



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	SEDE	División:	Agronomía	Departamento:	Fitomejoramiento
Tema estratégico (ANA/PEP):	Biotecnología				
Línea de investigación:	Marcadores genéticos				
Título del proyecto:	Código de barras de la vida y análisis filogenético en las especies de Dasyliiron del noreste de México				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	50,000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	<input checked="" type="checkbox"/>
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	Tecnológica	e-mail del responsable	
Vinculación:	Si	No	<input checked="" type="checkbox"/>	Fondos concurrentes:	
Cooperante(s):					
Entidad (es):		Municipio (s):	Saltillo, Irapuato		
Localidades:	Saltillo, General Cepeda, Ramos Arizpe, Cedros, Zacatecas, Valparaiso.				
A realizar durante el(los) año(s):	2016-1018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés	FIT	2174		
Colaborador:	Dra. Francisca Ramírez Godina	FIT	1145		
Colaborador:	Dr. José Ángel Villarreal Quintanilla	BOT	1061		
Colaborador:	Dr. José Eduardo García Martínez	NA	3006		
Colaborador:	Dr. Octavio Martínez de la Vega	LANGEBIO			
Colaborador:	Biol. Fernando Hernández Godínez	LANGEBIO			
Colaborador:	L.C.Q. Dulce Victoria Mendoza Rodríguez	FIT	3861		
Tesista:	Martha Monzerrath Orozco Sifuentes	Doctorado	61091192		
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:	Doctorado en Recursos Fitogenéticos para Zonas Áridas (REFIZA)				
Vo. Bo.			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Dr. Alfonso López Benítez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Código de barras de la vida y análisis filogenético en las especies de *Dasyilirion* del noreste de México

2.- Introducción

El género *Dasyilirion* comprende un grupo de plantas distribuidas principalmente en zonas áridas del Norte del país, son muy parecidas a los agaves y son utilizadas por los pobladores en la elaboración de cestería (Bogler, 1994), como forraje y de manera muy particular en la elaboración de una bebida alcohólica tradicional llamada "sotol". Esta bebida es considerada con calidad semejante a la del tequila y el mezcal y actualmente cuenta con protección a la denominación de origen para los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2001), constituyendo de esta manera un recurso natural con gran potencial de aprovechamiento económico. Existe un alto grado de diversidad incluso entre plantas de la misma especie, el proceso de una correcta identificación botánica con fines de aprovechamiento económico y de investigación se encuentra comprometido, lo cual es motivo para implementar nuevas herramientas que nos faciliten el proceso de identificación y al mismo tiempo generar nuevo acervo genético encaminado a incrementar su inventario taxonómico en zonas áridas y semiáridas.

La meta de este trabajo de investigación es caracterizar molecularmente y obtener análisis filogenético de por lo menos 10 especies del género *Dasyilirion*, para lo cual se realizarán colectas de hojas sanas de las diferentes especies de sotol en varias regiones del noreste mexicano, se analizarán muestras de DNA de cinco plantas diferentes de cada especie y los fragmentos de DNA (gen *rbcL* y gen *matK*) aislados y amplificados con PCR serán secuenciados y analizados por medio de programas informáticos, algunos de ellos pertenecientes a la Base de Datos del Código de Barras de la Vida (BOLD), BLAST y FinchTV, cuyo objetivo es alinear y determinar calidad de secuencias respectivamente y otros de acceso libre como *ape* (Analysis of Phylogenetics and Evolution), *phangorn* (Phylogenetic Analysis in R) y *phyclus* (Phylogenetic Clustering), paquetes del lenguaje y ambiente de cómputo R que nos darán información relevante sobre las relaciones filogenéticas dentro y fuera de especie.

Objetivos

1. Caracterizar especies de sotol con los genes *matK* y *rbcL*
2. Evaluar la eficiencia de estos genes en la distinción de especies de *Dasyilirion*
3. Construir árboles filogenéticos para el género
4. Estimar tiempos de divergencia evolutiva
5. Evaluar la calidad alimenticia de la harina de la semilla de *Dasyilirion cedrosanum*
6. Evaluar la calidad alimenticia del germinado de semilla de *Dasyilirion cedrosanum*

Hipótesis

1. La combinación de secuencias *matK* y *rbcL* es capaz de discriminar entre las especies de *Dasyilirion* del norte de México.

