



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE QUELITES TRADICIONALES EN MÉXICO:
CHAYA, CHEPIL Y ALACHE. GENERACIÓN DE CÓDIGOS DE BARRAS
BIOLÓGICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QA CINDY ADRIANA ESTRADA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL
[Facultad de Química UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
[Facultad de Química UNAM](#)

ROBERT BYE BOETTLER
[Instituto de Biología UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CDMX. Junio, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Contenido	Página
Resumen.....	3
Agradecimientos.....	4
Marco teórico	5
Alimentación en México.....	5
Biodiversidad y Quelites.....	6
Descripción de las especies seleccionadas	10
Chaya.....	10
Chepil.....	16
Alache.....	21
Código de Barras Biológico.....	24
Códigos de barras y trazabilidad alimentaria.....	29
Aplicaciones filogenéticas y códigos de barras.....	30
Justificación.....	33
Objetivos.....	33
Hipótesis.....	33
Diagrama experimental	34
Metodología.....	34
Resultados y Análisis.....	41
a) Resultados de PCR punto final.....	41
b) Base de datos BOLD	44
c) Trazabilidad alimentaria.....	46
d) Árboles filogenéticos.....	60
Conclusiones.....	67
Anexo 1. Fotografías de las muestras y ejemplares de herbario	69
Anexo 2. Imágenes de los productos de PCR obtenidos	73
Apéndice A. Formulación de los alimentos evaluados por qPCR.....	76
Apéndice B. Protocolo de Extracción de DNA de quelites partiendo de alimentos.....	79
Referencias	82

RESUMEN

El presente trabajo desglosa un estudio a nivel molecular de tres quelites consumidos en México: Chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), Chepil (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) y Alache (*Anoda cristata* (L.) Schltdl). En él, se hace una descripción de la metodología empleada para la obtención de códigos de barras biológicos partiendo de los marcadores genéticos *rbcL* (gen codificante de la ribulosa bifosfato carboxilasa), *matK* (gen codificante de una maturasa) e ITS2 (espaciador interno no codificante). Las secuencias aceptadas como códigos de barras fueron depositadas en la plataforma web *Barcoding of Life Database: BOLD systems*. El análisis de las secuencias obtenidas de dichos marcadores haciendo uso de herramientas moleculares y de bases de datos fue de utilidad para la confirmación de la identidad taxonómica de las muestras analizadas. Finalmente, el diseño de primers y sondas propuesto hizo posible la identificación de los tres quelites por la técnica de PCR en tiempo real en platillos alimenticios. La información obtenida de este proyecto formará parte importante de un proyecto colaborativo denominado “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México” CONACYT 214286.

Palabras clave: Quelites, ETSS, chaya, chepil, alache, Barcoding, BOLD, qPCR.

AGRADECIMIENTOS

Al amor más grande que puede existir: Mi hermosa familia.

A la maravillosa esencia que gobierna al mundo...Dios.

A la vida, por enseñarme tantas cosas.

A mis tutores de tesis.

A mis sinodales.

A mis amigos.

A mí.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al Herbario MEXU por proporcionarnos las muestras de los especímenes de herbario.

Al proyecto CONACYT 214286 y toda la gente involucrada en el proyecto.

Al programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas y el programa de Becas CONACYT.

Al presupuesto PAIP 5000-9096.

A las instalaciones de la Facultad de Química y a mi tutora, la Dra. Amanda Gálvez Mariscal.

A la UNAM.

Alimentación en México

Actualmente nuestro país vive una situación crítica en cuanto a salud pública se refiere; sobrepeso, obesidad, presión arterial elevada y diabetes son padecimientos crónicos ampliamente generalizados en la población mexicana en los últimos años (Gálvez y Peña, 2015).

La incidencia de estos padecimientos se deriva, en gran medida, de una mala nutrición que en muchos casos proviene incluso desde la infancia. Una de las principales razones que dan lugar a una mala alimentación en México, radica principalmente en la distribución desigual del ingreso en la población, aunque paradójicamente un buen ingreso no necesariamente garantiza una alimentación adecuada (Duana y Benitez, 2014).

Los cambios en los patrones alimenticios de las últimas décadas (generados principalmente por el incremento en el consumo de comida rápida y alimentos procesados) han propiciado el decaimiento en el consumo de hortalizas y leguminosas ricas en nutrimentos, fibra, antioxidantes y otros fitoquímicos importantes para la salud, lo cual ha sido reemplazado por el consumo de alimentos procesados, de alto contenido en sal, azúcares, grasas, limitados en su contenido de fibra y nutrimentos (Gálvez y Peña, 2015).

Al conjunto de alimentos que habitualmente se consumen en un hogar se le denomina patrón de consumo alimentario y está determinado por el ingreso y la cultura, dado lo cual es diferente en cada época, región y estrato económico (Duana y Benitez, 2014).

“En México, los hogares de mayores ingresos no resienten el efecto de la crisis económica y mantienen constante la proporción del gasto en alimentos; en éstos, la tendencia es hacia una clara diversificación del consumo que se relaciona con las oscilaciones de la oferta la información nutricional y las influencias externas. En cambio los grupos más pobres no sólo se ubican en una línea de subconsumo sino que también sacrifican calidad debido al efecto combinado de la crisis y la baja del poder adquisitivo; esta situación ha introducido diversas condicionantes en la estructura del consumo” (Duana y Benítez, 2014).

En México, el patrón de consumo está encabezado por los cereales, representando todavía la fuente principal de proteínas y calorías en la alimentación promedio. El consumo de tortilla de maíz o el pan blanco de trigo cubren el 41.2 % del consumo de cereales por día. El 50% del consumo de verduras se concentra principalmente en tres productos: jitomate, chile y papa; lo mismo ocurre en el rubro de frutas donde la naranja, el plátano y la manzana concentran más del 50% (ENIGH, 2012). El consumo anual de vegetales per cápita para el mexicano es de 55 kg, siendo una cantidad pobre a diferencia de Grecia en donde se consumen 276 kg por persona. Las verduras representan una fuente importante de fibra para el organismo. En México la ingesta recomendada de fibra es de 30 g al día (NOM-051, 2010), sin embargo el promedio de consumo se ubica en 15 g. Diversos estudios han demostrado que el alto consumo de frutas y verduras está

vinculado a un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas; especialmente enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, y algunos tipos de cáncer (Bazzano, 2003).

En cuanto a productos procesados se refiere, México es el décimo mercado más importante, con un consumo anual per cápita de 505 dólares. En esta categoría encontramos a los productos enlatados, congelados, productos de panificación y bebidas azucaradas. Cabe recordar que México ocupa el cuarto lugar en consumo anual de refrescos con 137 litros per cápita encontrándose por debajo de Argentina con 155, Estados Unidos con 154 y Chile con 141 (Euromonitor International, 2017). La mala alimentación, aunada al sedentarismo, ha provocado que actualmente el 72.5% de la población mexicana adulta sufra problemas de sobrepeso y obesidad (ENSANUT MC, 2016).

Como se puede apreciar, el panorama de alimentación en nuestro país es aún muy deficiente, por tanto, es necesario redoblar esfuerzos en fomentar la cultura de la buena alimentación de tal forma que la población tenga acceso a una dieta que involucre a todos los grupos alimenticios en variedad y cantidad adecuadas. Con la amplia riqueza natural de nuestro territorio nacional no debería ser difícil lograrlo.

Biodiversidad y Quelites

En el año 2010, se dio a conocer un listado de países que, en conjunto, engloban la mayor cantidad de especies y ecosistemas en el mundo, a este grupo de naciones se le conoce como grupo de países megadiversos afines; y se le da el nombre de país megadiverso a aquel que cumple con las características geográficas y climáticas necesarias para albergar una gran cantidad y variedad de especies animales y vegetales (CONABIO, 2016). Actualmente el grupo de países megadiversos lo conforman 17 naciones: Brasil, Costa Rica, China, Colombia, Ecuador, India, Indonesia, Kenia, México, Perú, Sudáfrica, Venezuela, Bolivia, Malasia, Filipinas, Guatemala e Irán (CONABIO, 2016).

En cuestión de biodiversidad vegetal, México ocupa la cuarta posición a nivel mundial albergando más de 23 mil especies de plantas vasculares nativas (Villaseñor, 2016).

Dentro de esta gran diversidad, encontramos a un grupo de plantas comestibles denominadas ETSS. Las especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas (ETSS) se definen como especies y variedades de cultivos de uso tradicional/ancestral con valor nutrimental importante pero cuyo cultivo, colecta y uso, en algunas instancias, se ha reducido o está disminuyendo (Gálvez y Peña, 2015). Entre este grupo de plantas encontramos a los quelites, palabra derivada del náhuatl *quilitl* que significa hierba comestible (Wiley, 2014 y Bye *et al.* 2013).

Desde los inicios de la conquista española hasta nuestros días, numerosos cronistas, naturalistas, antropólogos y botánicos han documentado plantas mexicanas que han sido utilizadas, en mayor o menor grado, como alimento. De esta forma podemos definir a los quelites como **plantas**

cuyos brotes, hojas, tallos tiernos y en algunos casos las inflorescencias inmaduras, se consumen como verdura (Bye y Linares, 2000)(Fig. 1).



Fig 1. Algunos de los quelites consumidos en México.

Los quelites generalmente se encuentran formando parte de la *milpa*, es decir, son plantas que crecen de manera conjunta en campos de cultivos de maíz, chile, jitomate, frijol y otros cultivos principales (Rendón, 2001). Sin embargo, existen algunos que crecen fuera de las parcelas o en las orillas de los caminos (bledos, chipilín, hierbamora), algunos otros son favorecidos o protegidos (epazote, quintoniles) y muy pocos son cultivados, aunque no necesariamente domesticados por ejemplo, los berros, el huahuzontle, el pápalo o las verdolagas (Rendón, 2001).

A pesar de no cultivarse a gran escala, los quelites representan un aporte económico y nutrimental importante para las familias de comunidades étnicas y rurales de nuestro país, pues además de su consumo, en ocasiones también son cosechados para venta en tianguis, mercados sobre ruedas, venta casa por casa o incluso trueque (Castro, *et al.* 2011).

Desde el punto de vista social y cultural, estas plantas fueron parte esencial de la dieta mesoamericana, sin embargo, la introducción de cultivos de origen europeo, los cambios en los hábitos de alimentación, la urbanización y la pérdida de terreno cultivable, minimizaron su consumo. Los quelites poco a poco fueron devaluados a alimentos de segunda categoría o considerados “alimentos para pobres” (Nabhan, 1985). No obstante, recientemente se han hecho esfuerzos por reintegrarlos a la dieta del mexicano debido a sus propiedades nutrimentales y organolépticas; como ejemplo tenemos a la cocina gourmet y restaurantes de cocina tradicional mexicana en donde es frecuente encontrar quelites en sus platillos. Esto ha propiciado una mejor perspectiva en su consumo por diferentes estratos sociales.

Nutrimentalmente hablando, los quelites representan un alimento rico en vitaminas, minerales y fibra; incluso más que otros vegetales de hoja verde y de amplio consumo como la lechuga y la espinaca (Linares, 2012), más adelante se hace una comparación de nutrientes entre los quelites estudiados en éste proyecto y la espinaca.

En comunidades urbanas, aún hay interés por mantener el consumo de alimentos saludables. Como ejemplo, la comunidad de Xocotepec en el estado de Veracruz, en donde padres de familia y maestros colaboran en conjunto para proporcionar a los menores desayunos escolares nutritivos y apetecibles. Tortitas de quelites, xoco (tamales de masa negra rellenos de vegetales), mermeladas caseras, frutas de temporada y aguas naturales, son algunas de sus propuestas logradas (Ávila, 2015).

En 1992, Edelmira Linares, investigadora del Instituto de Biología de la UNAM, y Judith Aguirre, publicaron la primera edición del libro *Los quelites, un tesoro culinario*; en esta recopilación, las autoras combinan información botánica de diversas especies de quelites y recetas para cocinarlos. Linares y Aguirre explican que dicha publicación surgió a partir de un concurso culinario promovido por la UNAM y el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, para estimular el interés en estas variedades vegetales para su inclusión en una dieta saludable (Linares, 1992).

En el año 2009, fue creada la Red Nacional de Quelites, perteneciente al Sistema Nacional de Recursos fitogenéticos (SAGARPA-SNICS-SINAREFI), en la cual se conjuntan diversas instituciones y disciplinas con la finalidad de revalorizar la importancia cultural, nutricional, culinaria y ecológica de los quelites. Dentro de este grupo de trabajo se realizó un inventario nacional de especies utilizadas como quelites, en el cual se registraron 250 especies de diversas familias botánicas, la mayoría nativas de América, y con tendencia a aumentar, debido a la diversidad cultural y biológica que existe en México (Castro-Lara *et al.*, 2014). Lista completa disponible en: http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_quelite.html#cajaInformes

Por otra parte, en el libro *Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria*, los autores Luz María Mera Ovando, Delia Castro Lara y Robert Bye Boettler recabaron artículos de investigación científica y estudios de caso. Básicamente resaltaron tres aspectos importantes respecto a los quelites: reconocer su diversidad taxonómica, su importancia cultural, e identificar su papel en la alimentación de distintas comunidades mexicanas (Bye, 2013).

Con el propósito de extender el conocimiento y consumo de los quelites, se han llevado a cabo diversas actividades, principalmente en zonas metropolitanas, como muestras gastronómicas, elaboración de recetarios, realización de talleres, actividades lúdicas y demostrativas, simposios, encuentros de productores, realización de carteles y publicaciones de carácter científico y de divulgación, así como entrevistas en diversos foros. En ellas se ha contado con la participación de investigadores, productores, vendedores de quelites, chefs y cocineros. Por medio de estas actividades se espera la revaloración de los diversos quelites principalmente por el sector urbano (Castro-Lara *et al.*, 2014).

En agosto de 2013, expertos en distintos rubros del sector académico relacionado con la alimentación se reunieron en las instalaciones del PUAL (Programa Universitario de Alimentos) de la UNAM generando un documento intitulado “Laboratorio de ideas interdisciplinario e inter-institucional para articular una estrategia integrada nacional para mejorar la alimentación, el uso de la biodiversidad y el desarrollo agrícola sostenible en México”.

La propuesta inicial derivada de esta reunión consistió en realizar trabajos de caracterización, distribución, valor agregado, estrategias de mejoramiento, conservación y desarrollo de nuevos productos de acuerdo a oportunidades de mercado de ETSS (Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas). De allí nació una propuesta sometida a la convocatoria CONACYT abierta para la Solución de Problemas Nacionales, la cual fue aprobada en 2014 a través de la financiación del proyecto denominado “Rescate de especies subvaloradas tradicionales de la dieta mexicana y su contribución para el mejoramiento de la nutrición en México”, proyecto CONACYT no. 214286. El objetivo principal de dicho proyecto consiste en la obtención de información de distinta índole de tres especies que sean apreciadas por sus cualidades organolépticas y con un nicho de mercado interesante. Con esta información se pretende revalorizar el concepto que se tiene sobre estos quelites y fomentar con ello la buena alimentación en nuestro país.

De la amplia gama de quelites encontrados en México (alrededor de 250-300 especies), se eligieron 3 para su estudio, de las cuales se tiene poco conocimiento pero gran aceptación en diferentes zonas del país, ellas son: Chaya, Chepil y Alache.

Descripción de las especies seleccionadas

1.- Chaya

Nombre científico:

***Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst**

Familia: *Euphorbiaceae*

Nombres comunes: Chaya, árbol espinaca, chayamansa, chay, espinaca maya, chaya de castilla.

Clasificación taxonómica (SIIT, 2013):

Reino: *Plantae*
Subreino: *Viridaeplantae*
Infra reino: *Streptophyta*
División: *Tracheophyta*
Subdivisión: *Spermatophytina*
Infra división: *Angiospermae o Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Superorden: *Rosanae*
Orden: *Malpighiales*
Familia: *Euphorbiaceae*
Subfamilia: *Crotonoideae*
Género: *Cnidoscolus*
Especie: *aconitifolius*

Sinónimos: *C. chayamansa* Mc Vaugh, *C. fragrans* (Kunth) Pohl, *C. palmatus* (Willd) Pohl, *C. napifolius* (Desr)Pohl, *Jatropha aconitifolia* Mill, *Jatropha deutziflora* Croizat. (The Plantlist, 2013).

Hasta ahora han sido bien caracterizadas cuatro tipos de chaya domesticada diferenciables en cuanto a morfología y caracteres fenotípicos: estrella, picuda, chayamansa y redonda (Fig. 2).



Fig. 2.- Variedades de chaya domesticada: a) Estrella, b) Mansa, c) Picuda y d) Plegada (Cifuentes, *et al*, 2009).

La chaya es una planta perenne originaria de Honduras que se distribuye ampliamente en Centroamérica y en el sur de México (Fig. 3 y 4). Crece preferiblemente en climas cálido y semicálido desde los 0 hasta los 700 m sobre el nivel del mar (Valenzuela, *et al*, 2015).



Fig. 3. Distribución geográfica de *Cnidoscolus aconitifolius* a nivel mundial.
<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Cnidoscolus+aconitifolius>

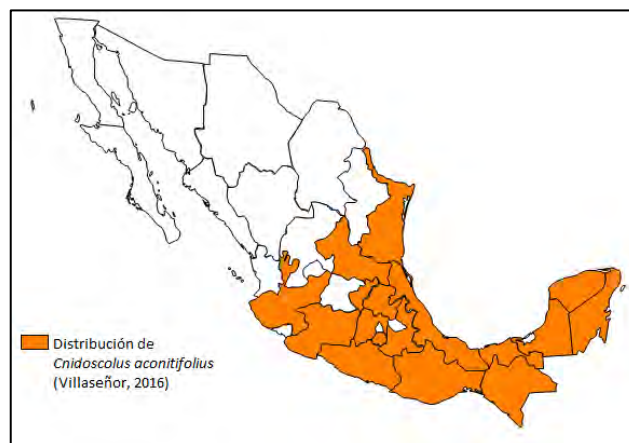


Fig. 4. Distribución geográfica de *Cnidoscolus aconitifolius* en México.

