

Nuevos iniciadores *matK* para código de barras de la vida en especies del género *Dasyliirion*

Martha Monzerrath Orozco-Sifuentes¹

Dulce Victoria Mendoza-Rodríguez¹

Fernando Hernández-Godinez²

Octavio Martínez²

José Ángel Villarreal-Quintanilla¹

M. Humberto Reyes-Valdés^{1§}

¹Programa de Doctorado en Recursos Fitogenéticos para Zonas Áridas-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 844 4110296, ext. 2607. (monze82@yahoo.com.mx; mendozadul@hotmail.com; javillarreal00@hotmail.com).

²Unidad de Genómica Avanzada-CINVESTAV. Carretera Irapuato-León km 9.6, Libramiento norte, Irapuato, Guanajuato, México. CP. 36821. (octavio.martinez@cinvestav.mx; fehernan@cinvestav.mx).

§Autor para correspondencia: mathgenome@gmail.com

Resumen

Las especies de *Dasyliirion* se encuentran dentro de las más importantes del desierto chihuahuense en términos ecológicos y económicos. Su uso principal es la elaboración de una bebida alcohólica tradicional llamada sotol. El género comprende 22 especies, no todas aptas para este fin y su identificación es difícil. Herramientas moleculares como el código de barras de la vida facilitan su identificación y generan información genética. Hay iniciadores universales para el gen *matK*, cuya secuencia es apropiada para código de barras de la vida, que no funcionan para algunas especies de este género. La diferencia de un solo nucleótido puede generar problemas en la amplificación. El objetivo de este trabajo fue diseñar y probar nuevas secuencias iniciadoras del gen *matK*, que permitan amplificación en las plantas del género *Dasyliirion*. Para el diseño se utilizaron los programas Primer3 Plus, FastPCR y la secuencia completa del gen *matK* de *D. wheeleri*. Los nuevos oligonucleótidos fueron probados con las especies *D. texanum*, *D. leiophyllum*, *D. occidentalis* y *D. palaciosii*, con amplificación limpia del gen *matK* (fragmento aproximado 1 000 pb) en cada una de ellas. Estos resultados contrastaron con los obtenidos a partir de los iniciadores universales *matK* 390F y *matK* 1 326R, que generaron bandas secundarias o fallaron en la amplificación. Ya que los nuevos iniciadores amplificaron exitosamente el gen *matK* en las especies estudiadas de *Dasyliirion*, se consideran de valor para como herramientas para la obtención de código de barras de la vida en sotol. Investigación realizada durante los años 2016 a 2018.

Palabras clave: *Dasyliirion*, identificación, oligonucleótidos, sotol, zonas áridas.

Recibido: mayo de 2019

Aceptado: agosto de 2019

Introducción

En México, 40% del territorio nacional está conformado por zonas áridas y semiáridas. Incluyen una parte considerable del más grande desierto de norteamérica, el desierto chihuahuense, una de las regiones con mayor riqueza de especies en el mundo (Granados-Sánchez, 2011). En él se albergan alrededor de 6 000 especies vegetales de tamaños variables y formas complejas, con un alto porcentaje (50%) de endemismo (Rzedowsky, 1965; Sarukhán *et al.*, 2009).

Desde tiempos antiguos las especies del desierto han sido aprovechadas para el consumo humano, como material de construcción, como barreras naturales, como fibra, como forraje para ganado y recientemente en la obtención de sustancias de interés económico como las gomas, resinas, látex, almidón y metabolitos secundarios dirigidos a aplicaciones médicas (González-Medrano, 2012).

Uno de los géneros con mayor importancia económica, ecológica y cultural en las zonas áridas es *Dasyilirion* (Familia Asparagaceae). Estas plantas son comúnmente llamadas sotoles y de ellas se obtiene una bebida alcohólica tradicional llamada 'sotol', la cual cuenta con protección a la denominación de origen para Chihuahua, Coahuila y Durango (IMPI, 2002). Sin embargo, no todas las especies de este género son aptas para dicho propósito.

Las plantas de sotol forman parte del matorral desértico rosetófilo (MDR) que representa aproximadamente 12% del área total del desierto chihuahuense (Rzedowski, 1965; Granados-Sánchez, 2011). Se caracterizan por poseer tallos cortos y robustos, hojas largas arrosetadas con espinas en los bordes. Presentan un escapo floral de hasta 5 m de altura y su fruto es una cápsula indehisciente con una semilla.

