.
- DE LA GARZA, H., J. BUENROSTRO, M. REYES-VEGA, R. RODRIGUEZ, D. G. MARTINEZ y C. N. AGUILAR. Chemical profile of sotol analyzed by solid phase microextraction-gas chromatography. *American Journal of Agricultural and Biological Science*. 2010, 5, 261-268. <http://dx.doi.org/10.3844/ajabssp.2010.261.268>
- DOS REIS, M., P. C. J. DONOGHUE and Z. YANG. Bayesian molecular clock dating of species divergences in the genomics era. *Nature Reviews Genetics*. 2016, 17, 71-80.
- ESPINOSA-ASUAR, L. Guía práctica sobre la técnica de pcr. En: *Ecología Molecular*. Eguiarte L. E., Souza V. y Aguirre X. (Comp.). Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 2007, pp: 517-536.
- FENERO, R., E. THOMAS, L. ALEGRET y E. MOLINA. Evolución paleoambiental del tránsito eoceno-oligoceno en el Atlántico sur (Sondeo 1263) basada en foraminíferos betónicos. *Geogaceta*. 2010, 49, 3-6.
- FIGUEROA-YÁÑEZ L, J. CANO-SOSA, E. CASTAÑO, A. L. ARROYO-HERRERA, J. H. CAAMAL-VELAZQUEZ, F. SANCHEZ-TEYER, R. LÓPEZ-GÓMEZ, C. DE LOS SANTO-BRIONES y L. RODRÍGUEZ-ZAPATA. 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*. 2012, 109(3), 429-438. DOI 10.1007/s11240-011-0107-4

FLORES OF NORTH AMERICA EDITORIAL COMMITTEE (1993) *Flora of North America North of Mexico*. New York and Oxford. 26: 422-423. <http://beta.floranorthamerica.org/>

FRIIS, E.M., K. R. PEDERSEN and P. R. CRANE. Araceae from the early cretaceous of Portugal: evidence on the emergence of monocotyledons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101(47), 16565–16570. DOI:10.1073/pnas.0407174101

GOOD-AVILA, S. V., V. SOUZA, B. S. GAUT and L. E. EGUIARTE. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *PNAS*. 2006, 103(24), 9124-9129. Doi/10.1073/pnas.0603312103.

GRANADOS-SÁNCHEZ, D., A. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, R. L. GRANADOS-VICTORINO y A. BORJA DE LA ROSA. Ecología de la vegetación del desierto Chihuahuense. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2011, 17, 111-130.

GREGORY, T. R. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature*. 2005, 434(7037), 1067. <https://doi.org/10.1038/4341067b>

HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. BALL and J. R. DEWAARD. Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 2003, 270, 313-321. DOI:10.1098/rspb.2002.2218

HEBERT, P. D. N. and T. R. GREGORY. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*. 2005, 54(5), 852-859. DOI:10.1080/10635150500354886

HERMAN, E. M. Soybean seed proteome rebalancing. *Frontiers in Plant Science*. 2014, 5(437), 1-8. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00437>

HERNÁNDEZ-JUÁREZ, A., Caracterización morfológica, anatómica e histológica del sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.). Tesis Ingeniero en

Agrobiología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, 2008, Saltillo, Coahuila. México.

HERNÁNDEZ-QUINTERO, J. D., M. H. REYES-VALDÉS, D. V. MENDOZA-RODRÍGUEZ, M. GÓMEZ-MARTÍNEZ and R. RODRÍGUEZ-HERRERA. Study of the mitotic and meiotic chromosomes of sotol (*Dasylion cedrosanum* Trel). *Phyton*. 2015, 84(1),107-112.

HIDALGO, A., A. BRANDOLINI and S. RATTI. Influence of genetic and environmental factors on selected nutritional traits of *Triticum monococcum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57(14), 6342-6348. <http://dx.doi.org/10.1021/jf901180q>

HOCHSTÄTTER, F. El género *Dasylium*. (Nolinaceae) parte 3. *Piante Grasse*. 2011, 31(4), 176-177.