La chaya crece en bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio, subperennifolio y perennifolio aunque también es una planta resistente a sequías (Marín, 1981).

Morfológicamente, es un arbusto que llega a alcanzar hasta tres metros de altura, de grandes hojas pecioladas en forma de estrella de tres a cinco picos con vellosidades urticantes al tacto (aunque hay algunas variedades que no presentan este efecto urticante). Sus flores son escasas, blancas, pequeñas y en racimos (Fig. 8). Crece todo el año pero en temporadas de lluvias las hojas son más abundantes y de textura más tierna. En la cocina yucateca y guatemalteca es considerada un ingrediente común en diversos platillos típicos como tamales, guarniciones y sopas. De las cuatro variedades, chayamansa es la más ampliamente domesticada y por ende la más utilizada para consumo humano (Ross-Ibarra, 2002).



Fig. 8. *Cnidocolus aconitifolius*

La planta en crudo no debe ser ingerida ya que posee alto contenido de glucósidos cianogénicos: 10.3 a 97.2 mg HCN por cada 100 gramos de hoja cruda (Quezada *et al*, 2007). Estos compuestos *per se* no resultan tóxicos sin embargo diversos procesos enzimáticos en donde participan enzimas como la β -glicosidasa provocan la hidrólisis de los glucósidos liberándose como producto ácido cianhídrico, compuesto altamente tóxico (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de glucósidos cianogénicos en algunos alimentos (Badui, 2006).

Vegetal	Ácido cianhídrico (mg/100g)
<i>Phaseolus lunatus</i>	14.4 – 167.0
Otros <i>Phaseolus</i>	210.0 – 312.0
Sorgo (<i>Sorghum sp.</i>)	250.0
Yuca (<i>Manihot utilissima</i>)	113.0
Linaza (<i>Linum usitatissimum</i>)	53.0
Judías (<i>Phaseolus sp.</i>)	2.0
Chícharo (<i>Pisium sativum</i>)	2.3

El proceso de cocción libera compuestos cianogénicos en forma de ácido cianhídrico lo cual elimina prácticamente cualquier riesgo de su consumo en alimentos cocinados (Badui, 2006). También se sabe que una dieta rica en aminoácidos sulfurados y cereales ricos en metionina ayuda a detoxificar al organismo de cianuro. (Rivadeneira- Domínguez *et al*, 2012).

En el sureste de México es común consumir agua de chaya, la cual es elaborada con hojas **crudas** de chaya, agua, azúcar, piña y jugo de limón. Sin embargo, hasta el momento no existen datos documentados sobre intoxicaciones por el consumo de esta bebida.

Evidencias recientes han sugerido que el consumo prolongado de yuca guarda una estrecha relación con daños neurológicos como neuropatía atáxica tropical (TAN) y paraparesia espástica (Konzo). Sin embargo, debido a las condiciones de pobreza de estas poblaciones, la participación de factores como la malnutrición y el bajo consumo de proteínas en la dieta podrían alterar la información fidedigna sobre la relación dosis-respuesta de compuestos cianogénicos (Rivadeneira-Domínguez *et al*, 2012).

En vista de lo anterior, es necesario realizar más investigaciones en el ramo de toxicidad crónica para evaluar los posibles riesgos en el consumo frecuente de alimentos con alto contenido en glucósidos cianogénicos, así como el importante papel que cumpliría la cocción doméstica, sus variantes y los resultados en alimentos ya preparados.

En lo referente a las bondades de la planta, a la chaya se le han atribuido distintas propiedades curativas para el tratamiento de enfermedades como diabetes, dolor de riñón, obesidad, colesterol elevado y hemorroides; posee propiedades diuréticas y laxantes, y también se utiliza como estimulante para la lactancia materna (Biblioteca Nacional de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En 1997, en un estudio realizado por la Universidad de Campeche en 2009, se encontró que *Cnidocolus chayamansa* induce un efecto hipoglucemiante muy similar al de los medicamentos suministrados para los diabéticos como glibenclamida y metformina. El estudio se realizó en ratas sanas y ratas diabéticas administrándoles por vía oral infusiones concentradas de chaya (Figuroa, 2009). En el año 2015, Valenzuela *et al.*, reportaron el mismo efecto al evaluar infusiones de chaya orgánica en ratas diabéticas. (Fig. 9). Este efecto lo atribuyen a la presencia de compuestos fitoquímicos como catequina y rutina (Valenzuela *et al.*, 2015).

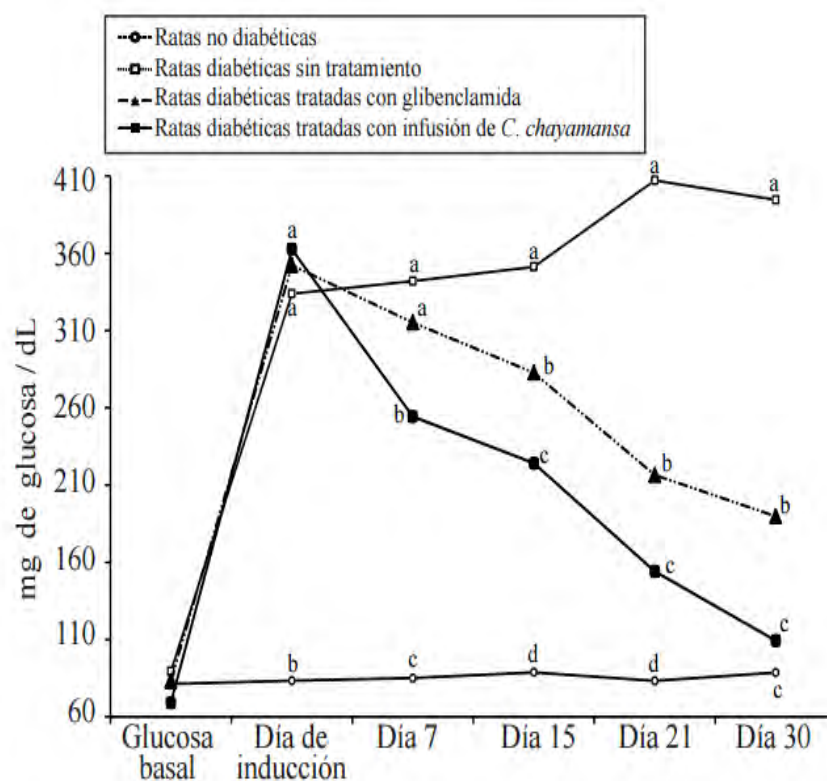


Figura 9. Niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas tratadas con infusiones de hoja seca de *Cnidioscolus chayamansa*. Puntos en el mismo día de evaluación con distinta letra son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Nutricionalmente hablando, la chaya es una planta rica en minerales, principalmente calcio. En la Tabla 2 se muestra una comparación nutrimental entre chaya y espinaca. Se hace referencia a la espinaca por ser esta última una de los vegetales de hoja verde más consumidas por la población mexicana.

Tabla 2.- Contenido nutrimental de chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*) y de espinaca (*Spinacia oleracea*). Por cada 100g de hoja cruda.

Componente	Cantidad en Chaya	Cantidad en Espinaca
Agua (g)	76.7	91.4
Proteína (g)	7.1	3.0
Grasa (g)	1.0	0.3
Carbohidratos totales (g)	10.7	3.6
Fibra cruda (g)	2.2	2.3
Ceniza (g)	2.2	1.7
Calcio (mg)	320.0	99.0
Fósforo (mg)	100.0	49.0
Hierro (mg)	4.35	2.7
Actividad de Vitamina A (U)	2.3	2.8
Tiamina (mg)	0.2	0.1
Riboflavina (mg)	0.4	0.3
Niacina (mg)	1.6	0.7
Ácido ascórbico (mg)	194.0	28.0

Valor energético (kcal)	64.0	23.0
-------------------------	------	------

Fuente: <http://nutritiondata.self.com/>, <http://prezi.com/elgod4iwtswg/analisis-quimico-de-la-hoja-de-chaya/> Análisis químico proximal de la hoja de Chaya que se cultiva en El Salvador. Rosa Furtin Yuri Y., Salomón Hdez. Jorge A. 2012. Tesis de licenciatura en Química y Farmacia. Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. El Salvador.

Como se aprecia en la Tabla 2, la chaya posee un alto contenido de proteínas y vitamina C mientras que en todos los casos supera los niveles de la espinaca principalmente calcio y fósforo.

En México el consumo de chaya prevalece en la zona Sur del país en estados como Chiapas, Quintana Roo, Campeche y Yucatán. Con ella se elaboran diversos platillos como sopas, guarniciones, cremas, tamales.

En el sureste de México se considera a *Cnidoscolus chayamansa* y *Cnidoscolus aconitifolius* como especies distintas (Chávez et al, 2009); siendo conocida como chayamansa a aquellas plantas de hoja amplia sin vellosidades urticantes (*C. chayamansa*) y chaya de Castilla o chaya brava a aquellas plantas de hoja estrellada con vellosidades urticantes (*C. aconitifolius*), (Tabla 3).

Tabla 3. Distinción entre Chaya y Chaya de Castilla según Chavez et al, 2009

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	FORMA BIOLÓGICA	PARTE COMESTIBLE	FORMA DE PREPARARSE	POBLACIÓN QUE LA CONSUME
Chaya	<i>Cnidoscolus chayamansa</i> Mc-Vaugh.	Euphorbiaceae	Arbusto	Hojas y flores	Cocidas en tamales, crudas, en aguas frescas y flores cocidas capeadas	Mestizos
Chaya de Castilla	<i>Cnidoscolus aconitifolius</i> (Mill)	Euphorbiaceae	Arbusto	Hojas	Hojas cocidas y crudas, licuadas en refrescos	Tojolabales y mestizos

En el portal ITIS (Integrated Taxonomic Information System), el portal ePIC (electronic Plant Information Centre) y en Plant Database (The PLANTS Database (USDA/NRCS)) también se tienen consideradas a *chayamansa* y a *aconitifolius* como especies diferentes; sin embargo en el portal de códigos de barras de la vida (BOLD), The PlantList y el último inventario de plantas vasculares de México, son considerados como sinónimos (Villaseñor, 2016).

A continuación se enlistan diversos platillos elaborados con chaya en México:

- Tamales de chaya (Yucatán)
- Tamales al estilo Campeche (Campeche)
- Crema de chaya (Yucatán)
- Albondiguillas de chaya (Tabasco)
- Sopa de chaya y papa (Tabasco)

- Rollos de chaya y chicharrón (Tabasco)
- Arroz yucateco (Yucatán)
- Empanaditas de chaya (Tabasco)
- Empanadas de chaya (Yucatán)
- Soufflé de chaya (Tabasco)
- Chaya en ensalada (Tabasco)
- Chaya con calabaza, pimientos verdes o verduras (Tabasco)
- Plátanos rellenos de chaya (Tabasco)
- Bosto (Tabasco)
- Puchero Vaquero (Veracruz)
- Puchero de espinazo con chaya (Chiapas)
- Volteado de chaya y plátano (Tabasco)
- Spaghetti con chaya (Tabasco)
- Dzutobichay (Yucatán)
- Pejelagarto en verde (Tabasco). Este plato también lleva chepil entre sus ingredientes.
- Camarón en verde (Tabasco). En este plato se usa chepil como condimento.

Recetas completas disponibles en: <http://www.recetas-mexicanas.org/chaya>

2.- Chepil

Nombre científico: ***Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn.**

Familia: *Fabaceae* o *Leguminosae*

Otros nombres comunes: Chepile, chepiles, chipil, chipiles, chipilín.

Clasificación taxonómica (SIIT, 2013).

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Viridaeplantae</i>
Infra reino:	<i>Streptophyta</i>
División:	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión:	<i>Spermatophytina</i>
Infra división:	<i>Angiospermae</i> o <i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Superorden:	<i>Rosanae</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae, Leguminosae</i>
Género:	<i>Crotalaria</i>
Especie:	<i>longirostrata</i>

El chepil es una planta anual de crecimiento silvestre en países como México, Guatemala, Belice, El Salvador, Panamá y Costa Rica (Figs. 10 y 11). Se desarrolla bien en climas templado, seco y semiseco entre los 1,000 y los 2,750m sobre el nivel del mar. En Australia está prohibida la importación de esta especie debido a que es considerada una planta invasiva, además se han reportado intoxicaciones por confusión de chipilín con otras especies del género *Crotalaria* (Morton, 1994).

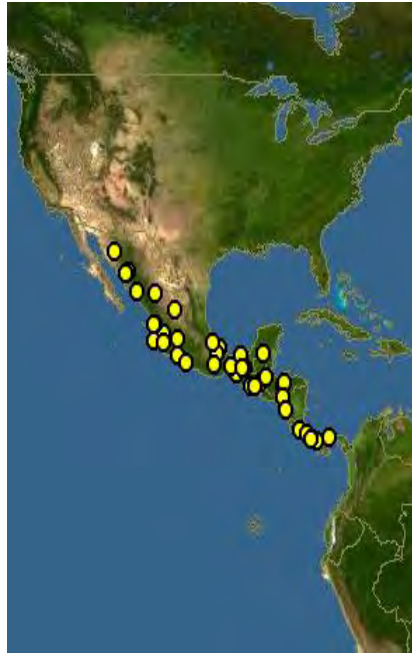


Fig.10. Distribución geográfica de *Crotalaria longirostrata* en América
<http://www.discoverlife.org/mp/20m?r=0.2&la=21&lo=-60&kind=Crotalaria+longirostrata>

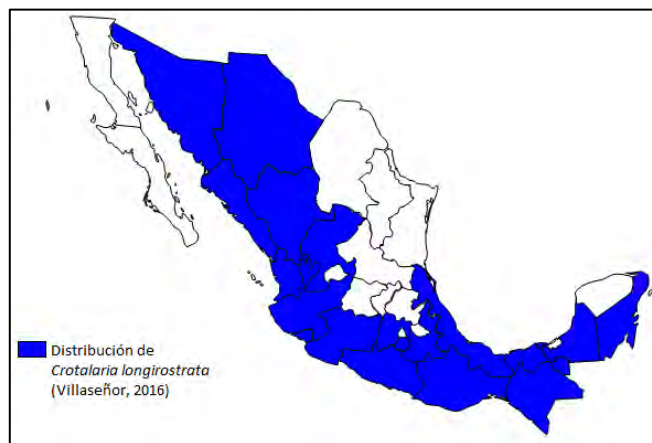


Fig. 11. Distribución de *Crotalaria longirostrata* en México.

La planta de chepil es un arbusto o árbol pequeño de no más de 1.8 m de altura, con peciolos de tres hojas lobuladas de no más de 2 cm de longitud. Las flores son de color amarillo brillante y crecen en diminutos racimos de 15 a 20 unidades por rama (Fig.12). Sus semillas son reniformes de color amarillo a café oscuro y crecen dentro de vainas.



Fig. 12.- *Crotalaria longirostrata*

Las semillas y la raíz son tóxicas debido a su alto contenido en alcaloides tóxicos, sin embargo, las hojas de chepil cocinadas son consideradas un alimento rico en hierro, vitamina C, tiamina, niacina y calcio (Tabla 4). A pesar de la rápida domesticación de la planta, se sabe poco de ella en el ramo de investigación en nutrición y propiedades medicinales; no obstante se le atribuyen propiedades curativas para contrarrestar deficiencia en minerales y combatir sintomatología de blenorragia, insomnio y reumatismo (Ardón, 2008). En 2003 se realizaron estudios bromatológicos que permitieron sugerir el uso de chepil como forraje animal (Arias, 2003).

**Tabla 4.- Contenido nutrimental de chepil (*Crotalaria longirostrata*) y de espinaca (*Spinacia oleracea*).
Por cada 100g de planta**

Componente	Cantidad en chepil	Cantidad en espinaca
Agua (g)	81.8	91.4
Proteína (g)	7.1	3.0
Grasa (g)	1.0	0.3
Carbohidratos totales (g)	8.7	3.6
Fibra cruda (g)	1.9	2.3
Ceniza (g)	1.4	1.7
Calcio (mg)	248	99
Fósforo (mg)	74	49
Hierro (mg)	4.9	2.7
Actividad de Vitamina A (U)	3.8	2.8
Tiamina (mg)	0.3	0.1
Riboflavina (mg)	0.5	0.3
Niacina (mg)	2.02	0.7
Ácido ascórbico (mg)	112	28
Valor energético (kcal)	57	23

Fuente: <http://nutritiondata.self.com/>

En México, el chepil fresco se consigue principalmente en mercados de venta local y tianguis en los estados del sureste del país, mientras que en la Ciudad de México es posible encontrarlo en la central de abastos en el área de legumbres pero como planta seca.

En una publicación del 2009, Chavez *et al.*, encontraron que en el estado de Chiapas se hace una distinción entre chipil y chipilín. El nombre de chipil se le denomina a la especie *Crotalaria pumila* y chipilín o chipil de hoja ancha a *Crotalaria longirostrata* (Tabla 5). Morfológicamente, las dos especies guardan gran parecido entre sí e incluso se consumen de la misma manera, sin embargo *Crotalaria pumila* tiene una hoja más alargada (Fig. 13).

Tabla 5.- Diferencias entre Chipil y Chipilín de acuerdo a lo observado por Chavez *et al.*

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	FORMA BIOLÓGICA	PARTE COMESTIBLE	FORMA DE PREPARARSE	POBLACIÓN QUE LA CONSUME
Chipil	<i>Crotalaria pumila</i> Ort.	Fabaceae	Hierba	Hojas	Cocidas con frijoles, carne, masa	Tojolabales. Mestizos
Chipilín	<i>Crotalaria longirostrata</i> H.et.A	Fabaceae	Hierba	Hojas	Cocidas en caldos con carne o queso y en tamales.	Mestizos, zoques



Fig. 13. Muestras de herbario de *Crotalaria pumila* (izquierda) y *Crotalaria longirostrata* (derecha). Morfológicamente son plantas muy similares excepto que la anchura de la hoja y tallo es mayor en la especie *longirostrata*.