Como componente ecológico del desierto contribuye al mantenimiento del suelo, mientras que sus hojas y semillas son alimento de aves y roedores (Reyes-Valdés *et al.*, 2012). Sus hojas se utilizan en la elaboración de adornos para fiestas patronales y en tiempos de sequía como forraje para el ganado, mientras que su escapo sirve como material de construcción y en la fabricación de bastones (Encina-Domínguez *et al.*, 2013). Existe evidencia de su uso como alimento por grupos indígenas (Short *et al.*, 2015), quienes cocinaban el tallo en pozos con piedras calientes y del centro ya cocido obtenían una harina para preparar panecillos o tortas.

En la actualidad se reconocen 22 especies del género *Dasyilirion* distribuidas en zonas montañosas áridas y semiáridas de Norteamérica, desde el sur de Estados Unidos de América hasta Oaxaca en México (Bogler, 1998; The Plant List, 2013; Tropicos, 2018). El género ha sido clasificado dentro de diferentes familias botánicas, entre ellas Liliaceae, Agavaceae, Nolinaceae, Rusceae y actualmente en la familia Asparagaceae (Villaseñor, 2016; Tropicos, 2018).

Las plantas de este género presentan rasgos distintivos; uno de ellos es la forma de las hojas, con 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 (Bogler, 1994). El reconocimiento taxonómico implica un adecuado conocimiento de los rasgos particulares entre una especie y otra. La iniciativa de secuenciar un fragmento corto de DNA que sirva como identificador universal, mejor conocida como código de barras de la vida, es una alternativa en la resolución de la variación existente entre las especies de *Dasyilirion*.

La búsqueda se ha centrado en genes de cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *rpoC1* *trnH-psbA*, entre otros) pero muy pocos son efectivos de manera individual, ya que no presentan suficiente variación (Jing *et al.*, 2011). Se propuso usar como código de barras de la vida para angiospermas la combinación de las secuencias de *matK* y *rbcL* (CBOL, 2009). Las secuencias anteriores han sido utilizadas en la caracterización de algunas especies del género *Dasyllirion*, incluyendo *D. serratifolium*, *D. wheeleri*, *D. miquihuanense* y recientemente *D. micropterum*, ésta última recientemente descrita en los límites de los estados de Coahuila y Nuevo León.

Las secuencias de *matK* y *rbcL* para dichas especies se encuentran registradas en el GenBank del NCBI (Hebert *et al.*, 2003; Reyes-Valdés *et al.*, 2016; Villarreal-Quintanilla *et al.*, 2016). El gen de la maturasa K (*matK*) propuesto por el Consortium for the Barcode of Life como gen de identificación en conjunto con el gen *rbcL*, subunidad grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa, han dado resultados favorables para un gran número de plantas (CBOL, 2009); sin embargo, la universalidad de dichos marcadores se ha visto obstaculizada por factores como la variación morfológica, geográfica, la evolución reticular y la falta de variación de esas secuencias en muchas especies de plantas, por lo cual algunos investigadores consideran que los marcadores de código de barras de la vida pueden no funcionar para todos los géneros de plantas terrestres (Roy *et al.*, 2010), lo que conlleva por ejemplo a proponer nuevas regiones altamente variables dentro del gen *matK* (600 a 800 pb) con sitios de alineación altamente conservados, evitando la repetición de mononucleótidos (Jing *et al.*, 2011).

Algunos investigadores se han dado a la tarea de diseñar iniciadores específicos, dentro de regiones conservadas del gen *matK*, que sean de utilidad en la identificación de diferentes grupos taxonómicos. Ciertos iniciadores han sido diseñados de manera específica para *Equisetum* (Hausner *et al.*, 2006), para el orden de las Cariófilas (Cuénoud *et al.*, 2002), entre otros. Jing *et al.* (2011) proponen los iniciadores *matK* 472F y *matK* 1 248R como alternativas en la resolución parcial de los inconvenientes presentados al utilizar el gen *matK* como código de barras de la vida. Los iniciadores fueron probados con éxito en 58 especies de 47 familias de plantas angiospermas.

Algunos de estos iniciadores que han sido diseñados para ciertos grupos taxonómicos, han sido de utilidad en la identificación de otros. Sin embargo, no se descarta que se presentan inconvenientes.

El objetivo de esta investigación fue diseñar iniciadores *matK* efectivos en la identificación de especies del género *Dasyllirion*, cuya amplificación con los iniciadores universales *matK* 390F (5'-CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C-3') y *matK* 1 326R (5'-TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T-3') (Cuénoud *et al.*, 2002) generaron bandas de tipo secundario y secuencias de mala calidad.

Materiales y métodos

Amplificación con iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R

Los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R 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 realizaron modificaciones a la técnica de PCR.