3.-Revisión de Literatura

El género *Dasyilirion* comprende un grupo de plantas distribuidas principalmente en zonas áridas del Norte del país, son muy parecidas a los agaves y son utilizadas por los pobladores en la elaboración de cestería (Bogler, 1994), como forraje y de manera muy particular en la elaboración de una bebida alcohólica tradicional llamada "sotol". Esta bebida es considerada con calidad semejante a la del tequila y el mezcal y actualmente cuenta con protección a la denominación de origen para los estados de Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2001), constituyendo de esta manera un recurso natural con gran potencial de aprovechamiento económico.

El sotol como se le conoce comúnmente es una planta perenne, dióica, con numerosas hojas largas, lineares, flexibles y arrosadas desde la base del tallo, presenta tonalidades gris a verde pálido con espinas en los bordes, cuenta con un escapo o garrocha que puede llegar a medir hasta 4.5 m de altura, de la cual se desprende una inflorescencia con flores pequeñas en panículas, se propaga por semilla, su fruto es una cápsula indehiscente y

florece cada año excepto cuando se presenta una sequía prolongada.

Existen 17 especies distribuidas sobre los terrenos áridos y montañosos de Arizona, Nevada, Nuevo México y Texas en los Estados Unidos de Norte América y dentro de la República Mexicana, en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Veracruz (Bogler, 1994, Villarreal *et al.*, 2016).

Actualmente el género *Dasyilirion* se encuentra clasificado dentro de la familia *Asparagaceae* y en la sub-familia *Nolinaceae* (USDA, ARS, National Genetic Resources Program, GRIN, 2016), sin embargo, a través del tiempo ha sido clasificado dentro de algunas otras como la familia *Liliaceae* y *Agavaceae* esto debido a la existencia de gran variabilidad entre plantas de la misma especie, lo cual complica su ubicación a través de la taxonomía tradicional. La ambigüedad de criterios en la caracterización de las plantas puede minimizarse a través del uso de código de barra de DNA propuesto por Hebert *et al.*, (2003a). Esta herramienta se basa en la secuenciación de un fragmento corto de DNA de cloroplasto, el cual funge como región estándar en la identificación de especies de plantas terrestres y cuenta con tres características indispensables para dicha función; es universal, es de alta calidad y posee un gran poder de discriminación. Estas propiedades involucran la secuenciación de más de una región de DNA, por lo cual el grupo de trabajo sobre flora del CBOL (Consortium for the Barcode of the Life) recomienda el uso de dos regiones codificantes de cloroplasto: *matK* y *rbcL* (Plant Working Group, 2009), la primera codifica para la enzima maturasa k, que ayuda a la conformación y maduración del RNA de transferencia y la segunda para el gen de la subunidad grande de la ribulosa bisfosfato carboxilasa que participa en el proceso de fotosíntesis y fijación de carbono de la atmósfera para generar glucosa.

El código de barras de DNA no solamente se restringe a la identificación de especies, también es útil para realizar análisis filogenéticos. Good *et al.*, (2006) estimaron tiempos de divergencia para la especie *Agave sensu lato* a partir de árboles construidos en base a secuencias de *rbcL*, para ello utilizaron el método de árboles linearizados y el método non-parametric rate smoothing (Sanderson, 2002) y lograron determinar edades de divergencia para la familia *Agavaceae* de 20.5 y 25.8 millones de años respectivamente, mientras que para la especie *Agave sensu lato* fue < 10 millones de años. Estas y otras aplicaciones utilizando código de barras de la vida son posibles gracias a el surgimiento de herramientas bioinformáticas como BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), FinchTV (herramienta de visualización de electroferogramas), *seqinr* y *ape* del programa R, entre otras de libre acceso, utilizadas para análisis de secuencias de DNA, las cuales proporcionan los elementos necesarios para la construcción de dendrogramas basado en máxima parsimonia, máxima verosimilitud, neighbor-joining y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Dichos dendrogramas contribuyen en la generación de nuevos conocimientos acerca de la taxonomía a nivel especie, y auxilian en casos donde la morfología de las plantas es un reto para la identificación (Hollingsworth *et al.*, 2011, Kress, 2005).

Un ejemplo palpable es el reciente descubrimiento de una nueva especie de sotol en la Sierra Madre Oriental en Coahuila. Villarreal *et al.*, (2016) reportaron la nueva especie *D. mcropteryum*, la cual poseía características similares a *D. miquihuanense* y para confirmar su descubrimiento como diferente y nueva especie se recurrió a la obtención de su código de barras de DNA. La secuenciación de los genes *matK* y *rbcL*, la obtención de distancias genéticas a partir de dichas secuencias y la construcción de árboles filogenético basados en máxima parsimonia, máxima verosimilitud, UPGMA y neighbor-joining fueron herramientas útiles para la ubicación filogenética de ambas especies.