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL (2002) Declaración general de protección de la denominación de origen "sotol". México. Disponible en: <http://www.int/wipolwx/en/text.jsp?file id=220963>

ISTA, International Seed Testing Association (2018) International rules for seed testing. Zurich, Switzerland. https://www.seedtest.org/en/ista-rules-for-2018-_content---1--3395--1030.html (January 2018).

JANZEN, D. A DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2009, 106(31), 12794-12797.

JANZEN, D. H., W. HALLWACHS, P. BLANDIN, J. M. BURNS, J. M. CADIOU, I. CHACON et al. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Mol Ecol Resour*. 2009, 9(s1),1-26. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2009.02628.x

JENSEN, B. *Semillas y Germinados*. 10ª ed. México: Editora y distribuidora Yung. S.A. 1994.

JING, Y., X. JIAN-HUA. and Z. SHI-LIANG. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 2011, 49(3), 176-181. DOI: 10.1111/j.1759-6831.2011.00134.x

- KALENDAR, R., B. KHASSENOV, Y. M. RAMANKULOV, O. SAMUILOVA and K. I. IVANOV. FastPCR: an *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*. 2017, 109 (3-4), 312-319. DOI:10.1016/j.ygeno.2017.05.005.
- KIM, D. K. and J. H. KIM. National Center for Biotechnology Information. Submitted (08-Jul-2010) Life Sciences, Kyungwon University, 65 Bokjeong-Dong, Sujeong-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi-Do. 2010, 461-701, Korea. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- KOEHLER, P. y H. WIESER. Chemistry of cereals grains. In Gobbetti M. and Gänzle M. (eds.). *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer Science+Business Media, New York, USA. 2013, pp: 11-45. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0_2
- KRESS, W. J. and D. L. ERICKSON. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*. 2007, 2(6), e508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- LANTERI, A. DNA barcoding and its possible applications to the field of Entomology. *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 2007, 66(3-4), 15-25.
- LATHAM, M. Human nutrition in the developing world: Food and Nutrition Series. FAO, Rome, Italy. 1997.
- LEVIN, R. A., W. L. WAGNER, P. C. HOCH, M. NEPOKROEFF, J. C. PIRES, E. A. ZIMMER and K. J. SYTSMA. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *American Journal of Botany*. 2003, 90(1), 107-115. <http://doi.org/1.3732/ajb.90.1.107>
- LOPES, M. A., K. TAKASAKI, D. E. BOSTWICK, T. HELENTJARIS and B. A. LARKINS. Identification of two *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Molecular and General Genetics*. 1995, 247(5): 603-613.
- LÓPEZ-BARBOSA, L. A. El sotol en Coahuila, potencialidades y limitaciones. En: *Bebidas y regiones, historia e impacto de la cultura etílica en*

México. Conteras-Delgado C. y Orega-Ridaura I. (eds). Plaza y Valdés, S.A. México. 2005, pp: 63-84.

LUO, A. and HO, S. Y. W. The molecular clock and evolutionary timescales. *Biochem Soc Trans.* 2018, 46(5), 1183-1190. DOI:10.1042/BST20180186

MAGALLÓN, S y M. J. SANDERSON. Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution.* 2001, 55(9), 1762-1780.

MANTZIORIS, E., L. G. CLELAND, R. A. GIBSON, M. A. NEUMANN, M. DEMASI and M. J. JAMES. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *American Journal Clinical Nutrition.* 2000, 72(1), 42-48. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/72.1.42>

MARLES, R. J. Mineral nutrient composition of vegetables, fruits and grains: The context of reports of apparent historical declines. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2017, 56, 93-103, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.012>

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C., R. DOMINGUEZ-PERLES, D. A. MORENO, B. MURIES, C. ALCARAZ-LÓPEZ, E. BASTÍAS, C. GARCÍA-VIGUERA and M. CARVAJAL. Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review. *Agronomy for Sustainable Development.* 2010, 30(2), 295-309. <http://dx.doi.org/10.1051/agro/2009022>

MARTÍNEZ-CASTILLA, L. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En: *Ecología Molecular.* Eguiarte L. E., Souza V. y Aguirre X. (Comp.). Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 2007, pp: 87- 160.