En primer lugar, se aseguraron las condiciones de asepsia y se renovaron los reactivos para PCR. Posteriormente se realizó un gradiente de 12 temperaturas tomando como referencia las temperaturas de alineación (T_m) propuestas por el proveedor (53.4 °C *matK* 390F y 60.8 °C *matK* 1326R). Con estas condiciones se obtuvo respuesta de amplificación a 52.2 °C. Posteriormente se verificó la calidad del DNA, con base en la relación absorbancia 260/280 con valores entre 1.6 a 1.8, se modificaron las concentraciones de los iniciadores (derecho e izquierdo), se aumentaron las concentraciones de dNTPs, y se probó la inclusión de Buffer con Mg y sin Mg.

Estas modificaciones dieron resultados negativos o con algunas bandas intermitentes amplificadas para las especies de *D. texanum*, *D. palaciosii* y *D. leiophyllum*. Solo dieron resultados positivos en *D. occidentalis* y *D. micropterum*, esta última utilizada como control (+). Sin embargo, al momento de la secuenciación, los productos de amplificación no resultaron apropiados para el procesamiento.

Análisis de complementariedad con iniciadores *matK* 390F y *matK* 1326R

Se realizó un análisis de complementariedad por medio de BLASTn (NCBI) para los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1326R. Los oligonucleótidos se alinearon con las secuencias completas del gen *matK* de *D. wheeleri* (HM640588.1) y *D. serratifolium* (HM640587.1) únicos registros de genes completos para el género *Dasyliirion* en el GenBank (Kim y Kim, 2010). En particular se sometió a prueba la existencia de coincidencia entre las bases nucleotídicas de los iniciadores y las secuencias mencionadas.

Diseño de iniciadores *matK*

Se diseñaron iniciadores *matK* para el género *Dasyliirion*, con ayuda de los programas Primer3Plus (Rozen y Skaletsky, 2000), FastPCR Professional 6.6 (Kalendar *et al.*, 2017) y con base en la secuencia completa del gen *matK* de la especie *D. wheeleri* (HM640588.1) registrada en el GenBank (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* evaluados en el programa FastPCR.

Cuando una secuencia de nucleótidos se escribe como un texto, es posible medir la repetitividad de las letras. Con esto se obtiene una medida conocida como complejidad lingüística, bajo este criterio, las secuencias de DNA menos repetitivas tendrán una mayor complejidad y viceversa. Adicionalmente se buscó que la zona amplificada coincidiera con la mayor parte de la región intercalada entre los dos iniciadores universales (Jing *et al.*, 2011).

Colecta de material vegetal

Se recolectaron hojas sanas y jóvenes de por lo menos seis ejemplares por especie. Entre ellas *D. texanum*, en Allende, Coahuila (28° 10' 12.6" latitud norte, 101° 00' 49.6" longitud oeste, 520 msnm), *D. leiophyllum* en Sierra Mojada, Coahuila (27° 16' 19.3" latitud norte, 103° 38' 2.9" longitud oeste, 1 344 msnm), *D. occidentalis* en San Juan de Hornillos, Zacatecas (23° 03' 64.5" latitud norte, 103° 06' 28.6" longitud oeste, 2 280 msnm) y *D. palaciosii* en Guadalupe, San Luis Potosí (22° 37' 57.8" latitud norte, 100° 25' 57.0" longitud oeste, 1 885 msnm) (Figura 1).

Cada ejemplar fue etiquetado, georreferenciado y las muestras de hojas fueron colocadas en bolsas de papel para su transporte. Previo a la extracción de DNA, el material fue lavado con una solución de hipoclorito al 1% y posteriormente con etanol al 70% por un minuto. Al final se quitó el exceso con agua estéril y se dejó secar sobre toallas de papel.