La gran aceptación de este quelite por países centroamericanos y la creciente movilización de inmigrantes a Estados Unidos en las últimas décadas ha dado pie a la creación de granjas dedicadas al cultivo y comercialización de plantas de origen centro y sudamericano. Tal es el caso de la granja UMass Research Farm en Deerfield, Massachusetts, cuya producción de chepil es comercializada por la cadena Market Basket Store y distribuida en distintos supermercados en

la ciudad de Boston (Fig.14). Con ventas desde 40 hasta 300 libras por semana a un costo de 4-6 dólares por libra, el chepil ha dado grandes satisfacciones desde su introducción al mercado en el año 2008 tanto a productores y comercializadoras como a restauraneros y consumidores por igual (Mangan, 2009).



Fig 14. Chepil en exhibición para venta Latino Store, Chelsea Massachusetts.

En el año 2014, estudiantes del Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Oaxaca interesados en utilizar proteínas de origen vegetal (con el fin de disminuir los índices de desnutrición en municipios de alta marginación), generaron como propuesta la utilización de harina de chepil (mezclada con harina de maíz o trigo) para la elaboración de productos de consumo generalizado como tamales, panes, galletas y tortillas (Fig.15). Si bien en un principio la tonalidad de los alimentos elaborados con la harina de chepil no era de mucho agrado para los consumidores, el sabor, variedad de uso, y precio sí fue de amplia aceptación para los habitantes de San Pedro Jicayán pues denotaron que el sabor característico del chepil prácticamente no era notorio al degustar los productos. Con lo anterior, podemos apreciar una aplicación nueva y versátil para el uso y consumo de chepiles en la dieta (Velásquez, 2014).



Fig. 15. Productos elaborados a base de harina de chepil y harina de maíz en el estado de Oaxaca.

De sabor fuerte y pronunciado, el chepil es mayormente consumida en el sureste de México y en países centroamericanos como condimento en arroz, tamales y sopas.

Entre los principales platillos que se consumen en México se encuentran los siguientes:

- Arroz con chepiles (Oaxaca)
- Sopa de guías con chochoyotes (Oaxaca)
- Tamalitos de chipilín (Veracruz)
- Tamales de chepil (Oaxaca)
- Tamales de chipilín (Chiapas)
- Frijoles con chipilín (Chiapas)
- Olla podrida (Chiapas)
- Frijoles en chipilín y puerco con chirmol (Chiapas)
- Crema de chipilín (Chiapas)
- Chipilín con bolitas (Chiapas)
- Chipilín con tortas de masa y queso (Chiapas)
- Tamales de chipilín con camarón (Chiapas)
- Pescado con hojas de momo (hierba santa) y chipilín (Tabasco)

Recetas completas disponibles en: <http://www.recetas-mexicanas.org/>

3.- Alache

Nombre científico: *Anoda cristata* (L.) Schtdl.

Familia: *Malvaceae*

Nombres comunes: Alaches, violeta, violeta campestre, quesitos, malva, altea, anoda.

Clasificación taxonómica (SIIT, 2013).

Reino: *Plantae*
Subreino: *Viridaeplantae*
Infra reino: *Streptophyta*
División: *Tracheophyta*
Subdivisión: *Spermatophytina*
Infra división: *Angiospermae o Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Super orden: *Rosanae*
Orden: *Malvales*
Familia: *Malvaceae*
Género: *Anoda*
Especie: *cristata*

El alache es una planta anual, de crecimiento silvestre en México aunque también crece bien en el sur de Estados Unidos y países centro y sudamericanos (Fig. 16). De acuerdo con el último inventario de plantas vasculares realizado en nuestro país, *Anoda cristata* es una especie que se encuentra distribuida en todo el país (Villaseñor, 2016).

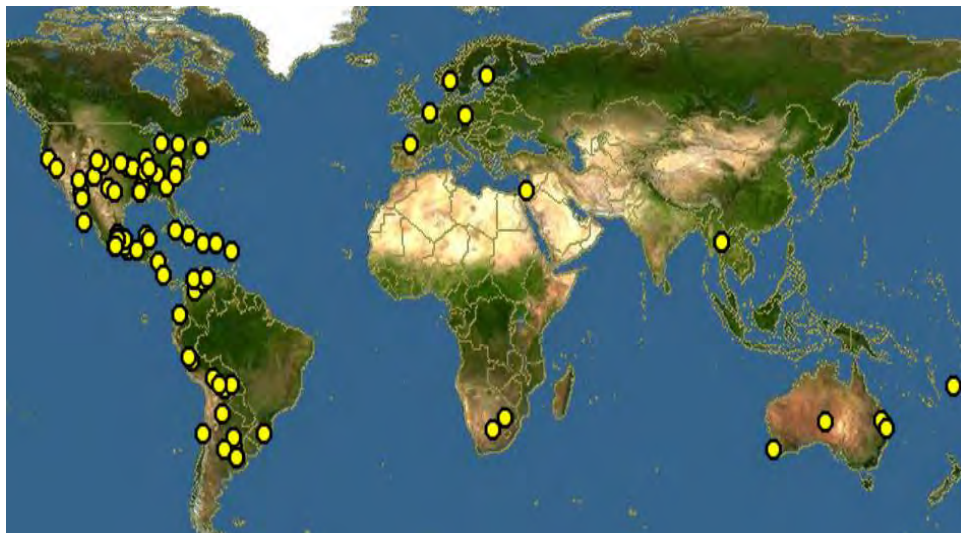


Fig. 16. Distribución geográfica de *Anoda cristata*.

http://www.discoverlife.org/mp/20m?r=.5&t_la=-78.6&t_lo=87&kind=Anoda+cristata&place=target

Morfológicamente hablando, el alache alcanza hasta un metro de altura, posee hojas pecioladas de forma triangular irregular con la parte central más larga, de color verde y algunas veces con zonas rojizas a lo largo del nervio central, con vellosidades en el tallo y cáliz (Bernal y Rendón, 2011) . Sus flores son de color lila o morado (en raras ocasiones de color blanco) con cinco pétalos de 8 a 26 mm de longitud cada uno. La morfología de la hoja y el tamaño de la flor varían dependiendo de las condiciones del entorno en que se desarrolle. Sus frutos son de forma pubescente con extremos radiales en cuyo interior se hallan hasta 20 semillas reniformes de color blanco cuando son tiernas y de color negro cuando están secas (Fig.17), (CONABIO, 2009).



Figura 17.- *Anoda cristata*

Abundante con las lluvias en los sembradíos, milpas y cañadas, el alache es de naturaleza fría aunque es capaz de crecer en una amplia diversidad de climas. Puede ser común su crecimiento en cultivos de maíz, pero no es un problema grande en la agricultura campesina y maicera ya que se desarrolla en forma tardía. Por el contrario, representa un problema sustancial en la agricultura de cultivos como el algodón y la soya, en donde ocasiona reducción en el rendimiento y disminución en la calidad de la fibra del algodón (Harish *et al*, 2003 y CONABIO, 2016).

En comunidades rurales, la planta se ha utilizado para tratar diversos padecimientos como, tos, bronquitis, fiebre, gastritis, dolores de estómago, disentería, e incluso diabetes (Biblioteca de Medicina Tradicional, 2009).

En el año 2014, investigadores de la UNAM evaluaron los posibles efectos hipoglucemiantes y antihiperlipémicos de extractos de *Anoda cristata* por vía oral en ratones. Los resultados obtenidos permitieron concluir que efectivamente ciertos compuestos presentes en los extractos de alache provocan disminución en los índices de glucosa en sangre, muy similar incluso al

efecto de medicamentos utilizados por pacientes diabéticos como la glibenclamida (Juárez *et al.*, 2015). Los compuestos evaluados y caracterizados no sólo por su actividad antihiper glucemiante, sino también por su actividad antioxidante, fueron los flavonoides acacetina y diosmetina (Juárez *et al.*, 2015) (Fig. 18).

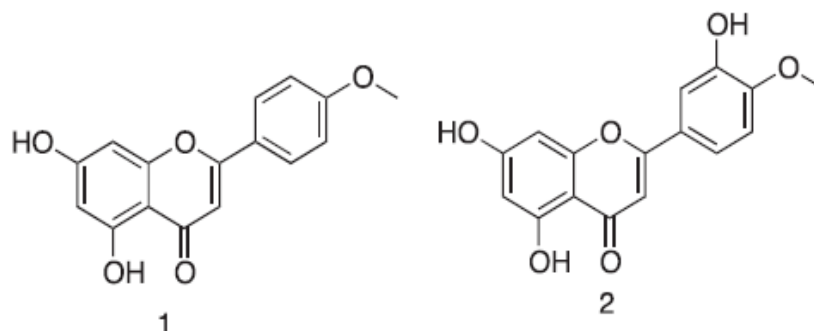


Figura 18. Estructura química de flavonoides encontrados en *Anoda cristata*, (1) Acacetina, (2) Diosmetina. (Fuente: Juárez *et al.*, 2015)

En Estados Unidos, en algunas regiones de Texas y Arizona llegan a encontrarse alaches durante la temporada de lluvias. Aquellos pobladores que logran identificarla la utilizan como remedio natural o como alimento. El jardín botánico de la Universidad de Cornell en Nueva York almacena varios especímenes de esta planta y difunde información de utilidad a través de panfletos impresos o por vía electrónica (Grassroot-gardens, 2016).

Entre las recetas mexicanas más populares en donde se pueden encontrar alaches se encuentran las siguientes:

- Sopa mixteca (Oaxaca)
- Sopa de alaches con chepiche (Puebla)
- Alaches con chepiles y calabacitas (Oaxaca)
- Filete de res con bechamel de flor de calabaza con ensalada de verdolagas y alaches (México)

Recetas completas disponibles en: <http://www.recetas-mexicanas.org/>

Como se puede apreciar, los quelites representan una opción culinaria y nutrimental bastante interesante para mejorar la dieta de la población en México. La taxonomía clásica ha sido una herramienta muy importante para caracterizar especímenes vegetales. Sin embargo hoy en día los avances en biología molecular han permitido conocer aspectos genéticos y relaciones evolutivas entre especies, una herramienta que poco a poco ha ido ganando terreno en este ámbito son los códigos de barras genéticos o *DNA barcodes*.

Código de Barras Biológico

En 1993, un grupo de investigadores dirigido por el Doctor Paul Hebert de la Universidad de Guelph en Canadá, diseñó una metodología molecular útil para la identificación de seres vivos,

el código de barras genético o también llamado código de barras biológico. Al igual que los códigos de barras UPC (Universal Product Code), los códigos de barras genéticos contienen una secuencia de caracteres (en este caso nucleótidos) única para cada especie. El “DNA barcoding” o generación de códigos de barras de DNA no sólo es una herramienta de utilidad para los taxónomos sino que también representa un recurso importante para la identificación y clasificación de organismos, especialmente de aquellos que tienen gran parecido entre sí, o de especímenes que se encuentran fragmentados, deteriorados, desarrollados incompletamente o con una fase de crecimiento temprana o metamórfica (BOLD, 2013).

Un código de barras genético es una secuencia parcial de nucleótidos de un gen proveniente del genoma de un ser vivo. Tal secuencia siempre debe cumplir con las siguientes características:

- El gen de procedencia debe encontrarse en todas las especies de su género.
- La secuencia debe ser tan corta como sea posible (< 700pb), conservada a través de muchas generaciones pero lo suficientemente variable para distinguir entre especies.

Para el caso de animales, las secuencias elegidas como códigos de barras provienen del gen *COI* que codifica para una proteína mitocondrial involucrada en el proceso respiratorio (citocromo C oxidasa subunidad 1), sin embargo en plantas se ha visto que dicho gen no tiene suficiente especificidad y por ello, alternativamente, se han utilizados los genes de cloroplasto *matK* y *rbcL* como marcadores para la generación de códigos de barras en plantas.

El gen *matK* (1,500pb) codifica para la maturasa K, la cual es una enzima involucrada en el procesamiento o splicing de los intrones *rpl2* y *rps12* (Bora, 2010).

El gen *rbcL* codifica para la subunidad grande de la ribulosa 1,6 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO) una enzima ampliamente conocida por su participación en el proceso respiratorio de plantas (Bora, 2010).

La figura 19, muestra la diversidad de genes que se usan actualmente o que podrían utilizarse como marcadores moleculares para la obtención de códigos de barras de especies vegetales. De los tres grupos cromosómicos, los genes de cloroplasto son los que han dado mejores resultados en la generación de códigos (en la imagen, en color verde se representan aquellos marcadores con potencial adecuado para generar códigos, en rojo los genes que no han tenido éxito de amplificación por PCR o bien baja genes en donde no se ha observado diferenciación entre especies y en amarillo aquellos que no se han probado o que han sido poco estudiados).

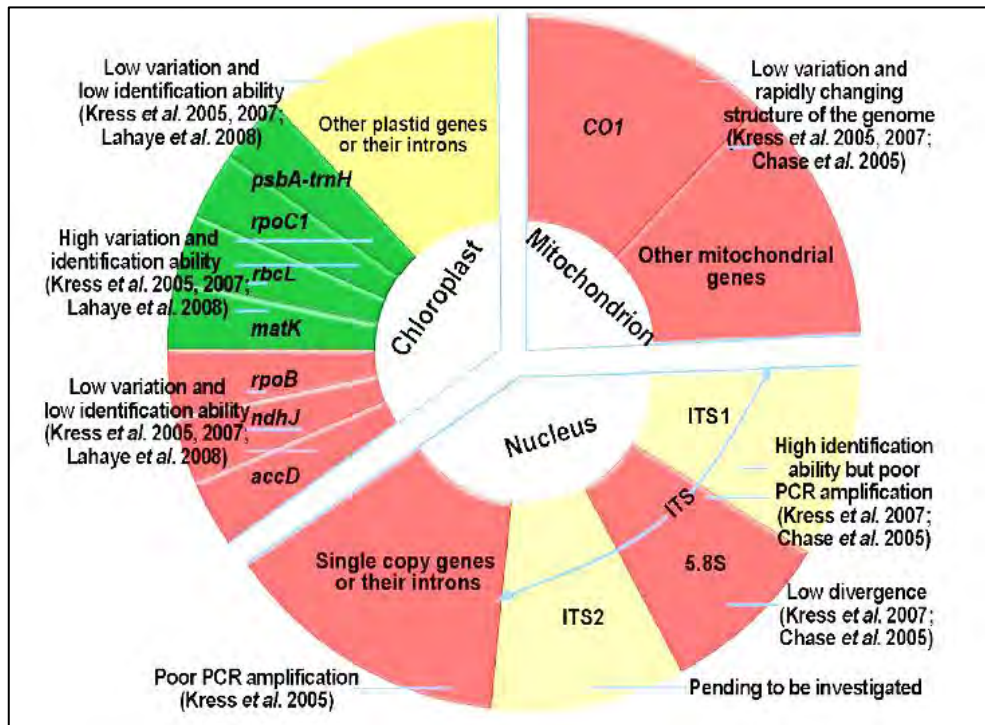


Fig. 19. Genes candidatos para obtención de códigos de barras en plantas. En verde se representan los marcadores más utilizados y de mayor éxito; en rojo los genes de poco o nulo éxito y en amarillo los marcadores con potencial o en fase de prueba (Chen *et al.*, 2010).

En la conferencia internacional de código de barras de la vida de 2009, cuya sede fue el Instituto de Biología de la UNAM, se recomendó a la comunidad investigadora probar otros genes como blancos suplementarios en plantas, entre ellos encontramos a los espaciadores intergénicos de cloroplasto *trnH-psbA* y los espaciadores transcritos internos ITS de DNA nuclear (Tabla 6).

Tabla 6.- Descripción de los genes comúnmente utilizados para la generación de códigos de barras biológicos en plantas.

Gen marcador	Proteína para la cual codifica	Origen	Función	Tamaño de amplicón
<i>rbcL</i>	Subunidad grande de la RUBISCO	Cloroplasto	Enzima involucrada en proceso respiratorio	640 pb
<i>matK</i>	Madurasa de intrones	Cloroplasto	Proteína involucrada en procesamiento de intrones	840 pb
ITS2	Espaciador transcrito Interno	Núcleo	--	538 pb
<i>trnH-psbA</i>	Región espaciadora intergénica	Cloroplasto	--	318-820 pb

La generación de un código de barras involucra cuatro pasos principales:

- Recolección de la muestra. Proveniente del hábitat natural, herbarios, zoológicos, museos, acuarios, muestras congeladas, bancos de semillas, colecciones, y otros materiales biológicos que contengan el DNA de interés.
- Trabajo de laboratorio. Implica la extracción de DNA del material biológico, amplificación por PCR del gen con iniciadores específicos y secuenciación del segmento del gen amplificado.
- Uso de software especializado y bases de datos. Importantes para la obtención del código de barras y para la construcción de bibliotecas digitales.
- Uso de la información y aplicaciones (Kress y Erickson, 2012).

En la Fig. 20 se esquematiza el procedimiento general para la generación de códigos de barras biológicos.