Recientemente se han realizado algunas secuenciaciones para obtener código de barras en *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*. Jauregui (2015) obtuvo secuencias *matK* de ambas especies y a través del programa FinchTV evaluó la calidad de secuenciación, donde bases con valores > 30 (Q30) presentan probabilidades de error de uno en 1000, y por medio de *ape* y *seqinr* del programa R (R Core Team. 2014) obtuvo alineaciones, generó una matriz de distancias genéticas y obtuvo secuencias consenso, éstas últimas se refieren a las bases nucleotídicas encontradas más comúnmente en cada posición de un grupo de secuencias relacionadas. A partir de la matriz construyó un árbol filogenético basado en el algoritmo Neighbor Joining y posteriormente con el programa spider de R obtuvo la

representación gráfica del código de barras de las dos especies, donde claramente puede observarse una diferencia de 7 nucleótidos entre *D. cedrosanum* y *D. berlandieri*.

Hasta 2015 solo se encontraban publicados cuatro registros para el gen *matK* como código de barras en el sistema BOLD (Barcode of Life Database), dos para la especie *D. serratifolium* y dos para *D. wheeleri*, quedando fuera más de 10 especies del género *Dasyllirion*. Es necesario contribuir y agilizar el proceso de identificación del resto de las especies, lo cual podría derivar como ya lo hemos visto no solo en la identificación sino además en el descubrimiento de nuevas especies (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Como ya se ha mencionado anteriormente la importancia del género *Dasyllirion* radica principalmente en su potencial como materia prima para elaborar la bebida alcohólica "sotol", sin embargo existen estructuras propias de la planta que han sido poco estudiadas con fines de aprovechamiento alimenticio; las semillas de sotol, las cuales son muy pequeñas, trígonoas y muy numerosas, presentan porcentajes de germinación por arriba del 90 % a los 20 días bajo condiciones de laboratorio y podrían ser consideradas una probable fuente de alimento (Reyes. *et al.*, 2012). Existen pocos o nulos trabajos sobre la calidad alimenticia de las semillas por lo cual se propone la realización de análisis de tipo bromatológico que indiquen su contenido principal de proteína, fibra y grasas para poder ser consideradas como factible fuente de alimentación humana.

#### 4.- Procedimiento Experimental

Para llevar a cabo el proceso de caracterización en plantas del género *Dasyllirion* (*D. cedrosanum*, *D. berlandieri*, *D. micropterum*, *D. miquihuanense*, *D. quadrangulatum*, *D. serratifolium*, *D. wheeleri*, *D. texanum*, *D. leiophyllum*, *D. acrotiche* y *D. palaciosii*) se localizarán e identificarán los diferentes especímenes en distintas regiones del noreste de país.

**1. Extracción de DNA:** Se colectarán hojas sanas de las especies de *Dasyllirion* y de acuerdo con los requisitos de la base de datos BOLD (Consortio del Código de Barras de la Vida) para código de barras de la vida, se trabajará con muestras de cinco plantas diferentes por cada especie. El proceso de extracción de DNA, se realizará de acuerdo al protocolo descrito por el Biol. Fernando Hernández Godínez (LANGEBIO), comunicación personal, en el laboratorio de genomas del Dpto. de Fitomejoramiento.

**2. Amplificación de DNA:** El proceso de amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se llevará a cabo en un termociclador de gradiente Palm-Cycler™ de Corbett Life Science, utilizando *primers* forward y reverso específicos para cada fragmento (*matK* y *rbcL*).

**3. Secuenciación de ADN:** Se secuenciarán los fragmentos correspondientes a los genes *rbcL* y *matK* con la ayuda del equipo Applied Biosystems® 3730/3730xl DNA Analyzer del Dpto. de genómica del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), Irapuato.

**4. Limpieza de secuencias:** Se realizará análisis de las secuencias obtenidas por medio del programa Finch Tv, un visualizador de electroferogramas, que evalúa la calidad de la secuenciación, a través de la asignación de un valor numérico, donde bases con resultados > 30 (Q30) presentan probabilidades de error de uno en 1000, excluyendo aquellos fragmentos con valores por debajo del mencionado. Se realizarán alineaciones de las secuencias de calidad con herramientas bioinformáticas como BLAST y se determinará el porcentaje de identidad, cobertura y número de deleciones.