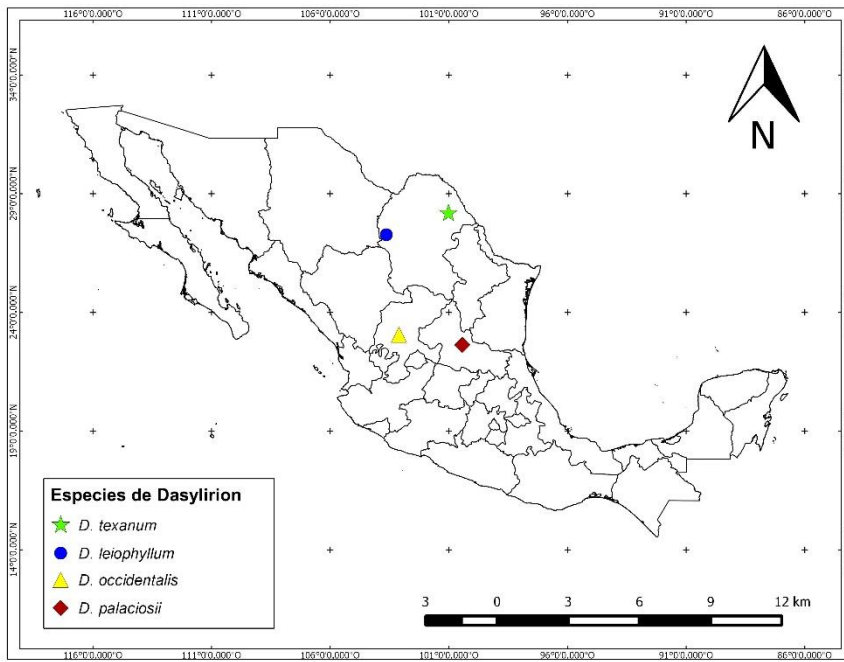


Figura 1. Sitios de colecta de material vegetal de especies de Dasyliirion. Las localidades comprenden los estados de Coahuila, Zacatecas y San Luis Potosí.

Extracción de DNA

Para obtener el DNA 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 y N-Lauril-sarcosina al 1%), se mezcló completamente y se dejó reposar por 10 min. Se agregaron 800 µL de fenol (Sigma, Phenol Solution, equilibrado con Tris HCL 10 mM, pH 8, 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 RNAsa en concentración de 10 mg mL⁻¹ y se mezcló por inversión. Se agregaron 800 µL de isopropanol frío (-20 °C), se mezcló hasta formar la madeja de DNA, 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 min y se resuspendió en agua destilada estéril, donde se mantuvo en refrigeración a -20 °C. Para su visualización se corrió un gel de agarosa al 1%, con adición del colorante GelRed Nucleid Acid Biotum, en proporción de 1 µL por cada 10 mL de gel. Las muestras de DNA obtenidas se cuantificaron por medio de NanoDrop ND-1 000 (Software ND-1000) y a partir de las lecturas se prepararon diluciones de DNA a 50 ng µL⁻¹ en agua estéril.

Amplificación con nuevos iniciadores

Para probar la eficiencia de los nuevos iniciadores se realizó el proceso de amplificación para cada especie de *Dasyliirion*. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó al cabo en un volumen de 50 μL . Cada reacción contenía 5 μL de Buffer Taq Standard 10X, 1 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL de iniciador Forward 10 μM , 1 μL de iniciador Reverse 10 μM , 0.25 μL de *Taq* polimerasa, 37.75 μL de agua libre de nucleasas y 4 μL de DNA templado (dilución 50 ng μL^{-1} de DNA en agua estéril) lo anterior, de acuerdo al protocolo de kit BioLabs (*Taq* DNA Polymerase with Standard *Taq* Buffer, este último con Mg incluido).

Para obtener una temperatura de alineación (T_m) óptima para los nuevos iniciadores, se corrió una PCR en gradiente de 12 temperaturas diferentes, con la inclusión de las recomendadas por el proveedor (56.7 °C *matK* 335F y 57.7 °C *matK* 1327R). La mejor respuesta se obtuvo con la temperatura de 57.8 °C. A partir, de este resultado se realizó una PCR de punto final de 40 ciclos, con tres temperaturas diferentes: fase de desnaturalización inicial 94 °C por 4 min, fase de desnaturalización 94 °C por 30 s, fase de hibridación 57.8 °C por 35 s, fase de extensión 72 °C por 35 s y fase de extensión final 72 °C por 10 min.

Este procedimiento se llevó a cabo en un termociclador Axigen Maxigene. Para visualizar los productos de PCR, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (para cada especie), con el uso del buffer TBE 0.5 X, adicionado con el colorante GelRed Nucleid Acid Biotum en proporción de 1 μL por cada 10 mL de gel. Para cargar las muestras, se mezclaron 5 μL de producto de PCR con 3 μL de buffer de carga (TrackIt™ Cyan/Orange Loading Buffer). Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb Plus DNA Ladder - Life Technologies. La electroforesis se corrió en una cámara horizontal a 115 Volts durante 30 min. El gel se observó en fotodocumentador Enduro TM GDS de la marca Labnet International, Inc.

Secuenciación

Como una prueba más de la calidad de los amplicones obtenidos y para analizar si funcionan para el enfoque de código de barras, se secuenciaron los productos de PCR de *D. texanum*, en el Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) de la Unidad de Genómica Avanzada-CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato. Se utilizó un secuenciador 3 730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) y la secuenciación se hizo en los dos sentidos.

Calidad de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas a partir de la amplificación con los nuevos iniciadores (*matK* 335F y *matK* 1 327R) fueron evaluadas, a través de sus electroferogramas con el programa Finch TV versión 1.4.0. El programa proporciona un valor de calidad denominado 'valor de calidad Q'. Este valor calculado como el logaritmo base 10 de la probabilidad de error multiplicado por -10, es la factibilidad de identificar una base nitrogenada en una posición específica dentro de una secuencia.