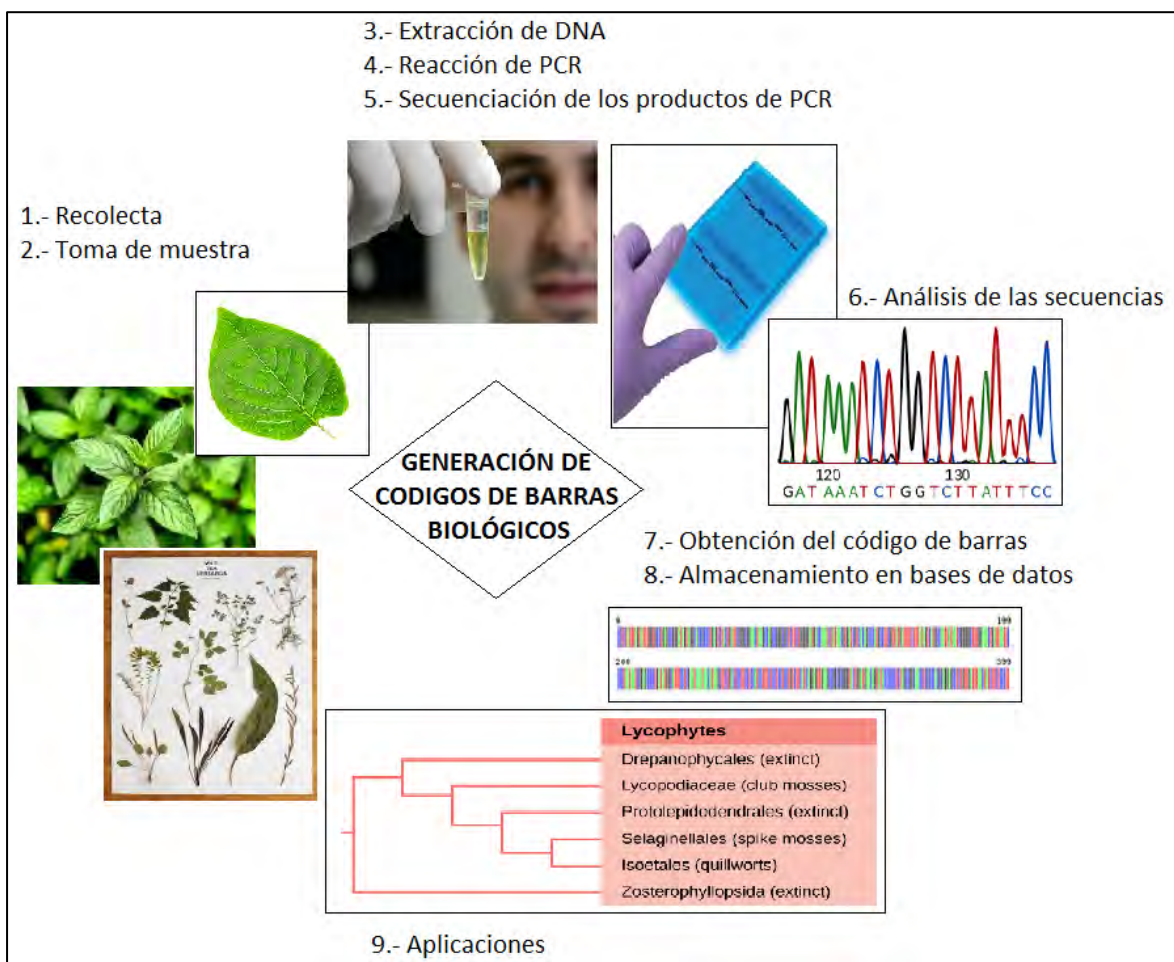


Fig. 20.- Esquema general para la obtención de códigos de barras biológicos.

La base de datos BOLD Systems (Barcode of Life Data Systems) fue creada en el año 2005 por la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá y su objetivo principal es coleccionar la mayor cantidad de códigos de barras genéticos de especies vegetales y animales. La plataforma web

consta de cuatro módulos principales: un portal de datos principal, una base de datos por grupo de especies, un portal educativo para comunidad investigadora y una sección de asesoría para el registro de datos. Actualmente cuenta con un registro de 5 millones y medio de especímenes totales para plantas y de ellos más de 4 millones ya cuentan con códigos de barras. Además de la secuencia génica, también incluye información sobre la morfología, distribución geográfica, punto de muestreo y fotografías de herbario o de su hábitat natural. Igualmente, desglosa el procedimiento requerido para el envío de las secuencias para su publicación en GenBank (Ratnasingham y Hebert, 2007; Casiraghi y col., 2010).

México fue considerado inicialmente como un nodo en vías de desarrollo (con capacidades de recolecta de especímenes únicamente), pero gracias a una comunidad de taxónomos expertos y su interés en el tema, hoy en día ya es considerado nodo regional con capacidades de mantener y generar códigos de barras de las colecciones científicas existentes y soporte a nuevas colectas, fue así que en 2010 surgió la red MexBOL, conformada por el Instituto de Biología de la UNAM, el Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). A raíz de este logro, México se ha colocado a la vanguardia de los estudios modernos en taxonomía y sistemática para el reconocimiento y resguardo de la biodiversidad (MexBOL, 2010).

En relación a este tema, una nota del portal de CONACYT mencionó lo siguiente: “La generación de códigos de barras es una técnica que cada vez ocupa, de manera más importante, parte del nuevo entorno en el que se desarrolla la taxonomía de los seres vivos del siglo XXI. Los códigos de barras, en conjunto con las colecciones científicas, se convertirán en un apoyo significativo para el reconocimiento de la biodiversidad, incluso ayudando al descubrimiento de aquellas especies desconocidas para la ciencia actual.” (CONACYT, 2008). Fue en esta misma época en donde México dedicó mayores esfuerzos en alimentar las bases de datos referentes a códigos de barras.

Códigos de barras y trazabilidad alimentaria

La identificación de materias primas, organismos o algún componente en particular resulta sumamente importante hoy en día para la industria de los alimentos. La trazabilidad alimentaria se define como la capacidad de rastrear un alimento a lo largo de toda su vida útil. Representa una herramienta poderosa en cuestiones de calidad y sanidad ya que involucra la identificación y origen de sus ingredientes y el seguimiento sanitario a lo largo de toda la cadena productiva hasta el punto de venta.

La demanda por parte del consumidor hacia alimentos que inspiren mayor confianza ha fomentado la implementación de nuevas estrategias para su rastreo. Las técnicas de identificación de especies animales o vegetales en alimentos han tomado gran importancia en este ámbito. Los métodos moleculares como detección de proteínas, detección de DNA y detección de marcadores genéticos han generado buenos resultados y con el paso del tiempo se han convertido en metodologías cada vez más accesibles (Bottero y Dalmaso, 2011).

La técnica de PCR en tiempo real es una técnica molecular basada en la detección de segmentos multiplicados o amplificados de DNA utilizando secuencias iniciadoras específicas para replicar un gen deseado. La replicación sucesiva de cadenas iguales al DNA de interés permite revelar con ayuda de compuestos fluorescentes la presencia o ausencia del espécimen buscado. Dicha técnica ha tenido mucho éxito en la identificación de especies animales en productos cárnicos o detección de especies vegetales como maíz, soya, trigo, variedades transgénicas, entre otros (Fig. 21).

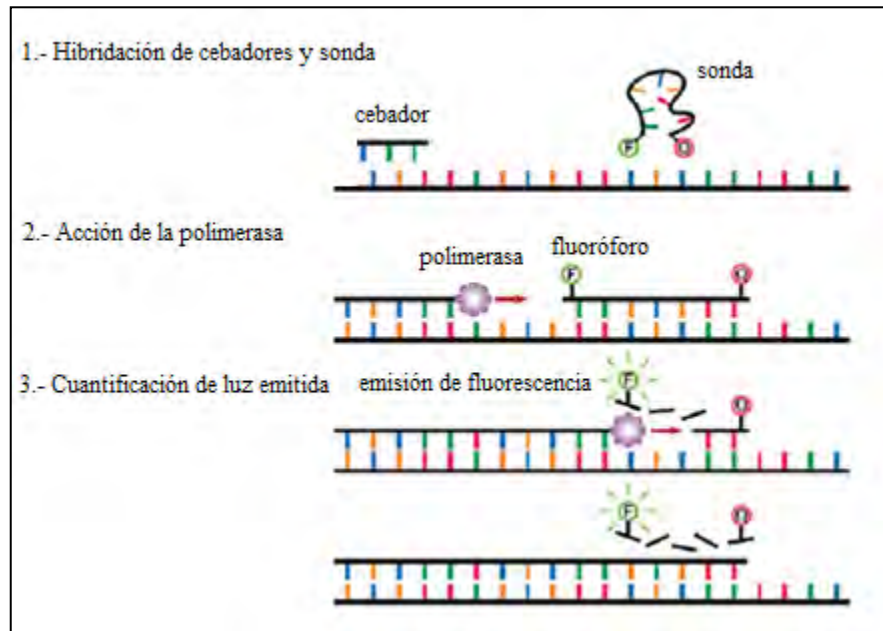


Figura 21. La técnica de PCR en tiempo real con la química de Taqman® consiste en replicar cadenas de DNA utilizando primeramente cebadores específicos que permitan la síntesis de la hebra complementaria por acción de una polimerasa; y en segundo término, la participación de una sonda complementaria marcada con un fluoróforo; cuando la polimerasa llega al sitio de unión de la sonda, el fluoróforo se libera emitiendo fluorescencia. La cantidad de fluorescencia estará determinada por la cantidad de hebras molde en proceso de síntesis; por ello, a mayor número de ciclos de replicación mayor será la fluorescencia registrada por el equipo lector. Si el gen a buscar no se encuentra en la muestra analizada, ni los cebadores ni la sonda encuentran un sitio de unión, la polimerasa no actuará y por tanto no se emitirá fluorescencia (Thermofisher scientific, 2017).

La generación de códigos de barras moleculares recientemente ha sido utilizada tanto para avalar origen y calidad de materias primas así como para detectar posibles adulteraciones a lo largo de la cadena de producción. Indudablemente, la eficiencia en la resolución para diferenciar entre taxones dependerá de las características inherentes del organismo que se esté rastreando. Así, un alto polimorfismo (común entre taxones lejanos) será más fácil de distinguir y viceversa (Galimberti *et al*, 2013). Contar con secuencias de referencia confiables se convierte en una necesidad al momento de considerar utilizar esta técnica como herramienta en trazabilidad alimentaria.

Aplicaciones filogenéticas y códigos de barras.

Entre las aplicaciones que se ha dado a los códigos de barras biológicos en plantas se encuentra resolver cuestiones ecológicas y evolutivas fundamentales como por ejemplo diferenciar especies nativas de invasoras, encontrar especies relacionadas que compartan propiedades medicinales o bien elucidar las relaciones filogenéticas entre comunidades (Kress y Erickson, 2012).

El principio filogenético se basa en tres aspectos básicos (Wiley, 2011):

- La vida ha surgido sólo una vez y por ello todos los organismos tienen algún ancestro común.
- En algún momento hubo un patrón de diversificación (cladogénesis) que se puede representar como bifurcaciones sucesivas e irreversibles en los linajes.
- Las características de los organismos cambian con el tiempo (proceso evolutivo).

Los datos generados a partir de diferentes técnicas y software especializados se utilizan para desarrollar hipótesis que finalmente permitan clasificar un organismo o especie en función de sus características, para ello se hace uso de árboles filogenéticos (Wiley, 2011), (Fig. 22).

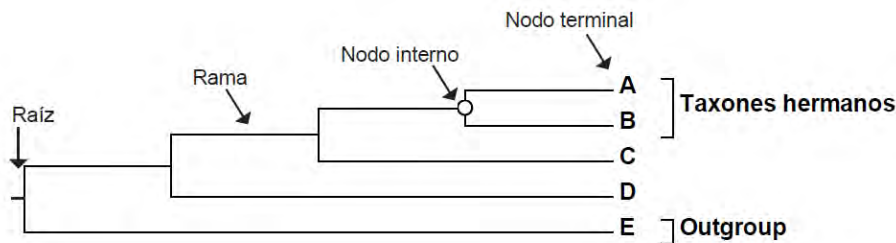


Fig. 22. Esquema general de un árbol filogenético rectangular. En este caso, A y B se encuentran emparentados más cercanamente al taxón C que al D, ya que comparten tres ancestros (o nodos internos), mientras que con D comparten solo dos. Es importante notar que, tanto C, como A y B se encuentran igualmente emparentados a D. Finalmente el taxón E es el que tiene menos parentesco con el resto de los taxones.

La construcción de árboles filogenéticos (diagramas que trazan relaciones evolutivas) se utilizan para organizar diversos conjuntos de información comparativa. Si un grupo de organismos comparten un ancestro común, el grupo se conoce como monofilético. Si todos los miembros de un grupo no evolucionan a partir de un ancestro común, el grupo se conoce como polifilético (Wiley, 2011).

Por un lado, se encuentran los nodos terminales o puntas, que representan las unidades taxonómicas operativas (OTUS) o taxones. Los OTUS pueden ser individuos de una misma especie o grupos taxonómicos mayores. Cada uno de estos nodos terminales se encuentran unidos mediante ramas a un mismo punto (nodo interno), el cual representa al ancestro común entre los nodos terminales. Los nodos terminales representan el presente, mientras que los nodos internos representan el pasado. Al taxón menos emparentado, se le denomina “outgroup”. Los outgroups sirven para indicar el comienzo del proceso de ramificación, señalando así el nodo

más interno compartido por todos, la raíz. Por definición, mientras más ancestros comunes compartan dos taxones en exclusión de otros, éstos se encuentran más cercanamente emparentados (Mendoza, 2012).

Para la construcción de un árbol filogenético se requiere:

- Asegurar que se están comparando secuencias homólogas.
- Seleccionar los marcadores moleculares a probar.
- Realizar un alineamiento múltiple de secuencias (AMS). Este paso consiste en definir cuáles serán las secuencias involucradas, si tienen el grado de diversidad adecuado y si son ortólogas (cuando la divergencia ocurre tras un evento de especiación) o parálogas (cuando la divergencia ocurre tras un evento de duplicación génica).
- Seleccionar un modelo evolutivo que explique las diferencias observadas.
- Determinar un método para la construcción del árbol.
- Verificar la fiabilidad del árbol construido con ayuda de un soporte estadístico (Mendoza, 2012).

Para construir el árbol filogenético, en vez de cuantificar el grado de similitud, se cuantifican las diferencias (Mendoza, 2012). Los principales modelos empleados para la construcción de filogenias son:

Matriz de distancias: Calcula distancias por comparación binaria de las secuencias alineadas (UPGMA).

Máxima parsimonia: Tiene en cuenta modelos evolutivos, como por ejemplo que la preservación es más probable que el cambio.

Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood): Busca el modelo evolutivo que tiene más probabilidad de haber producido los datos observados.

El método de Máxima Verosimilitud es uno de los más utilizados y su principio radica en tratar de encontrar un árbol que explique las relaciones entre las diferentes secuencias con la mayor probabilidad. Para esto, utiliza un modelo evolutivo y cambiando sus parámetros, por ejemplo modificando la topología (el orden de las ramas), la longitud de las ramas e incluyendo diferentes probabilidades de sustituciones, encuentra la mayor verosimilitud para un árbol dado. Luego, lo altera (por ejemplo moviendo una rama y colocándola en otro sitio), y vuelve a modificar sus parámetros hasta encontrar un árbol que no se pueda modificar o aumentar su similitud, es decir hasta haber encontrado un árbol con la máxima verosimilitud (Mendoza, 2012).

Los árboles pueden representarse de distintas maneras siempre y cuando se respete la topología. Así, podemos encontrar árboles rectangulares, rectos, circulares o curvados (Fig. 23).

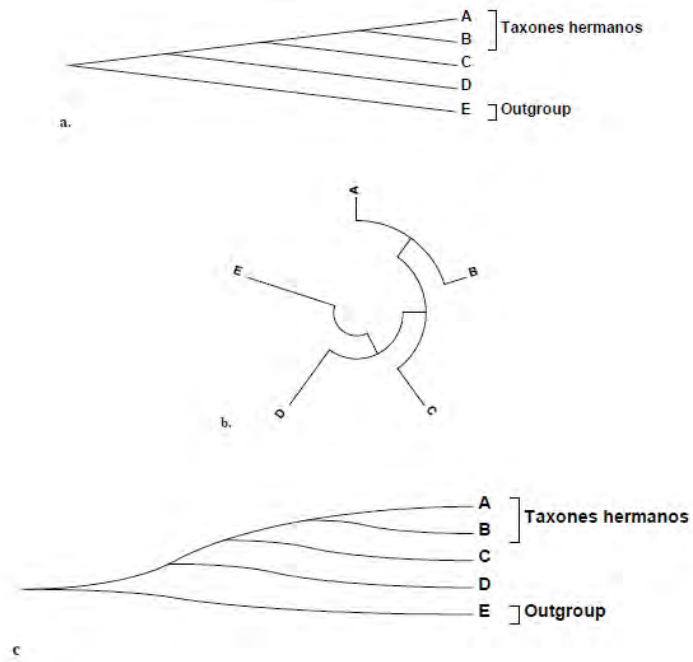


Fig. 23. Distintas representaciones para un mismo grupo de taxones. a) árbol filogenético recto. b) árbol filogenético circular. c) árbol filogenético curvado (Mendoza, 2012).

JUSTIFICACIÓN

La generación de códigos de barras biológicos en plantas ha tomado gran importancia en los últimos años y se visualiza como una herramienta molecular útil para la identificación de especies vegetales. La obtención de códigos de barras biológicos de chaya, chepil y alache representará una fuente de información importante para acciones relacionadas con trazabilidad alimentaria y contribuirá con el enriquecimiento de la base de datos de códigos de barras de la vida (BOLD). Así mismo la detección de dichos quelites a través del análisis del DNA representará una fuente de información adicional para acciones posteriores de conservación de la agrobiodiversidad a largo plazo.

OBJETIVO GENERAL

- Generar códigos de barras genéticos para chaya (*Cnidocolus aconitifolius*), chepil (*Crotalaria longirostrata*) y alache (*Anoda cristata*) mediante la identificación de genes marcadores (*rbcl*, *matK*, *ITS2* y *trnH-psbA*) y evaluar su uso en la identificación de quelites como ingredientes y en alimentos procesados.