MATTHÄUS, B., K. AITZETMÜLLER y H. FRIEDRICH. The new database "seed oil fatty acids" (SOFA). *Grasas y Aceites.* 2003, 54(2), 188-193. <https://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i2.264>

MUÑOZ DE CHÁVEZ, M. Composición de Alimentos: Valor Nutritivo de

los Alimentos de Mayor Consumo. En: Los Alimentos y sus Nutrientes: Tablas de Valor Nutritivo de Alimentos. J. A. Ledesma-Solano et al., (eds.). 2a ed. internacional. Mc Graw Hill Interamericana. 2010.

NABR. Northwest association for biomedical research and research national science foundation. Using Bioinformatics: Genetic Research. https://www.nwabr.org/sites/default/files/Genetic_Research_Overview_NWAB.2012.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board and Agriculture National Research Council. 7th rev. ed. National Academy Press. Washington, D. C. 2001

NYFFELER, R. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/ matK and trnL-trnF sequences. *Am J Bot.* 2002, 89(2), 312-326. DOI: 10.3732/ajb.89.2.312.

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>

RAO, N. K., J. HANSON, M. E. DULLOO, K. GHOSH, D. NOVELL y M. LARINDE. Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for Genebanks No. 8. Bioersivity International, Rome, Italy. 2006.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/> (July 2017).

REYES-VALDÉS, M. H., A. BENAVIDES-MENDOZA, H. RAMÍREZ-RODRÍGUEZ y J. A. VILLARREAL-QUINTANILLA. Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion spp*). Parte I: sistemática, genética y reproducción. *Planta.* 2012, 7(14), 11-13.

REYES-VALDÉS, M. H., J. D HERNÁNDEZ-QUINTERO, Y. A. MORALES-REYES, D. V. MENDOZA-RODRÍGUEZ, D. U. GONZALEZ-URIBE, F. RAMÍREZ-GODINA and J. A. VILLARREAL-QUINTANILLA. Sex ration

and spatial distribution of pistillate and staminate plants of *Dasyilirion cedrosanum*. *Phyton*. 2017. 86,171-180.

REYES-VALDÉS, M. H., R. PALACIOS, E. N. RIVAS-MARTÍNEZ, A. ROBLEDO-OLIVO, A. ANTONIO-BAUTISTA, C. M. VALDÉS-DÁVILA, J. A. VILLARREAL-QUINTANILLA and A. BENAVIDES-MENDOZA. The sustainability of mexican traditional beverage sotol: ecological, historical, and technical issues. A. M. Grumezescu and A. M. Holban (eds). In *Processing and Sustainability of Beverage*. Woodhead Publishing. 2019, 103-137. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815259-1.00004-5>.

ROBERTS, E. H y R. H. ELLIS. Water and seed survival. *Annals of Botany* 1989, 63, 39-52, <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087727>.

ROZEN, S. AND H. J. SKALETISKY. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Misener, S. and Krawetz, S. A. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2000, pp: 365-386.

RZEDOWSKI, J. Notas sobre la flora y la vegetación del Estado de San Luis Potosí. *Ciencia; Revista hispano americana de ciencias puras y aplicadas*. 1955, 15(4-5): 91-92.

RZEDOWSKI, J. Relaciones geográficas y posibles orígenes de la flora de México. *Bol. Soc, Bot. Méx.* 1965, 29, 121-177.

SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*. 1977, 74(12), 5463-5467.

SANGRONIS, E. y C. J. MACHADO. Influence of germination on the nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* and *Cajanus cajan*. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 2007, 116-120.