De esta manera valores de $Q=10$ (Q10), representan la probabilidad de error de uno en diez (1/10), $Q=20$ (Q20), probabilidad de error de uno en cien (1/100), $Q=30$ (Q30), probabilidad de error de uno en mil (1/1 000) y $Q=40$ (Q40) la probabilidad de error de uno en 10 000 (1/10 000). Secuencias con valores promedio de $Q=30$ o mayores, se consideran de buena calidad (NABR, 2012).

Resultados y discusión

Evaluación de los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R

La obtención de un proceso de amplificación o PCR exitoso, depende de un considerable número de variables, entre ellas están las condiciones del aparato donde se lleva a cabo la reacción y la funcionalidad de los reactivos implicados en la reacción misma. Si el proceso falla, se pueden realizar ciertas modificaciones a la técnica, que ayuden a hacer más eficiente el proceso (Espinosa-Asuar, 2007). Entre las variables que se revisaron para probar la amplificación de los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R se encuentra la calidad del DNA utilizado, con valores de relación de absorbancia 260/280= 1.6 a 1.8, indicativo de buena calidad (baja cantidad de proteínas).

Se renovaron los reactivos para PCR (dNTPs, *Taq* polimerasa, agua ultra pura, buffer con y sin Mg), descartando posibles fuentes de contaminación y se probaron variantes en las concentraciones de cada reactivo. Los tubos, puntillas y contenedores, fueron esterilizados en autoclave, la campana de flujo laminar fue desinfectada y los productos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa.

En la Figura 2 se presentan cuatro patrones electroforéticos. Cada uno muestra los productos de PCR a partir de los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R (Cuénoud *et al.*, 2002) para cada especie de *Dasyliiron*. Las Figuras 2a y 2b, corresponden a las especies *D. palaciosii* y *D. texanum*, respectivamente. En ambas imágenes se muestran la ausencia de bandas amplificadas, excepto en el caso de los controles positivos (C+) que corresponden a *D. micropterum*, cuya secuencia registrada en el GenBank (Reyes-Valdés *et al.*, 2016, KU535883.1) fue obtenida, a partir de los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R, donde la presencia de amplicón es evidente.

Las Figuras 2c y 2d 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.

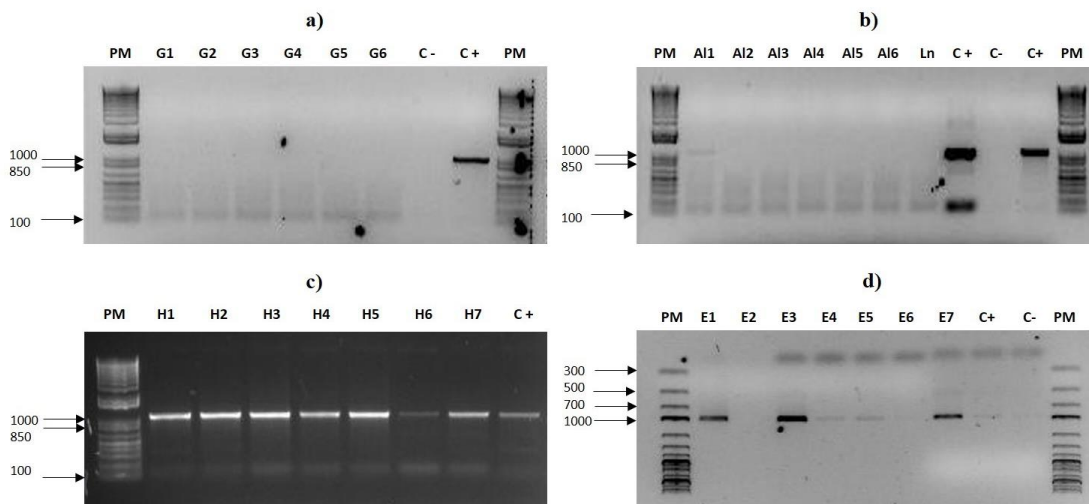


Figura 2. Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen *matK* a partir del par de iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R (Cuénoud *et al.*, 2002) en especies del género *Dasyliiron*. a) *D. palaciosii*; b) *D. texanum*; c) *D. occidentalis*; y d) *D. leiophyllum*.

Las bandas obtenidas en los diferentes geles (Figura 2), correspondientes a *D. micropterum* como control positivo (C+), son evidencia de que los iniciadores *matK* 390F y *matK* 1 326R no se encuentran degradados y son efectivos para dicha especie. Mientras que la presencia de bandas intermitentes, aunado a la obtención de secuencias de mala calidad con valores promedio de Q < 30, son prueba de que los iniciadores no son efectivos en las especies restantes.