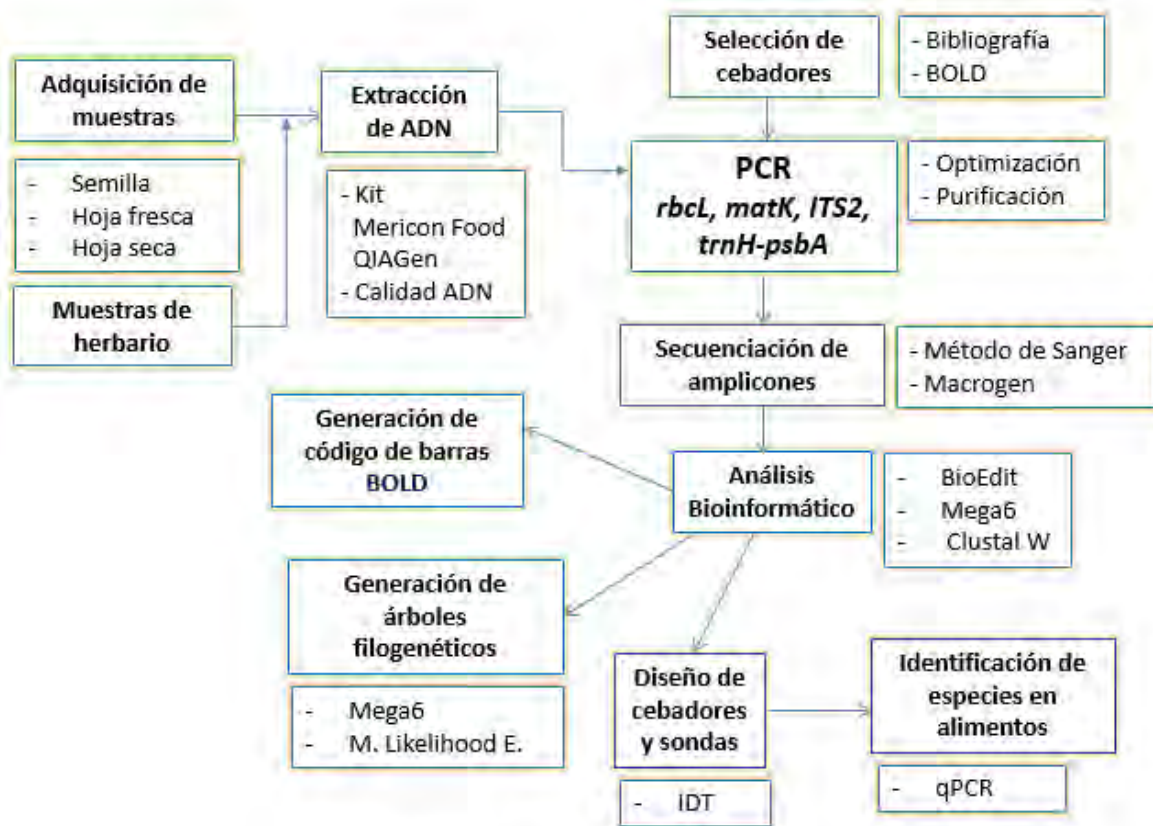
OBJETIVOS PARTICULARES

- Aportar información taxonómica y secuencias génicas de nuevos especímenes a la base de datos BOLD.
- Estandarizar un protocolo para detección de chaya, chepil y alache por qPCR.
- Evaluar el uso de códigos de barras y la técnica de qPCR como herramientas de apoyo en trazabilidad alimentaria.
- Elaborar arboles filogenéticos para esquematizar relación filogenética con otras especies de la misma familia botánica.

HIPÓTESIS

La obtención de códigos de barras biológicos, y un diseño adecuado de cebadores y sondas para qPCR, permitirán identificar chaya, chepil y alache de manera inequívoca como materia prima y como ingrediente en un alimento.

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

1.- Muestras, recolección y conservación.

Las tres especies seleccionadas en el proyecto CONACYT 214286, ya mencionadas: Chaya (*Cnidocolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst), Chepil (*Crotalaria longirostrata* Hook. & Arn) y Alache (*Anoda cristata* (L.) Schldl), fueron colectadas en las zonas sugeridas, con base en sus hábitats, por expertos del Instituto de Biología de la UNAM: Edelmira Linares y Robert Bye, colaboradores del proyecto. Alaches se colectaron en la región de Los Volcanes, cerca de Ozumba. Chaya en las afueras de Mérida y Chepil en los alrededores de la Cd. de Oaxaca (Ver más detalles en la Tabla 8).

También se eligieron plantas y/o semillas de distintas zonas de procedencia, recolectando la información geográfica posible sobre la muestra (Fotografías en Anexo 1).

Como referencias, se solicitó una muestra de tejido vegetal de al menos un espécimen de cada especie al herbario nacional MEXU del instituto de Biología de la UNAM (Tabla 7), (Fotografías en Anexo 1).

Las muestras frescas adquiridas se conservaron entre papel absorbente o papel periódico y dentro de un desecador hasta su análisis. Las semillas, en el caso del chepil, se dejaron germinar en una caja Petri sobre papel filtro humedecido con agua hasta la obtención de plántulas. Las muestras secas únicamente se colocaron dentro de una bolsa de plástico con papel secante.

Tabla 7. Muestras de herbario utilizadas como referencia.

Especimen	Lugar de recolecta	Tipo de tejido	Fuente y N° de Voucher
<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Chiapas, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1319093
<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Yucatán, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 622637
<i>Cnidoscolus chayamansa</i>	Campeche, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1181763
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	Yoro, Honduras	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1385823
<i>Crotalaria longirostrata</i>	Oaxaca, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1225407
<i>Crotalaria longirostrata</i>	Chiapas, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 938199
<i>Anoda cristata</i>	Puebla, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1201148
<i>Anoda cristata</i>	Puebla, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 867671
Muestras usadas como control negativo para los análisis de qPCR	Lugar de recolecta	Tipo de tejido	Fuente y N° de Voucher
<i>Crotalaria pumila</i>	Morelos, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 619987
<i>Indigofera thibaudiana</i> DC.	Oaxaca, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1415732
<i>Desmodium konzattii</i> G.	Oaxaca, Mexico	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1066630
<i>Phaseolus leptostachyus</i> B.	Morelos, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 996788
<i>Cnidoscolus multilobus</i>	Oaxaca, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1257839
<i>Acalypha arvensis</i>	Campeche, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1300970
<i>Euphorbia pulcherrima</i> W. y K.	Chiapas, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1197356
<i>Malvastrum coromandelianum</i>	Campeche, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1324807
<i>Gossypiumhirsutum</i> L.	Michoacán, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1205889
<i>Sida cordifolia</i>	Oaxaca, México	Hoja seca	Inst. Biología, Herbario MEXU 1314184

Tabla 8. Muestras conseguidas en recolectas o puntos de venta.

Muestra	Lugar de recolecta	Origen	Tejido analizado	Georreferencia	Responsable
Chaya	Yucatán, México	Recolecta	Hoja fresca		Dr. Augusto González
Chaya	Central de Abasto D. F.	Punto de venta	Hoja fresca		Q.A. Cindy Estrada
Chaya	San Pedro Chimay, Yucatán	Recolecta	Hoja seca		Dra. Amanda Gálvez
Chaya	San Pedro Chimay, Yucatán	Receta	Tamal		Dra. Patricia Severiano
Chaya	Timicuy, Yucatán	Recolecta	Hoja seca		Dra. Amanda Gálvez
Chaya	Timicuy, Yucatán	Receta	Tamal		Dra. Patricia Severiano
Chepil	Chiapas	Punto de venta	Hoja seca		Q.A. Cindy Estrada
Chepil	Ozumba, Edo. de México	Punto de venta	Semilla		Dra. Edelmira Linares
Chepil	Central de Abasto D.F.	Punto de venta	Hoja seca		Q.A. Cindy Estrada
Chepil	Oaxaca, Ocotlán de Mor.	Recolecta	Hoja fresca		Dra. Amanda Gálvez
Chepil	Oaxaca, Ocotlán de Mor.	Receta	Arroz con chepil		Dra. Patricia Severiano
Chepil silvestre*	Ocotlán de Morelos, Oax.	Recolecta	Hoja seca	16°48'30.712'' N y 96°40'21.34''W	Magali Martínez
Chepil silvestre*	Ocotlán de Morelos, Oax.	Receta	Tamal		Dra. Patricia Severiano
Chepil cultivado*	Ocotlán de Morelos, Oax.	Recolecta	Hoja seca	16°48'48.481'' N y 96°40'25.24''W	Magali Martínez
Chepil cultivado*	Ocotlán de Morelos, Oax.	Receta	Tamal		Dra. Patricia Severiano
Alache	Yanhuitlán, Oaxaca	Recolecta	Hoja fresca		Q.A. Cindy Estrada
Alache(1)	Ozumba, Edo. de México	Recolecta	Hoja fresca	Nº MEXU 1,445,645	Dra. Edelmira Linares Dr. Robert Bye
Alache(2)	Ozumba, Edo. de Méx.	Recolecta	Hoja fresca		Dra. Amanda Gálvez
Alache(3)	Ozumba, Edo. de México	Recolecta	Hoja fresca		Dra. Amanda Gálvez
Alache(1) cocinado	Ozumba, Edo. de México	Receta	Alaches caldosos		Dra. Amanda Gálvez
Alache(2) cocinado	Ozumba, Edo. de México	Receta	Alaches caldosos		Dra. Amanda Gálvez
Alache(3) cocinado	Ozumba, Edo. de México	Receta	Alaches caldosos		Dra. Amanda Gálvez

*Después de la caracterización se descubrió que esta planta en realidad se trataba de la especie *Crotalaria pumila* y no de *Crotalaria longirostrata* como se creía en un principio.

2.- Extracción de DNA

Como procedimiento inicial, las muestras secas o de herbario fueron molidas en mortero mientras que las muestras frescas o en fase embrionaria fueron congeladas con nitrógeno líquido y maceradas en mortero.

Se pesaron 200mg de tejido fresco o 50mg de tejido seco y se continuó con el procedimiento de extracción de DNA indicado por el kit de extracción de DNA de Mericon Food QIAGEN (Lisis con CTAB y purificación por adsorción en columnas de sílica).

Se determinó la concentración de DNA extraído, así como el coeficiente de pureza A260/A280 [Equipo espectrofotométrico Epoch Biotek].

Las muestras de DNA se conservaron en buffer TE en congelación a -20°C hasta su análisis.

3.- Selección de cebadores

En el procedimiento para generar códigos de barras del portal BOLD se sugiere utilizar cebadores específicos ya registrados en su sistema para la amplificación de los genes *matK*, *rbcl*, *ITS2* y *trnH-psbA* (o bien se tiene la opción de sugerir nuevos pares con aprobación previa de BOLD). De acuerdo a las secuencias publicadas en el portal, bibliografía consultada (Kress, 2010 y Jeanson, 2011) y a la sugerencia de la Dra. Lidia Cabrera (Instituto de Biología UNAM y representante del nodo MexBOL en México), se seleccionaron las siguientes secuencias de cebadores para amplificación de los genes marcadores:

Tabla 9. Cebadores empleados para detección de genes marcadores por PCR*

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Tm	Referencia
<i>rbcl</i> -F (directo)	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	56.4	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>rbcl</i> Lajf634 (reverso)	GAA ACG GTC TCT CCA ACG CAT	54.4	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>matK</i> -KIM1R (directo)	ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC	59.7	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>matK</i> -KIM3F (reverso)	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G	54.4	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>ITS</i> -S2 F (directo)	ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT	47.7	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>ITS</i> 2 (reverso)	GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT	52.4	Jeanson 2011
<i>trnH-psbA</i> (directo)	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	51.1	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>trnH-psbA</i> (reverso)	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	58.8	Kress y Erickson, 2012; Jeanson 2011
<i>matK</i> -390f (forward)	CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C	45.5	Kress y Erickson, 2012
<i>matK</i> 1326r (reverse)	TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T	53.0	Kress y Erickson, 2012
<i>AB101</i> (<i>ITS</i>) (forward)	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G	61.4	Kress y Erickson, 2012
<i>AB102</i> (<i>ITS</i>) (reverse)	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C	64.3	Kress y Erickson, 2012

*Secuencias ya establecidas en el portal BOLD para la obtención de códigos de barras en plantas.

4.- Reacciones de PCR

Una vez seleccionados los cebadores específicos para la amplificación de los genes marcadores se realizaron ensayos de PCR bajo las siguientes condiciones:

a) Master mix

Condiciones sugeridas por la marca Thermo Fisher Scientific para el uso de la enzima *Pfu* polimerasa:

Componente	Marca	Concentración final
Buffer 10X	Thermo Fisher Scientific	1 X
MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific	2.0 mM
dNTPs	Invitrogen	0.2 mM
Cebador F	IDT	0.3 μM
Cebador R	IDT	0.3 μM
<i>Pfu</i> Polimerasa	Thermo Fisher Scientific	1 U
DNA Total		100 ng
Agua grado biología molecular	MoBio	Cbp 50 μL
Vol. de reacción		50 μL

b) Condiciones de ciclado

Condiciones de ciclado para <i>rbcL</i> (Kress y Erickson, 2012)		
Inicio	4 min.	94°C
35 ciclos		
	30 s.	94°C
	30 s.	55°C
	1 min.	72°C
Final	10 min.	72°C

Condiciones de ciclado para <i>matK</i> (Kress y Erickson, 2012)		
Inicio	1 min.	94°C
35 ciclos		
	30 s.	94°C
	20 s.	52°C
	50 s.	72°C
Final	5 min.	72°C

Condiciones de ciclado para ITS2 (M.L. Jeanson, 2011)		
Inicio	3 min.	94°C
35 ciclos		
	30 s.	95°C
	30 s.	56°C
	30 s.	72°C
Final	7 min.	72°C

Condiciones de ciclado, <i>trnH-psbA</i> . (M.L. Jeanson 2011)		
Inicio	2 min. 30 s	95°C
35 ciclos		
	30 s.	95°C
	30 s.	58°C
	60 s.	64°C
Final	7 min.	72°C

[Termociclador Veriti96 Applied Biosystems y Termociclador Techgene TC – 312]

5.- Visualización de los productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa [Invitrogen] al 1% y bromuro de etidio [Sigma-Aldrich] (0.5µg/mL) cargando en cada pozo 2µL de solución de carga [Buffer 6X Thermo Fisher Scientific] más 8µL de producto de PCR, la electroforesis se realizó en buffer TAE 1X [Thermo Fisher Scientific] a 90V (30 min). Con ayuda de un marcador de peso de DNA [GeneRuler 1Kb Thermo Fisher Scientific] y un fotodocumentador [Gel Doc BioRad] se detectaron las bandas esperadas para los tres casos: a 846-852 pb para *matK*, a 654 pb para *rbcL*, 538 pb para *ITS2* y 318-820pb para *trnH-psbA*.

6.- Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR elegidos fueron purificados utilizando el kit de purificación QIAQuick [QIAGEN] y se ajustaron a una concentración final de 20 ng/µL.

La secuenciación se realizó en ambos sentidos por la empresa coreana Macrogen Inc., utilizando el método de Sanger, con el Dye terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems) y un secuenciador ABI 3700 (Applied Biosystems).

7.- Análisis de las secuencias y Generación de árboles filogenéticos

Los resultados de secuenciación recibidos de Macrogen Inc. fueron analizados con los programas BLAST, BioEdit Sequence Alignment Editor, CLUSTAL W y MEGA 6.0. La obtención de árboles filogenéticos se realizó utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud por el modelo de MEGA 6.0 comparando las secuencias obtenidas contra secuencias de la misma familia botánica localizadas en el portal GenBank de la NCBI.

8.- Captura de información en la base de datos BOLD.

De acuerdo con las especificaciones señaladas por la base de datos BOLD, los datos obtenidos de la secuenciación y la información proporcionada por el herbario MEXU se llenaron los formatos correspondientes y se generó el proyecto de código de barras para quelites denominado: Quelites UNAM lab312 FQAGM . Se tuvo especial cuidado en revisar la dirección de las secuencias obtenidas por los análisis de secuenciación así como de seleccionar sólo aquellas con una calidad de secuenciación adecuada.

9.- Diseño de cebadores y sonda para detección de los genes marcadores en alimentos por qPCR.

Partiendo de las secuencias de especímenes de herbario y a fin de tener mayor especificidad para la selección de primers y sondas, se realizaron alineamientos entre las secuencias *rbcL* o *matK* de los quelites contra secuencias de otras plantas comestibles y posibles ingredientes de origen vegetal que pudiesen encontrarse en platillos preparados (obtenidas en la base de datos de Genbank). El diseño de cebadores y sondas se realizó con la herramienta de optimización de Integrated DNA Technologies (IDT, 2015), compañía donde fueron sintetizados los oligonucleótidos y sondas (Tabla 10).

Tabla 10. Cebadores y sondas diseñadas para pruebas de qPCR

Nombre	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)
CL mat F (directo)	GGTCTCAACCAGAAATGATCCAA	55.0
CL mat R (reverso)	TTGACTCCGTATCGCTGAAAG	54.7
CL mat sonda	FAM/AGGTTAAAT/ZEN/GAATGCTCGGAGAATTGGC/3IABkFQ	59.4
CC rib F (directo)	GAATCCCTCCTGCTTATTCTAAAAC	53.6
CC rib R (reverse)	GTACAACCTAATAGGGGGCGA	56.1
CC rib sonda	FAM/CCACCTCAT/ZEN/GGCATCCAAGTTGAGA/3IABkFQ	60.9
AC rib F (directo)	AGAAGATCTGCGAATCCCTATTTTC	54.5
AC rib R (reverso)	CATCCTAATAGGGGGCGAC	54.7
AC rib sonda	FAM/CCTCATGGC/ZEN/ATCCAGGTTGAAAGAGA/3IABkFQ	60.5

Nota: CC= *Cnidocolus chayamansa* AC= *Anoda cristata* CL= *Crotalaria longirostrata*

10.- Selección de alimentos preparados y pruebas de qPCR para detección de los quelites en estudio.

- Los alimentos evaluados fueron elaborados por el laboratorio de Análisis Sensorial de la Facultad de Química (Apéndice A).
- Extracción de DNA por la técnica de lisis con CTAB y purificación por afinidad en columnas de sílica (Apéndice B).
- Pruebas de PCR en tiempo real

Master mix para reacciones de PCR en tiempo real

Reactivo	Concentración final
Master mix TaqMan®	1X
Cebador F	300 nM
Cebador R	300 nM
Sonda FAM	180 nM
DNA	100 ng
Volumen final : 20 µL	

Condiciones de ciclado para reacciones de PCR en tiempo real

No. de Ciclos	Condiciones
1 ciclo	50°C, 2 min
1 ciclo	95°C, 10 min
45 ciclos	95°C, 15 s y 60 °C , 1 min

[Equipo de qPCR ABI 7500 y 7500 Fast System Software]

RESULTADOS

a) Resultados de PCR en punto final y selección de las mejores secuencias para la generación de códigos de barras.