SATO, D. Analysis of karyotypes in *Yucca*, *Agave* and related genera with special reference to the phylogenetic significance. *Jpn. J. Genet.* 1935, 11(5), 272-278. DOI: 10.1266/jjg.11.272

SCHINDEL, D. E. and S. E. MILLER. DNA barcoding a useful tool for

- taxonomists. *Nature*. 2005, 435, 17. DOI: 10.1038/435017b
- SCHLIEP, K. P. Phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011, 27(4), 592-593.
- SHORT, L., A. V. THOMS, B. CAO, A. M. SINYUKOV, A. JOSHI, R. SCULLY, V. SANDERS and D. V. VORONINE. Facile residue analysis of recent and prehistoric cook stones using handheld Raman spectrometry. *J. Raman Spectroscopy*. 2015, 46(1), 126-132.
- SIERRA-TRISTÁN, J. S., C. R. LARA-MACÍAS, R. CARRILLO-ROMO, A. MELGOZA-CASTILLO, C. MORALES-NIETO y M. H. ROYO-MÁRQUEZ. Los sotoles (*Dasyilirion* spp.) de Chihuahua. Folleto Técnico 20 INIFAP-CIRNOC. México. 2008, 58 p.
- SIERRA-TRISTÁN, J. S. y C. R. MORALES-NIETO. Técnica para mejorar la calidad de la semilla de sotol (*Dasyilirion* spp). Fichas tecnológicas sistema producto, INIFAP, Campo Experimental La Campana, Chihuahua, México. 2003.
- STRATIGRAPHY.ORG (2019) International Commission on Stratigraphy. Consulta: 19 agosto 2019. Disponible en: <http://www.stratigraphy.org/>
- SURCO-ALMENDRAS, J. C. and J. A. ALVARADO-KIRIGIN. Harinas compuestas de sorgo-trigo para panificación. *Revista Boliviana de Química* 2010, 27(1), 19-28.
- TAKHTAJAN, A. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Bot. Rev.* 1980, 46, 225-359.
- THE PLANT LIST (2013) Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>(accessed 11 th November).
- TROPICOS. ORG. (2018) Missouri Botanical Garden. Access: 10 Aug 2018 <http://www.tropicos.org/Name/40022176>
- TYLER, G. y A. ZOHLEN. Plant seeds as mineral nutrient resource for seedlings: a comparison of plants from calcareous and silicate soils.

Annals of Botany. 1998, 81(3), 455-459.
<http://dx.doi.org/10.1006/anbo.1997.0581>.

URBANO, G., P. ARANDA, A. VÍLCHEZ, C. ARANDA, L. CABRERA, J. M. PORRES and M. LÓPEZ-JURADO. Effects of germination on the composition and nutritive value of proteins in *Pisum sativum*, L. Food Chemistry. 2005. 93(4), 671-679.

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/4/cgi-bin/npgs/html/taxfam.pl> (27 May 2015)

VALENTINI, A., F. POMPANON and P. TABERLET. DNA Barcoding for Ecologists. Trends. Ecol. Evol. 2009, 24(2), 110-117.
DOI: 10.1016/j.tree.2008.09.011

VÁZQUEZ, Q. S. Combinación y concentración de reguladores de crecimiento para el enraizamiento de sotol (*Dasyllirion leiophyllum* Engelm. Ex. Trelase) *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Delicias, Chihuahua. 2001, 51 p.

VILLARREAL-QUINTANILLA, J. A. Listados Florísticos de México XXIII. Flora de Coahuila. Instituto de Biología, UNAM. México D.F. 2001, 139 pp.

VILLARREAL-QUINTANILLA, J. A., E. ESTRADA-CASTILLÓN, M. H. REYES-VALDÉS, J. A. ENCINA-DOMÍNGUEZ, O. MARTÍNEZ and F. HERNÁNDEZ-GODINEZ. *Dasyllirion micropterum* (Asparagaceae), a new species from Sierra Madre Oriental, México. Phytotaxa. 2016, 253(2), 139-146.

VILLAVICENCIO-GUTIÉRREZ, E., A. CANO-PINEDA y A. JUÁREZ-SANTANA. Guía para la micropropagación y producción *in vitro* de plantas de sotol (*Dasyllirion cedrosanum* Trel.). Folleto Técnico No. 37, INIFAP. Campo Experimental Saltillo, Coahuila, México. 2007.

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

YANG, Z. and B. RANNALA. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*. 2012, 13, 303-314.