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 DNA y el otro iniciador tenga la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar, si esto no es así, no podrá amplificarse efectivamente el sitio seleccionado (Espinosa-Asuar, 2007).

El gen *matK* es una de las secuencias codificantes de evolución más rápida del genoma plástido. Sin embargo, presenta bajas tasas de amplificación y secuenciación debido a la baja universalidad de los iniciadores (Hilu y Liang, 1997; Hollingsworth *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2011). Esta característica puede ser la causa principal de la ausencia de bandas, el bandeo débil y la presencia de bandas secundarias (Figura 2b y Figura 2d) en la amplificación con los iniciadores universales de las diferentes especies de *Dasyliiron*.

Análisis de complementariedad

La Figura 3 presenta los resultados del análisis de complementariedad entre el oligonucleótido *matK* 390F y las secuencias de *D. wheeleri* y *D. serratifolium* por medio de alineación con BLASTn. Se encontró que existe diferencia de dos bases nitrogenadas por comparación. El iniciador *matK* 390F al momento de alinearse con las secuencias completas de *Dasyliiron* difieren con la posición 405 que corresponde a una Adenina (A) y con la posición 417 que corresponde a una Timina (T). El iniciador reverso (*matK* 1 326R) presentó complementariedad completa. A la falta de alineación entre bases nitrogenadas del iniciador *matK* 390F, se atribuye la falla en el proceso de amplificación del gen *matK* en las especies de *Dasyliiron*.

a) *Dasyliiron 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	CGATCTATTCAATCAATTTTC 22				
Sbjct 400	CGATCAATTCATTCATTTTTC 421				

b) *Dasyliiron 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	CGATCTATTCAATCAATTTTC 22				
Sbjct 400	CGATCAATTCATTCATTTTTC 421				

Figura 3. a) Alineación del iniciador *matK* 390F con respecto a la secuencia del gen completo *matK* de la especie *D. wheeleri* registrada en GenBank-NCBI; y b) Alineación del iniciador *matK* 390F con respecto a la secuencia del gen completo *matK* de la especie *D. serratifolium* registrada en el GenBank.

Nuevos iniciadores *matK*

En el Cuadro 1, se muestran los dos pares de iniciadores diseñados para la amplificación del gen *matK* en especies de *Dasyliirion*. Se eligieron los pares con valores altos de complejidad lingüística y eficiencia en PCR *in silico* (Kalendar *et al.*, 2017). Ambos pares fueron sintetizados por Eurofins Genomics en concentraciones de 100 µM.

Cuadro 1. Iniciadores *matK* generados y probados en FastPCR.

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

Amplificación con nuevos iniciadores *matK*

Los pares de iniciadores propuestos (Cuadro 1) se probaron en la amplificación de los fragmentos *matK* para las especies de *Dasyliirion*. El par con menos complejidad lingüística, *matK* 413F y *matK* 1 409R, no produjo bandas de amplificación para las especies de *Dasyliirion*. El par *matK* 335F y *matK* 1 327R dio resultados satisfactorios en la amplificación del gen *matK* en las cuatro especies, con bandas bien definidas en la posición aproximada de 1 000 pb (Marcador de PM de 1 Kb) y sin presencia de bandas secundarias (Figura 4).

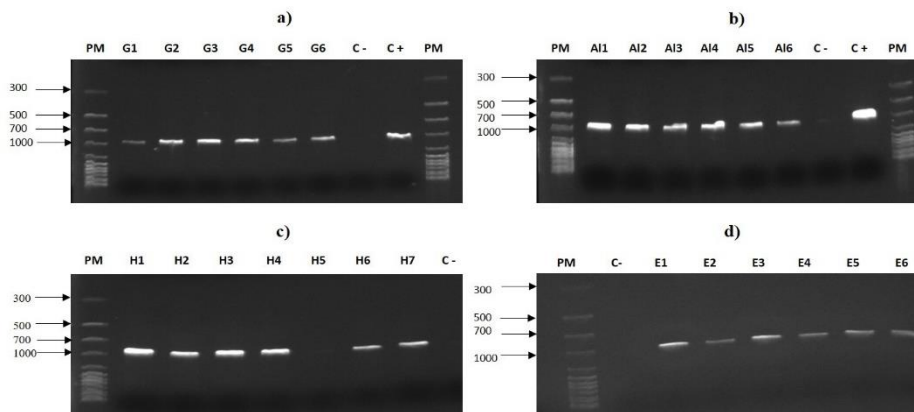


Figura 4. Resultados de PCR de una secuencia parcial del gen *matK* a partir del par de iniciadores diseñados *matK* 335F y *matK* 1 327R en especies del género *Dasyliirion*. a) *D. palaciosii*; b) *D. texanum*; c) *D. occidentalis*; y d) *D. leiophyllum*.