Proceso de extracción de DNA de las muestras

Si bien el kit utilizado para la extracción de ácidos nucleicos (lisis con CTAB y purificación por adsorción en columnas de sílica) permitió obtener DNA de calidad amplificable partiendo de hoja fresca o de hoja seca, el proceso de extracción no fue igual para todos. De los tres quelites evaluados, la chaya fue la matriz en donde resultó más eficiente la extracción, obteniéndose altos rendimientos (Aproximadamente 13µg de DNA por cada 200 mg de hoja fresca). Por otro lado el chepil y el alache representaron matrices complejas de manejar debido a la alta viscosidad generada por la presencia de mucílago durante el paso de lisis celular. Para estos casos fue mejor partir de cantidades menores de muestra (50 mg de tejido seco) a fin de obtener mejores resultados en cantidad y pureza.

En alimentos preparados, se obtuvieron buenos resultados de extracción de DNA de chaya cuando se realizaron extracciones de tamal, sin embargo para alaches cocinados en caldo y chepil extraído de tamal se obtuvieron bajos rendimientos:

Tabla 11. Concentraciones obtenidas después del proceso de extracción de DNA partiendo de matrices alimenticias

Muestra	Concentración de DNA [ng/uL]	Índice 260/280
200 mg de Chaya cocinada (tamal)	52.24 ± 0.03*	1.99 ± 0.06*
200 mg de Alache cocinado (caldo de alaches)	17.62 ± 0.20*	2.04 ± 0.04*
200 mg de Chepil cocinado (tamal)	15.66 ± 0.35*	1.95 ± 0.15*

*Promedio de cuatro réplicas

En la Tabla 12 se desglosan los resultados de amplificación de los tres marcadores evaluados con reacciones de PCR punto final tanto para las muestras de herbario, como para las muestras recolectadas en distintos puntos de venta. Como puede observarse, el marcador con el que se obtuvieron mejores resultados de amplificación fue con *rbcL*, mientras que con *matK* hubo problemas de amplificación para chaya y alache. Finalmente, con *ITS2* se detectaron deficiencias en intensidad de los amplicones en las tres especies y con *trnH-psbA* se observaron problemas de inespecificidad en la mayoría de los casos. Los resultados de amplificación negativos se atribuyen, principalmente, a diferencias de Tm en los iniciadores o posible degradación del DNA molde en algunas de las muestras provenientes de colecciones de herbario.

Tabla 12. Resultados de amplificación para los marcadores *rbcL*, *matK* e ITS2 en muestras de herbario, muestras colectadas y alimentos cocinados.

MUESTRAS DE HERBARIO						
MUESTRA	LUGAR DE ORIGEN	TIPO DE TEJIDO	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2	<i>trnH-psbA</i>
Chaya <i>Cnidocolus chayamansa</i>	Chiapas	Hoja seca	+ ^a	+ ^a	+ ^a	+ tenue
Chaya <i>Cnidocolus chayamansa</i>	Yucatán	Hoja seca	+ ^a	-	-	-
Chaya <i>Cnidocolus chayamansa</i>	Campeche	Hoja seca	+ ^a	+ ^a	+ ^a	nd
Chaya <i>Cnidocolus aconitifolius</i>	Honduras	Hoja seca	+ ^a	-	+ ^a tenue	+ doble banda
Chepil <i>Crotalaria longirostrata</i>	Oaxaca	Hoja seca	-	-	-	-
Chepil <i>Crotalaria longirostrata</i>	Chiapas	Hoja seca	+ ^a	+ ^a	-	nd
Alache <i>Anoda cristata</i>	Puebla No. 1201148	Hoja seca	+ ^a	+ Tenue	+ tenue	+ tenue
Alache <i>Anoda cristata</i>	Puebla No. 867671	Hoja seca	+ ^b	-	-	+ tres bandas
nd - no determinada ^a - secuencia de calidad aceptable y enviada a BOLD ^b - se mandó secuenciar pero no se obtuvo buena calidad en el electroferograma Ver imágenes de los productos de amplificación por PCR en Anexo 2						
MUESTRAS DE RECOLECTA O DE PUNTOS DE VENTA						
MUESTRA	LUGAR DE ORIGEN	TIPO DE TEJIDO	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	ITS2	<i>trnH-psbA</i>
Chaya	Yucatán	Hoja fresca	+	-	+ tenue	nd
Chaya	Central de Abasto D.F.	Hoja fresca	+	-	+ tenue	nd
Chaya	San Pedro Chimay, Yucatán	Hoja seca	+	-	Nd	nd
Chaya	Timicuy, Yucatán	Hoja seca	+	-	Nd	nd
Chepil	Chiapas	Hoja seca	+	+ Tenue	+ tenue	nd
Chepil	Edo. de México	Semilla	+	+ Tenue	-	nd
Chepil	Central de Abasto D.F.	Hoja seca	+	-	+ tenue	nd
Chepil	Oaxaca	Hoja fresca	+	+ Tenue	+	nd
Chepil silvestre	Ocotlán de Morelos, Oaxaca	Hoja seca	-	-	Nd	nd
Chepil cultivado	Ocotlán de	Hoja seca	-	-	Nd	nd

	Morelos, Oaxaca					
Alache (Violeta)	Oaxaca	Hoja fresca	+	-	+ tenue	nd
Alache (1)	Ozumba, Edo. de México	Hoja fresca	+	-	-	nd
Alache (2)	Ozumba, Edo. de México	Hoja fresca	+	-	+	nd
Alache (3)	Ozumba, Edo. de México	Hoja fresca	+	-	+ tenue	nd
nd - no determinada ^a - secuencia de calidad aceptable y enviada a BOLD ^b - se mandó secuenciar pero no se obtuvo buena calidad en el electroferograma Ver imágenes de los productos de amplificación por PCR en Anexo 2						
MUESTRAS COCINADAS EN PLATILLOS TRADICIONALES						
MUESTRA	LUGAR DE ORIGEN	TIPO DE TEJIDO	<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	<i>ITS2</i>	<i>trnH-psbA</i>
Chaya	San Pedro Chimay, Yucatán	Tamal	+ tenue	-	Nd	nd
Chaya	Timicuy, Yucatán	Tamal	+	-	Nd	nd
Chepil	Oaxaca	Arroz con chepil	+	-	+	nd
Chepil silvestre	Ocotlán de Morelos, Oaxaca	Tamal	-	-	Nd	nd
Chepil cultivado	Ocotlán de Morelos, Oaxaca	Tamal	+ tenue	+ Tenue	Nd	nd
Alache (1) cocinado	Ozumba, Edo. de México	Alaches caldosos	+	-	+ tenue	nd
Alache (2) cocinado	Ozumba, Edo. de México	Alaches caldosos	+ tenue	+	+ tenue	nd
Alache (3) cocinado	Ozumba, Edo. de México	Alaches caldosos	+	-	+ tenue	nd
nd - no determinada ^a - secuencia de calidad aceptable y enviada a BOLD ^b - se mandó secuenciar pero no se obtuvo buena calidad en el electroferograma Ver imágenes de los productos de amplificación por PCR en Anexo 2						

Los resultados descritos en la Tabla 12, permiten afirmar que fue posible amplificar exitosamente el gen *rbcL* en todas las muestras analizadas, incluso en muestras cocinadas puesto que se observó una banda única y definida a ~ 600pb. El espécimen herborizado de *Crotalaria longirostrata* proveniente de Oaxaca, presentó una intensidad de banda menor al resto de las muestras de chepil, esto es atribuido a un mayor grado de deterioro del DNA de la muestra, pues

el color de los segmentos de hoja proporcionados ya presentaba tonalidad ocre lo cual representa degradación de la clorofila y por tanto deterioro de los tejidos. Los resultados de amplificación negativos se atribuyen principalmente a diferencias de T_m en los iniciadores o bien presencia de algún componente en la mezcla de reacción que esté limitando la acción de la polimerasa.

Con respecto al marcador *matK* sólo hubo éxito de amplificación para algunos casos. Se realizaron pruebas modificando la temperatura de alineamiento a 50°C, aumentando la concentración de cloruro de magnesio e incluso se utilizando un segundo juego de cebadores pero tampoco hubo resultados positivos.

En el caso del gen ITS2 hubo éxito de amplificación parcial y algunos problemas de secuenciación, aunque tampoco hubo éxito con un segundo juego de iniciadores.

Con *trnH-psbA* hubo problemas de inespecificidad al realizar las reacciones de PCR pues en algunos casos se observaron dos o incluso tres productos de PCR para una misma muestra. Al no obtener buenos resultados para muestras de herbario se omitió realizar los ensayos de este marcador con los especímenes de campo.

Para aquellas muestras donde se obtuvo la mejor resolución de las bandas, se realizó una purificación de los productos de PCR, para su posterior secuenciación.

b) Base de datos BOLD

Con las secuencias obtenidas de las muestras del Herbario Nacional MEXU, fue posible generar el proyecto de registro para código de barras denominado **FQAGM Quelites UNAM lab 312**.

Para llevarlo a cabo, se realizó el llenado de los formularios solicitados por BOLD y se enviaron las secuencias propuestas para el código de barras así como los archivos de secuenciación originales, fotografías y datos geográficos de colecta de cada espécimen. Una vez aprobada la calidad de las secuencias y la información proporcionada, fue posible visualizar todos estos datos en el portal electrónico.

Hasta el momento, se han registrado 17 códigos de barras, de los cuales, 3 pertenecen a chepil, 12 pertenecen a chaya y 2 pertenecen a alache (Fig. 24). Los números de identificación por espécimen o Process ID asignados por el portal fueron FQAGM001-15, FQAGM002-15, FQAGM003-15, FQAGM004-15, FQAGM005-15 y FQAGM006-15.

Identification	Specimen Page	Sequence Page	Length [Ambig]			Record Flags
			matK	ITS2	rbcl	
<input type="checkbox"/> <i>Anoda cristata</i>	AC7R.F	FQAGM006-15	0	0	584 [0n]	
<input type="checkbox"/> <i>Cnidoscopus aconitifolius</i>	CC3R.F	FQAGM005-15	797 [0n]	555 [1n]	592 [0n]	
<input type="checkbox"/> <i>Cnidoscopus aconitifolius</i>	CC4R.F	FQAGM004-15	0	0	586 [0n]	
<input type="checkbox"/> <i>Cnidoscopus aconitifolius</i>	CC6R.F	FQAGM003-15	0	555 [1n]	621 [0n]	
<input type="checkbox"/> <i>Cnidoscopus aconitifolius</i>	CC5R.F	FQAGM002-15	706 [0n]	582 [0n]	583 [0n]	
<input type="checkbox"/> <i>Crotalaria longirostrata</i>	CL5R.F	FQAGM001-15	706 [0n]	0	580 [0n]	

Fig. 24. Descripción de los 17 nuevos registros de códigos de barras generados en BOLD para el proyecto FQAGM Quelites UNAM lab 312. En la imagen se describe la especie, el nombre del registro, el gen marcador a la cual pertenece el código y la longitud de las secuencias en pb. El símbolo del planeta indica que el espécimen está georeferenciado, la cámara fotográfica marca que se tienen fotografías de la planta y las banderillas indican el número total de códigos por cada espécimen.

En las Figura 25A y 25 B, se muestra una imagen de pantalla de como se visualizan los códigos de barras de un espécimen en el portal BOLD.

IDENTIFIERS

Sample ID: AC7R.F
Process ID: FQAGM006-15
Identification: *Anoda cristata*

rbcl

SEQUENCE DATA

Genbank Accession:
Translation Matrix: Standard Code
Last Updated: 2015-05-08

Clear Sequence Edit Sequence

NUCLEOTIDE SEQUENCE

Sequence: 584 bp

```
AAGAGTAAATGACTTATATAC TCCGGAAATGAGTCAAAGAGACTGATATCTTGG
CAGCCTCCGAGTAAC TCCCAACCCGGAGTTC CGCTGAGGAAGCGGGGCGCGGTAG
CTGC GAATCTTCTAC TGGTACATGGACAACCGTGTGGACCGATGGCTTAC CAGCCTTG
ATCGTTACAAGGGCGATGC TACCACAT TGAACC TTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACAATGTTA
TATGTTATGTAGCTTACCCCTTAGACC TTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACAATGTTA
CTTCAATATGTAGCTTACCCCTTAGACC TTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACAATGTTA
TGGCAATCCCTATTTCTTATGTTAAACCTTTCCAAGGCCCGCCCTCATGGCATCCAGGTTG
AAAGAGATAAATGAAACAAGTATGGTCGCCCTTATAGGATGTACTATTAACCTAAAT
TGGGGTATCCGC TAAGAAC TACGGTAGAGCAGTTATGAAATGTCACGTGGCGGACTTG
ATTTACCAAGATGATGAGAAATGTAAC TCCCAACCTTTATG
```

Composition: A (160), G (134), C (125), T (165)
Ambiguous Characters: 0
Identify Sequence Using: [Full Database](#)

ILLUSTRATIVE BARCODE

SEQUENCING RUNS: Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Quimica

Run Date	Direction	Trace File	Seq Primer	Quality
2015-03-07	Forward	AC7R_PA_Fab1	rbclLa-F	high

PCR Primers: *rbclLa-F/rbclLajf634R*

Sequence Editor View Trace Files Download

ANNOTATION

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

AMINO ACID SEQUENCE

Sequence: 202 residues

```
EYKLYTTPYEVEKEDILAAFRVTPQGPVPEEAGAAVAASSTGTWTTWDTGLTSLD
RVKGRCYHIEPWAGEEAQVICYVAVPLDLFEEGVS1NMF1S1VGVVFGKALRALRELDL
R1P1S1YVKT1FQGP1PHG1Q1VERDKLNKYGRPLLGCT1KPKLGLSAKNYGRVAYEELRGLD
FTKDDENNSQPFM
```

Figura 25(A) Imagen de pantalla del código de barras generado para *Anoda cristata*. En esta sección de la base de datos se visualiza la secuencia completa tanto en nucleótidos como en aminoácidos, la calidad de la secuencia en el electroferograma y la descripción de los cebadores utilizados.

Figura 25(B) Imagen de pantalla del código de barras generado para *Anoda cristata*. En esta sección de la base de datos se visualizan datos geográficos de colecta e imágenes de los especímenes de herbario.

c) Trazabilidad alimentaria

Retomando la información presentada en la Tabla 12, el haber encontrado amplificación por PCR punto final en muestras cocinadas no significa que se esté identificando al quelite en estudio, pues recordemos que *rbcl* y *matK* son genes encontrados en todas las especies vegetales. Para lograr la identificación de especie, se realizaron alineamientos entre las secuencias de herbario contra las secuencias de las muestras de recolecta y también se realizó un diseño de qPCR tomando como referencia positiva las extracciones de DNA de las muestras de herbario.

Diseño de sondas y cebadores para PCR cuantitativa (qPCR)

Una vez conociendo las secuencias de los genes *matK* y *rbcl* de los especímenes de herbario se realizó un diseño de cebadores y sondas para cada una de las especies. El alineamiento de secuencias de las muestras de herbario contra secuencias pertenecientes a plantas del mismo género, plantas comestibles y otros ingredientes, permitió seleccionar las regiones con mayor número de variaciones entre sí y con ello conseguir mayor especificidad para los ensayos de qPCR. De esta forma se procedió a aplicar la técnica de qPCR con la química de TaqMan®.

Las especies comestibles elegidas para comparar diferencias entre sus genes *rbcl* y *matK* fueron: *Portulaca oleracea* (verdolaga), *Medicago sativa* (alfalfa), *Nasturtium officinale* (berro), *Trifolium pratense* (trébol), *Allium cepa* (cebolla), *Allium sativum* (ajo), *Oriza sativa* (arroz), *Zea mays* (maíz), *Piper nigrum* (pimienta) y *Solanum lycopersicum* (jitomate). Los resultados obtenidos para cada especie se desglosan a continuación:

➤ Identificación de chepil (*Crotalaria longirostrata*)

Para el caso de chepil (*Crotalaria longirostrata*), al observarse mayor discriminación entre especies con el gen *matK* que con el gen *rbcL* (Fig. 29 y 30), se eligió considerar una región de 108 pb del primer gen para su seguimiento por qPCR (Fig. 26).

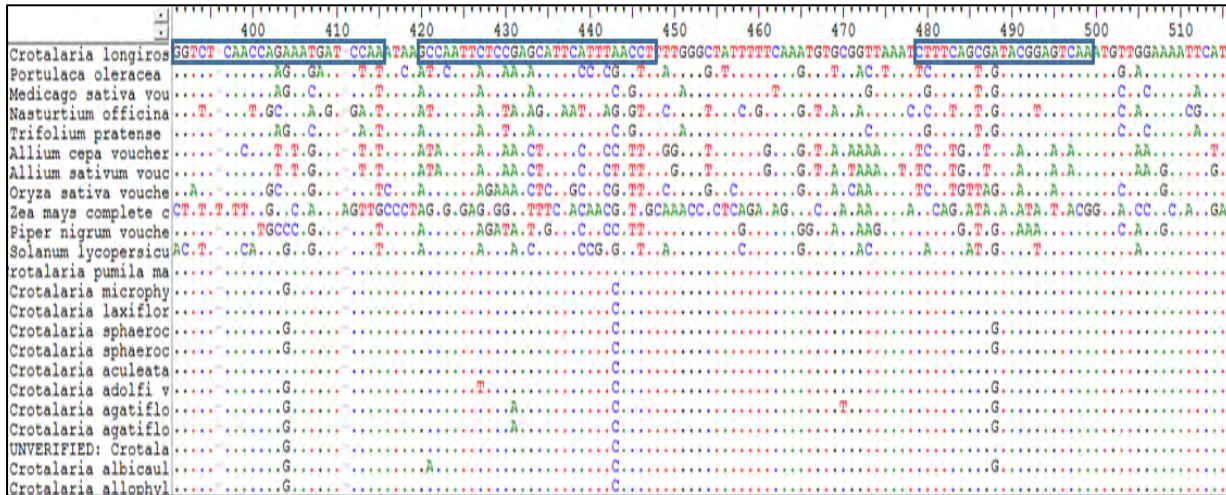


Fig. 26. Alineamiento de la secuencia del gen *matK* de *C. longirostrata* contra secuencias de diferentes plantas comestibles, condimentos y otras especies pertenecientes al género *Crotalaria*. Los puntos de colores indican bases iguales a la referencia de herbario, mientras que las letras representan diferencias. Una región con mayor número de diferencias será la indicada para la hibridación de los cebadores y sonda. Entre mayor sea el número de diferencias, mayor será la especificidad de los cebadores y de la sonda. Dentro de los recuadros se señala las regiones seleccionadas para la síntesis de cebadores (a los extremos) y sonda (en medio).