**5. Análisis Filogenético:** Con la ayuda del paquete *seqinr* del programa R se obtendrán secuencias consenso de las diferentes especies y a partir de las sustituciones nucleotídicas encontradas en dichas secuencias se obtendrá una matriz de distancias genéticas que posteriormente será utilizada para construcción de dendrogramas utilizando el paquete *ape* del programa R (R- versión 3.2.3- 2015), basados en los algoritmos neighbor-joining, máxima parsimonia, máxima verosimilitud y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

**6. Tiempos de divergencia:** A partir de las secuencias *rbcl* de cada especie se estimaran los tiempos de divergencia aplicando el método NPRS (Non-parametric Rate Smoothing) de Sanderson (2002) basado en la calibración de relojes moleculares.

**7. Obtención de Germinados:** Se realizará de acuerdo a las reglas establecidas por la ISTA (2016) y a las recomendaciones de Moreno (1996). Se seleccionarán semillas de *D. cedrosanum*, se someterán a imbibición bajo condiciones de luz y temperatura (28°C) controladas, se evaluará el porcentaje y la velocidad de germinación a los 5, 15 y 20 días, modificando condiciones para asegurar la obtención de biomasa.

**8. Análisis Bromatológico:** Se determinará el potencial alimenticio de la harina de semillas (obtenida a partir de la molienda de las semillas) y germinado de *D. cedrosanum* a través de porcentaje de humedad (método de Karl-Fischer, para muestras con bajo contenido de humedad), porcentaje de ceniza (por diferencia de peso en crisol a 550°C en mufla), contenido de grasa (método de hidrólisis ácida), fibra (digestión ácida y alcalina) y proteína (método de Kjeldahl).

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recolección de muestras	x	x	x	x								
Aislamiento de DNA	x	x	x	x	x	x						
PCR y secuenciación	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
Análisis y publicaciones				x	x	x	x	x	x	x	x	x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Recolección de muestras	2000	2000	2000	2000								
Aislamiento de DNA	500	500	500	500	2000	2000						
PCR y secuenciación	2500	2500	2500	2500	500	500	3000	3000	3000	3000		
Análisis y publicaciones					2500	2500	2000	2000	2000	2000		

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2016	Año estimado de conclusión	2018
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Conocer las secuencias de código de barras de especies de *Dasyliiron*
- Conocer el potencial alimeticio de la harina de semilla de *D. cedrosanum*
- Conocer el potencial alimeticio de los germinados de *D. cedrosanum*
- Artículo científico aceptado
- Artículo científico enviado
- Presentación en congreso
- Tesis doctoral

6.-Literatura Citada

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

BOLD Systems. (2015) Taxbrowser\_Taxonpage @ www.boldsystems.org. (n.d.). Retrieved from [http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser\\_Taxonpage?taxon=Dasyliiron+&searchTax=](http://www.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxon=Dasyliiron+&searchTax=)

CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences

Good, A.S.V., Souza, V., Gaut, B.S. and Eguiarte, L.E. 2006. Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). Proc Natl Acad Sci USA, 13:9124-9129.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., de Waard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Biol Sci Ser B. 270:313–321.

Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. PLoS ONE 6(5): e19254.

International Seed Testing Association (2016). Rules for Seed Testing. Vol. 2016, Chapter 1. 20 p.

Kress, J. W., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L.A, Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc Natl Acad Sci USA 102:8369–8374.

IMPI. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (2002). Declaración general de protección de la denominación de origen "sotol". México. Review <http://www.int/wipolwx/en/text.jsp?file id=220963>

Jáuregui, G. M. J. (2015). Código de barras de la vida y análisis filogenético en *Dasyilirion cedrosanum* y *D. berlandieri* con base en secuencias de ADN citoplasmático. Tesis Ingeniero Agrónomo en Producción, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coah.

Moreno M. E. (1996). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 3ra Edición. 393 pags.

Reyes, V.M.H., Benavides, M.A., Ramírez, R.H., Villarreal, Q.J.A. (2012). Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion spp*). Parte I: Sistemática, Genética y Reproducción. Planta Año 7 No.14.11-13.

Sanderson M. J. (2002). Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. Mol. Biol. Evol. 19:101–109.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.

Villarreal, Q.J.A., Estrada, C.E., Reyes, V.M.H., Encina, D.J.A., Martínez, O and Hernández, G.F. (2016). *Dasyilirion micropterum* (Asparagaceae), a new species from Sierra Madre Oriental, México. Phytotaxa. 253(2):139-146.