Secuenciación

Las secuencias obtenidas de los amplicones de *D. texanum* mostraron ser de buena calidad. Los valores promedio de calidad (Q) fluctuaron entre 36 y 64, por lo cual se consideraron aptos para código de barras de la vida (Jing *et al.*, 2011; NABR, 2012). Las secuencias fueron uniformes entre

sí. La alineación de la secuencia AI-01 de *D. texanum* con secuencias *matK* del grupo Dasyliirion (taxid: 39504, GenBank-NCBI), mostró que se puede discriminar de las cuatro especies registradas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Substituciones nucleotídicas entre la secuencia AI-01 (*D. texanum*) con respecto a las secuencias *matK* de especies de Dasyliirion registradas en GenBank.

Especie	Registro GenBank	Núm. de substituciones
<i>D. miquihuanense</i>	KU535884.1	1
<i>D. serratifolium</i>	HM640587.1	1
<i>D. serratifolium</i>	AB029800.1	1
<i>D. wheeleri</i>	HM640588.1	2
<i>D. micropterum</i>	KU535883.1	3

La secuencia de *D. texanum* (AI-01) presentó 99% de identidad con respecto a las secuencias del grupo Dasyliirion, con diferencias de 1 a 3 substituciones nucleotídicas entre especies por comparación: una substitución con respecto a *D. miquihuanense* (Reyes-Valdés *et al.*, 2016) y *D. serratifolium* (Tamura, 1999; Kim y Kim, 2010), dos substituciones con respecto a *D. wheeleri* (Kim y Kim, 2010) y tres substituciones con *D. micropterum* (Reyes-Valdés *et al.*, 2016). El alto porcentaje de identidad entre la secuencia problema y las de referencia del GenBank, así como el número de substituciones nucleotídicas encontradas por alineación, ilustran el valor de los iniciadores *matK* 335F y *matK* 1 327R, para código de barras de la vida con *matK* en Dasyliirion.

Conclusiones

La diferencia de dos bases nitrogenadas en uno de los iniciadores universales (*matK* 390F) con respecto a la secuencia del gen completo *matK* de *D. wheeleri* (GenBank), es la causa atribuible en la falla del proceso de amplificación del gen *matK* en las especies de Dasyliirion en estudio. Los iniciadores *matK* 335F y *matK* 1 327R diseñados en esta investigación, permitieron la amplificación de fragmentos cercanos a 1 000 pb en todas las especies estudiadas de Dasyliirion (*D. occidentalis*, *D. palaciosii*, *D. texanum*, *D. leiophyllum*).

Las secuencias obtenidas, de cada especie de Dasyliirion, presentaron valores promedios de Q de entre 36 y 64, con lo cual se consideran fragmentos de calidad suficiente para obtener código de barras de la vida. Las secuencias de *D. texanum* fueron uniformes entre sí y con variación en la substitución nucleotídica con respecto a las secuencias *matK* (género Dasyliirion) registradas en el GenBank. Los resultados indican que los nuevos oligonucleótidos (*matK* 335F y *matK* 1 327R) son de valor para la obtención de código de barras de la vida en especies del género Dasyliirion. En particular, las cuatro especies con referencia en el GenBank y *D. texanum*, estudiada en el presente trabajo, pueden ser diferenciadas entre sí con la secuencia parcial del gen *matK*.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el apoyo financiero para el desarrollo de este proyecto. A la Unidad de Genómica Avanzada-CINVESTAV, Irapuato, Guanajuato, por las facilidades en la realización de este proyecto. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo a través de una beca de doctorado.