En los gráficos de amplificación por qPCR (Fig. 27 y 28) se observa una señal clara de emisión de fluorescencia al utilizar como molde el DNA extraído de chepil germinado (Ozumba) y de hoja seca (chepil silvestre y chepil cultivado). Como control negativo se utilizó DNA extraído de alache.

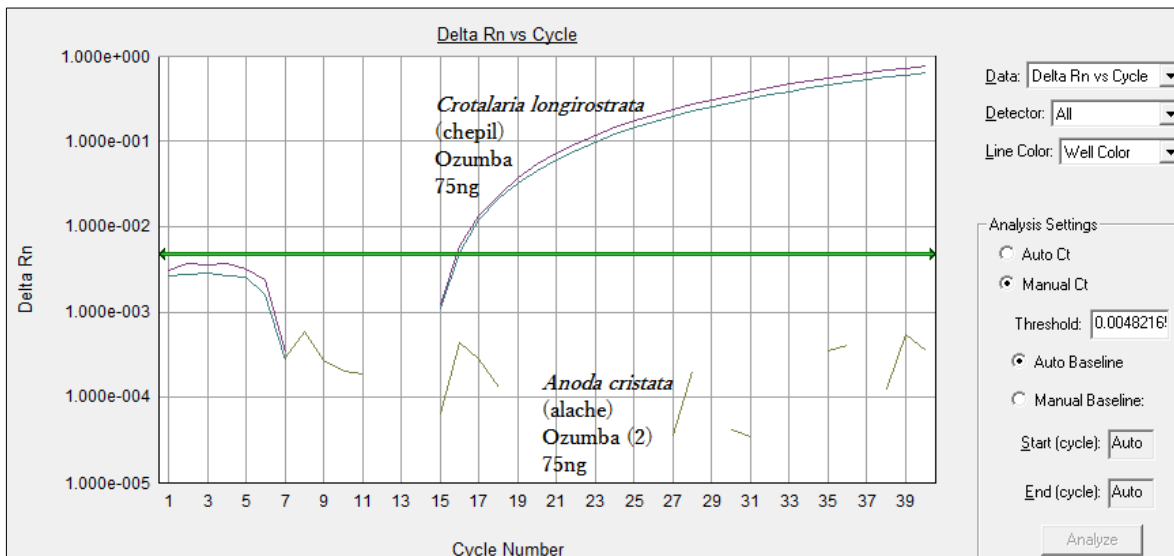


Fig. 27. Amplificación del gen *matK* en una muestra de germinado de chepil. Las curvas características para gráficos de qPCR muestran señal positiva para el control positivo de chepil mientras que para alache no se observa señal de amplificación (resultado esperado para comprobar especificidad de cebadores y sonda).

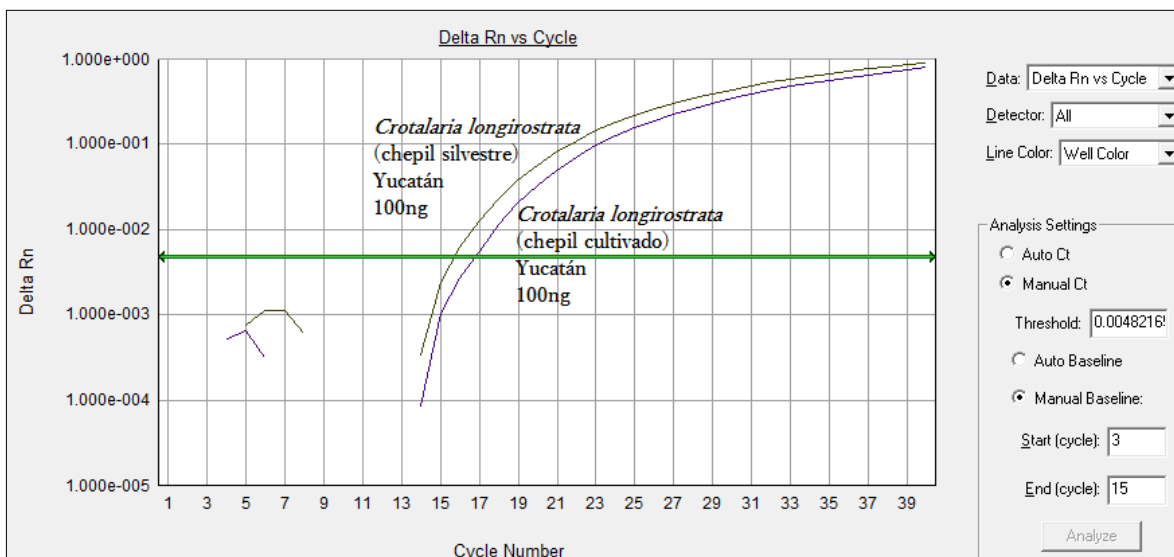


Fig. 28. Amplificación del gen *matK* en muestras de chepil seco. Las curvas muestran similitud de amplificación para la variedad silvestre y para la variedad cultivada.

Como se observa en la Fig. 28, las señales de amplificación entre chepil cultivado y chepil silvestre son muy similares, este resultado era de esperarse ya que los genes *matK* y *rbcL* no presentaron amplia diversidad génica dentro del género *Crotalaria* (Fig 29 y 30).

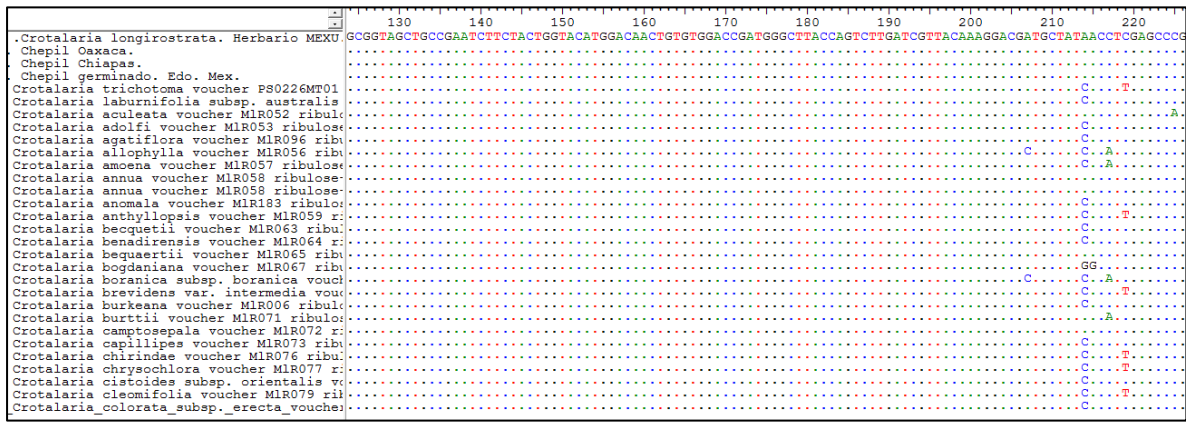


Fig 29. Alineamiento del gen *rbcL* entre diversas especies del Género *Crotalaria*.

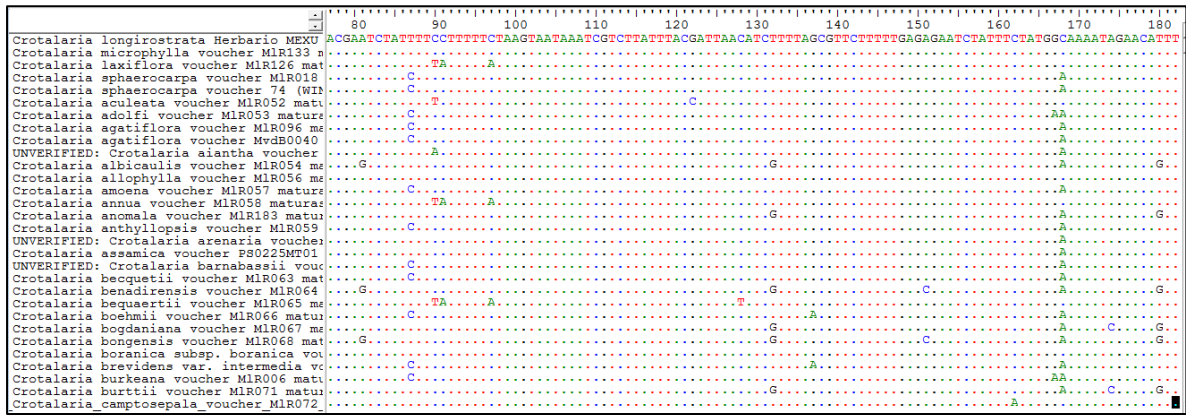


Fig 31. Alineamiento del gen *matK* entre diversas especies del Género *Crotalaria*.

En la prueba de especificidad realizada al analizar DNA de chepil en presencia del DNA de otras plantas comestibles se aprecia que a pesar de haber señales positivas, éstas son tardías, pues aparecen a valores de Ct mayores al Ct del chepil, lo cual indica que, aún con cierta inespecificidad, los cebadores y sonda diseñados son adecuados para identificar al chepil como ingrediente en un platillo que contenga otras especies vegetales presentes (Fig. 32 y Fig. 33).

Recordando uno de los platillos típicos en donde se combinan alaches y chepiles (la sopa de guías tradicional de Oaxaca) podemos decir que con este juego de cebadores y sonda sería posible detectar confiablemente al chepil sin que la presencia del alache intervenga pues no hubo amplificación ni siquiera a ciclos tardíos (Fig. 33).

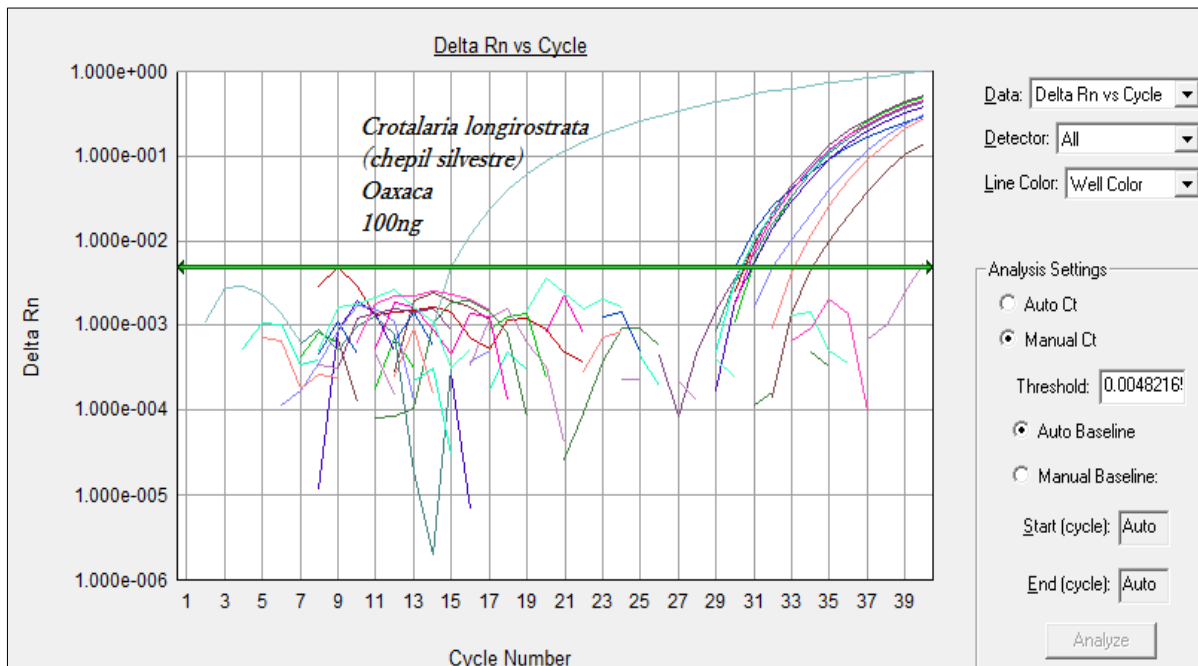


Fig 32. Prueba de especificidad de primers y sonda para el gen *matK* de *Crotalaria longirostrata* (chepil). A pesar de haber cierta inespecificidad, se observa diferencia definida entre los valores de Ct del control positivo de chepil y los controles negativos de otras plantas comestibles.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
A1	BERROS	matK chepil	Unknown	30.3411	0.3
A2	BERROS	matK chepil	Unknown	30.7655	0.3
B1	CILANTRO	matK chepil	Unknown	34.0178	
B2	CILANTRO	matK chepil	Unknown	Undet.	
C1	VERDOLGAS	matK chepil	Unknown	29.9873	0.554
C2	VERDOLGAS	matK chepil	Unknown	30.7703	0.554
D1	PAPALO	matK chepil	Unknown	31.9928	0.761
D2	PAPALO	matK chepil	Unknown	33.0694	0.761
E1	ESPINACA	matK chepil	Unknown	30.4278	0.145
E2	ESPINACA	matK chepil	Unknown	30.2232	0.145
F1	CHEPIL SECO SILV	matK chepil	Unknown	14.9771	
G1	CHAYA SECA SAN PEDR	matK chepil	Unknown	30.2023	0.204
G2	CHAYA SECA SAN PEDR	matK chepil	Unknown	30.4904	0.204
H1	ALACHE OZUMBA 2A	matK chepil	Unknown	Undet.	
H2	ALACHE OZUMBA 2A	matK chepil	Unknown	Undet.	

Fig. 33. Valores de Ct de la prueba de especificidad para *Crotalaria longirostrata* (chepil)

Finalmente en la Fig. 34 pueden apreciarse señales positivas para el DNA extraído de tamal de chepil con valores de Ct muy similares al del chepil seco, por lo anterior podemos decir que aún en alimentos preparados, la integridad del DNA es la suficiente, y por tanto es factible la identificación de chepil por qPCR en mezclas complejas (Fig. 34).

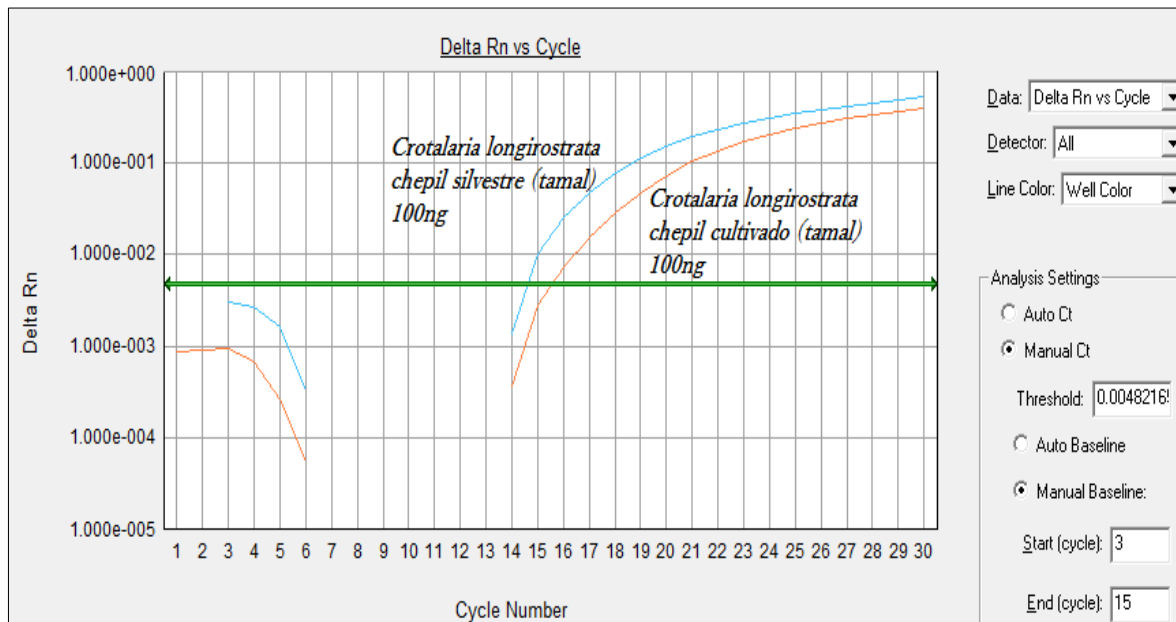


Figura 34. Señales de amplificación para DNA extraído de tamal de chepil.

Revisando nuevamente la figura 32, se observa que los primers y sonda elegidos no son específicos únicamente para la especie *longirostrata*, pues *Crotalaria pumila* también tiene la misma secuencia para este fragmento, sin embargo, debe recordarse que la especie *pumila* se conoce también como chipilín o chepil. Experimentalmente fue posible realizar una prueba comparando las señales de amplificación *C. pumila* y otras tres especies de la familia *Fabaceae* (Fig. 35).