Literatura citada

- Bogler, D. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Dasyliirion* (Nolinaceae). Ph. D. Dissertation, Faculty of The University of Texas, Austin, Texas. 583 p.
- Bogler, D. J. 1998. Three new species of *Dasyliirion* (Nolinaceae) from Mexico and a clarification of the *D. longissimum* complex. *Brittonia*. 50(1):71-86.
- CBOL. 2009. Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 106(31):12794-12797.
- Cuénoud, P.; Savolainen V.; Chatrou, L. W.; Powell, M.; Grayer, R. J. and Chase, M. W. 2002. Molecular phylogenetics of caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL*, *atpB*, and *matK* DNA sequences. *Am. J. Bot.* 89(1):132-144.
- Encina, D. J. A.; Meave, J. A. and Zárate, L. A. 2013. Structure and woody species diversity of the *Dasyliirion cedrosanum* (Nolinaceae) rosette scrub of central and southern Coahuila State, Mexico. *Bot. Sci.* 91(3):335-347.
- Espinosa, A. L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de pcr. *In: ecología molecular*. Eguiarte L. E.; Souza, V. y Aguirre, X. (Comp.). Instituto Nacional de Ecología (INE)-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, DF. 517-536 pp.
- González, M. F. 2012. Las zonas áridas y semiáridas de México y su vegetación. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales (SEMARNAT)-Instituto Nacional de Ecología (INE). 1ª. (Ed.). México. 194 p.
- Granados, S. D.; Sánchez, G. A.; Granados, V. R. L. y Borja de la Rosa, A. 2011. Ecología de la vegetación del desierto chihuahuense. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. Forest. Amb. Edición especial*. 17:111-130.
- Hausner, G.; Olson, R.; Simon, D.; Johnson, I.; Sanders, E. R.; Karol, K. G.; McCourt, R. M. and Zimmerly, S. 2006. Origin and evolution of the chloroplast *trnK* (*matK*) intron: a model for evolution of group II intron RNA structures. *Mol. Biol. Evol.* 23(2):380-391.
- Hebert, P. D.; Cywinska, A.; Ball, S. L. and de Waard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological Sciences*. 270(1512):313-321.
- Hilu, K. W. and Liang, H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *Am. J. Bot.* 84(6):830-839.
- Hollingsworth, P. M.; Graham, S. W. and Little, D. P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*. 6(5):e19254.
- IMPI. 2002. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Declaración de protección a la denominación de origen sotol. <http://www.dof.gob.mx>.
- Jing, Y.; Jian-Hua, X. and Shi-Liang, Z. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(3):176-181.
- Kalendar, R.; Khassenov, B.; Ramankulov, Y.; Samuilova, O. and Ivanov, K. I. 2017. FastPCR: an *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics*. 109(4-5):312-319.

- Kim, D. K. and Kim, J. H. 2010. National center for biotechnology information. Life sciences. Kyungwon University, 65 Bokjeong-Dong, Sujeong-Gu, Seongnam-Si, Gyeonggi- Do 461-701. Korea. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Lopes, M. A.; Takasaki, K.; Bostwick, D. E.; Helentjaris, T. and Larkins, B. A. 1995. Identification of two *opaque2* modifier loci in quality protein maize. *Molecular and General Genetics*. 247(5):603-613.
- NABR. 2012. Northwest Association for Biomedical Research. Analyzing DNA sequences and DNA barcoding: using bioinformatics for genetic research. 281-318 pp.
- Reyes, V. M. H.; Benavides, M. A.; Ramírez, R. H. y Villarreal, Q. J. A. 2012. Biología e importancia del sotol (*Dasyilirion* spp.) Parte I: sistemática, genética y reproducción. *Planta*. 7(14):11-13.
- Reyes, V. M. H.; Martínez, O. and Hernández, G. F. 2016. National center for biotechnology information. Plant Breeding. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Saltillo, Coahuila 25315, México. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Roy, S.; Tyagi, A.; Shukla, V.; Kumar, A.; Singh, U. M.; Chaudhary, L. B.; Datt, B.; Bag, S.K.; Singh, P. K.; Nair, N. K.; Husain, T. and Tuli, R. 2010. Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: a case study with Indian *Berberis* species. *PLoS One*. 5(10):e13674.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. J. 2000. 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. 365-386 pp.
- Rzedowski, J. 1965. Relaciones geográficas y posibles orígenes de la flora de México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 29: 121-177.
- Sarukhán, J.; Koleff, P.; Carabias, J.; Soberón, J.; Dirzo, R.; Llorente-Bousquets, J.; Halffer, G.; González, R.; March, I.; Mohar, A.; Anta, S. y de la Maza, J. 2009. Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México. 104 p.
- Short, L.; Thoms, A. V.; Cao, B.; Sinyukov, A. M.; Joshi, A.; Scully, R.; Sanders, V. and Voronine, D. V. 2015. Facile residue analysis of recent and prehistoric cook stones using handheld Raman spectrometry. *J. Raman Spectroscopy*. 46(1):126-132.
- Tamura, M. N. 1999. National center for biotechnology information. Department of botany. Graduate School of Science, Kyoto University; Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Published on the Internet. <http://www.theplantlist.org>.
- Tropicos. org. 2018. Missouri botanical garden. <http://www.tropicos.org/Name/40022176>.
- 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, Mexico. *Phytotaxa*. 253(2):139-146.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Catálogo de las plantas vasculares nativas de México*. *Rev. Mex. Biod.* 87(3):559-902.