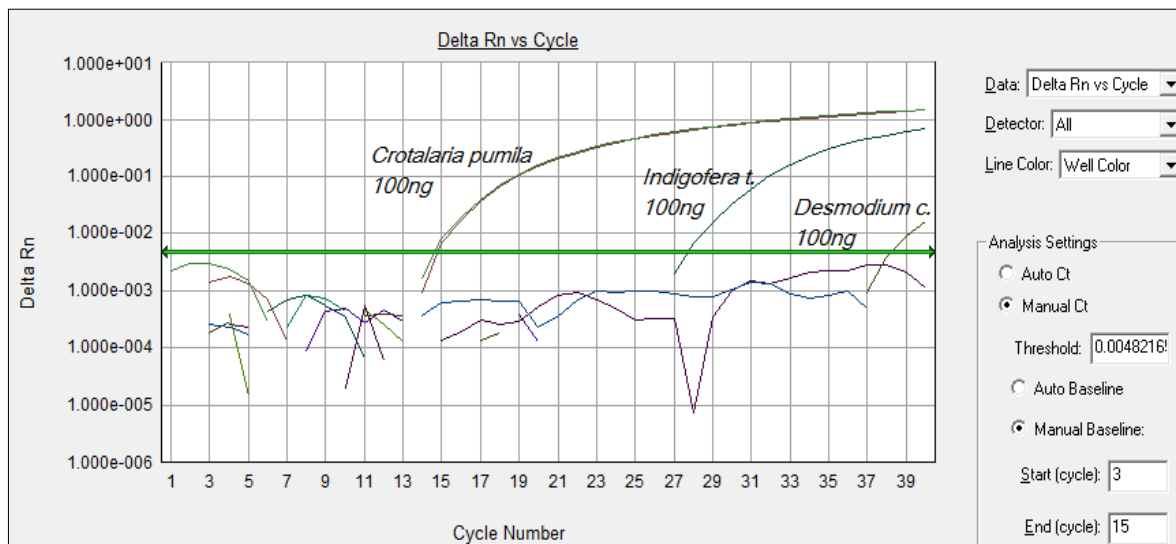


Fig 35. Segunda prueba de especificidad de primers y sonda para el gen *matK* de *Crotalaria longirostrata* (chepil). Se observa señal de amplificación para *Crotalaria pumila* y señales tardías para *Indigofera thibaudiana* y *Desmodium conzatii*.

Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
Cp	matK chepil	Unknown	14.6616	0.132
Cp	matK chepil	Unknown	14.4753	0.132
It	matK chepil	Unknown	30.0899	1.77
It	matK chepil	Unknown	27.5927	1.77
Dc	matK chepil	Unknown	Undet.	
Dc	matK chepil	Unknown	38.1817	
PI	matK chepil	Unknown	Undet.	
PI	matK chepil	Unknown	Undet.	
NTC	matK chepil	NTC	Undet.	
NTC	matK chepil	NTC	Undet.	

Fig. 36. Valores de Ct de la segunda prueba de especificidad para *chepil*. Cp: *Crotalaria pumila*, It: *Indigofera thibaudiana*, Dc: *Desmodium conzatii*, PI: *Phaseolus leptostachyus*, NTC: Not control template.

Como puede apreciarse en las figuras 35 y 36, los cebadores y sonda diseñados son útiles para identificar por igual a *C. longirostrata* y a *C. pumila*; y son suficientemente específicos para discriminar a otras plantas de la misma familia botánica.

➤ Identificación de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*)

Para el caso de la chaya se consideró una región de 112 pb del gen *rbcL* para la selección de cebadores y sonda (Fig. 37) siguiendo el mismo principio de elegir zonas donde hubiera diferencias importantes con otras especies.

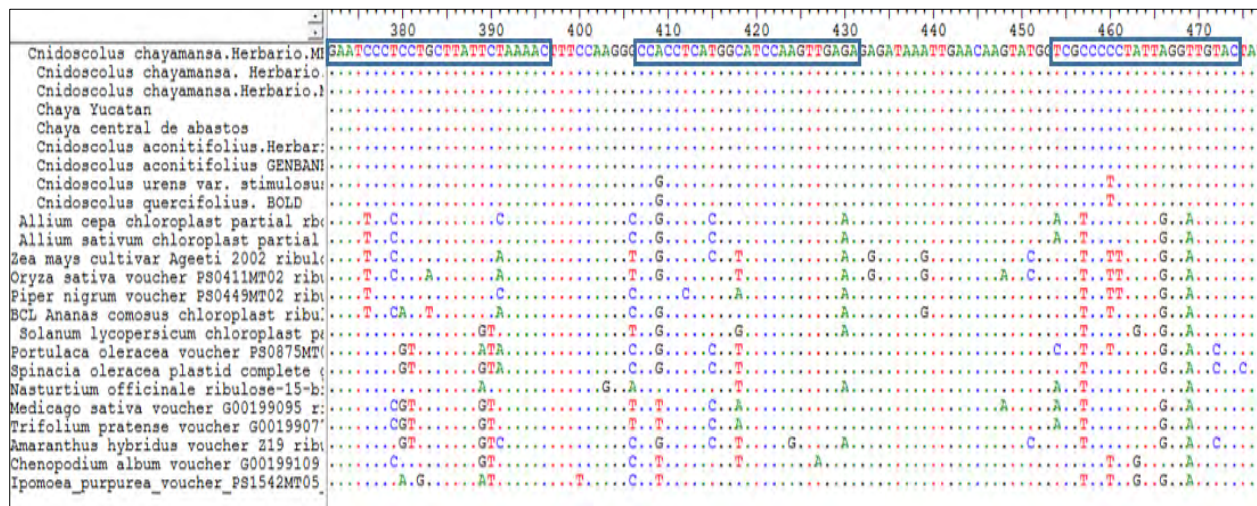


Fig. 37. Alineamiento de la secuencia del gen *rbcL* de *C. aconitifolius* contra secuencias de otras plantas comestibles, condimentos y de otras especies pertenecientes al género *Cnidoscolus*. Los puntos de colores indican bases iguales a la referencia de herbario, mientras que las letras representan diferencias. Una región con mayor número de diferencias será la indicada para que ahí hibriden los cebadores y sonda. A mayor número de diferencias, mayor será la especificidad. Entre recuadros se señala las regiones seleccionadas para la síntesis de cebadores (a los extremos) y sonda (en medio).

En las Fig. 38 y 39, se observa que los cebadores y sonda diseñados para *Cnidoscolus aconitifolius* arrojaron buenos resultados para el control positivo, para un control negativo y para una muestra cocinada. En este caso puede afirmarse que el proceso térmico al cual fue sometida

la chaya durante el proceso de elaboración del tamal tampoco afecta la identificación del quelite por qPCR.

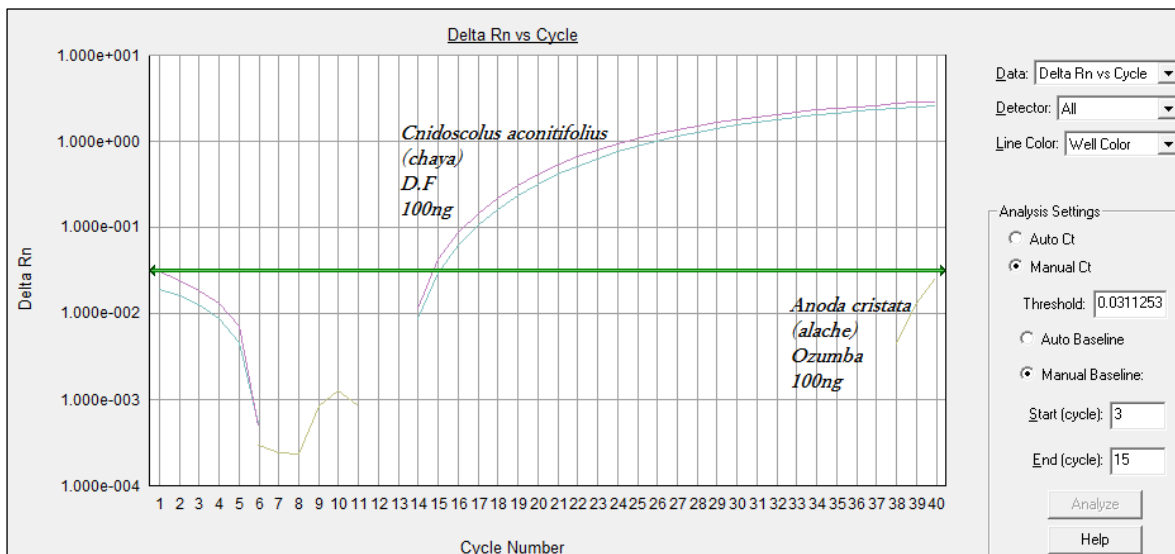


Fig. 38. Amplificación del gen *rbcL* en una muestra de hoja fresca de chaya. Las curvas características para gráficos de qPCR muestran señal positiva para el control positivo de chaya mientras que para alache no se observa señal de amplificación (resultado esperado para comprobar especificidad de cebadores y sonda).

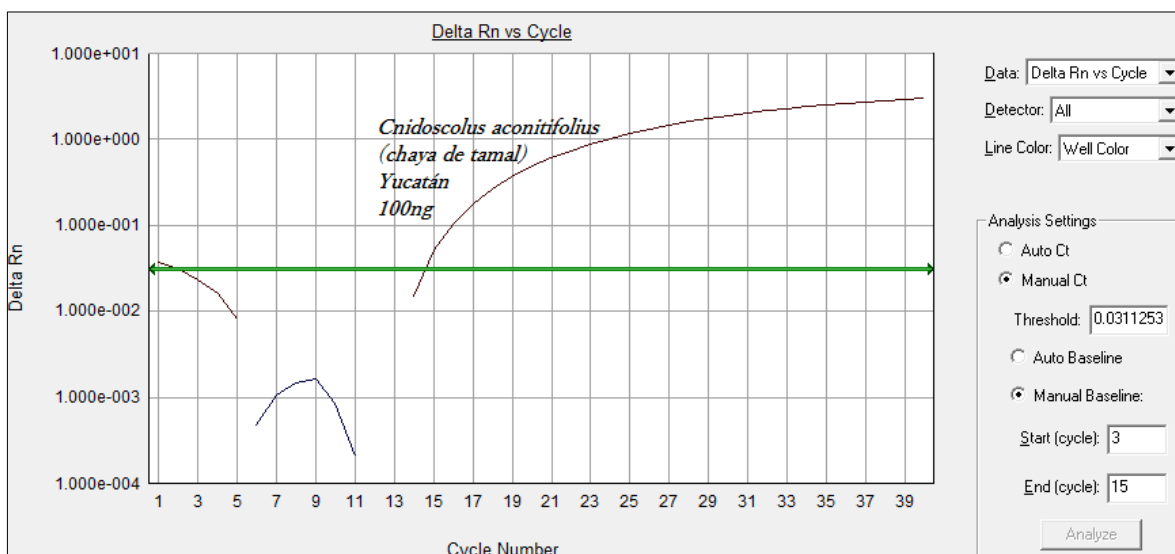


Figura 39. Resultado positivo para la amplificación del gen *rbcL* de *Cnidioscolus aconitifolius* en una muestra de tamal de chaya.

En las Fig. 40 y 41 se observan los resultados obtenidos para la prueba de especificidad de primers y sonda en el DNA extraído de otras plantas comestibles. Como puede apreciarse existe cierta amplificación inespecífica a ciclos tardíos (superiores a 30) sin embargo como se vio en la Fig. 39, el Ct para chaya cocinada presentó valores de Ct similares al de la planta fresca, por

tanto, a pesar de haber cierta inespecificidad, no habría impedimento para poder detectar y discriminar chaya como ingrediente.

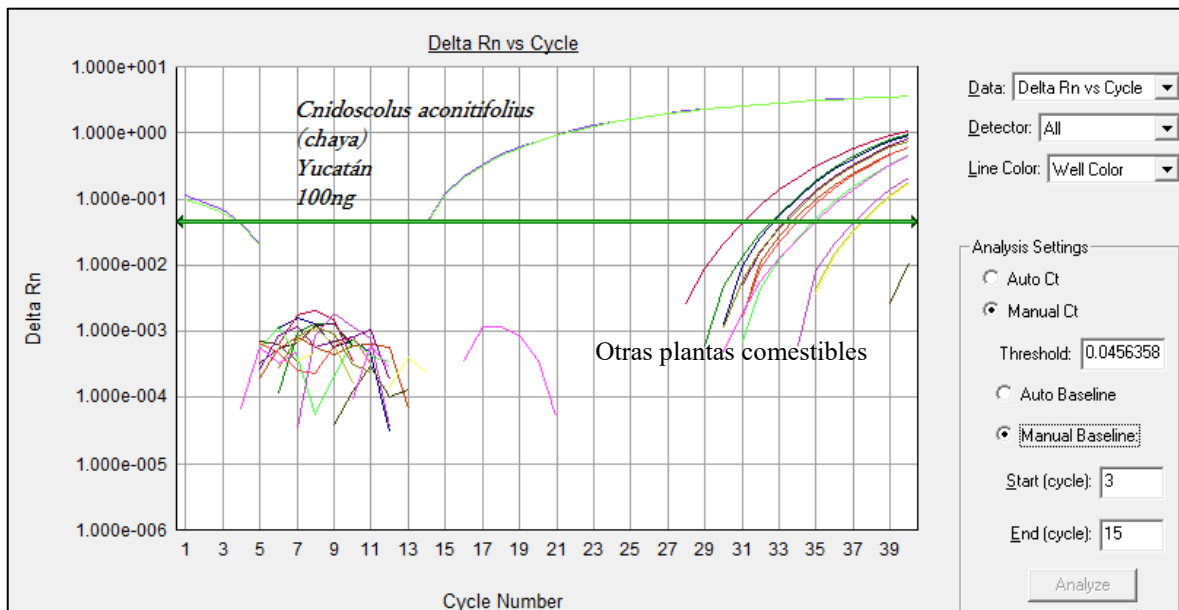


Fig 40. Prueba de especificidad de primers y sonda para el gen *rbcL* de *Cnidoscopus aconitifolius* (Chaya). A pesar de haber cierta inespecificidad, se observa diferencia definida entre los valores de Ct del control positivo de chaya y los controles negativos de otras plantas comestibles.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
A5	BERROS	rbcl chaya	Unknown	32.5424	0.0919
A6	BERROS	rbcl chaya	Unknown	32.6724	0.0919
B5	CILANTRO	rbcl chaya	Unknown	Undet.	
B6	CILANTRO	rbcl chaya	Unknown	Undet.	
C5	VERDOLGAS	rbcl chaya	Unknown	31.0648	1.83
C6	VERDOLGAS	rbcl chaya	Unknown	33.6476	1.83
D5	PAPALO	rbcl chaya	Unknown	34.0005	0.552
D6	PAPALO	rbcl chaya	Unknown	34.7818	0.552
E5	ESPINACA	rbcl chaya	Unknown	33.2292	0.0415
E6	ESPINACA	rbcl chaya	Unknown	33.2879	0.0415
F5	CHEPIL SECO SILV	rbcl chaya	Unknown	37.0376	0.229
F6	CHEPIL SECO SILV	rbcl chaya	Unknown	37.3618	0.229
G5	CHAYA SECA SAN PE	rbcl chaya	Unknown	13.9951	0.0294
G6	CHAYA SECA SAN PE	rbcl chaya	Unknown	14.0367	0.0294
H5	ALACHE OZUMBA 2A	rbcl chaya	Unknown	34.9807	1.76
H6	ALACHE OZUMBA 2A	rbcl chaya	Unknown	37.4722	1.76

Fig. 41. Valores de Ct de la prueba de inespecificidad para *Cnidoscopus aconitifolius* (Chaya)

Alternativamente, al realizar una prueba de especificidad utilizando una muestra de *Cnidoscopus multilobus* y otros especímenes pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae* se obtuvo lo siguiente:

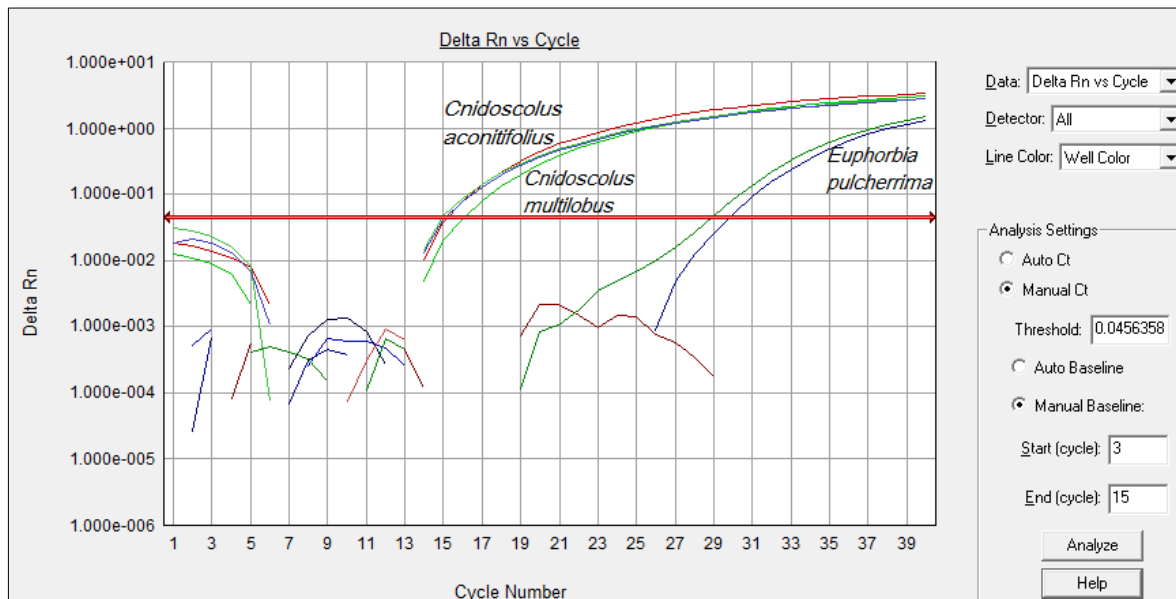


Fig. 42. Segunda prueba de especificidad de primers y sonda para el gen *rbcl* de *Cnidoscopus aconitifolius* (chaya). A pesar de haber inespecificidad con *Cnidoscopus multilobus*, se observa diferencia definida entre los valores de Ct del control positivo de chaya y los controles negativos de otras plantas pertenecientes a la misma familia botánica (*Euphorbiaceae*).

Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
Cm	rbcl chaya	Unknown	14.7663	0.489
Cm	rbcl chaya	Unknown	15.458	0.489
Aa	rbcl chaya	Unknown	Undet.	
Aa	rbcl chaya	Unknown	Undet.	
Ep	rbcl chaya	Unknown	28.1976	0.713
Ep	rbcl chaya	Unknown	29.2066	0.713
NTC	rbcl chaya	NTC	Undet.	
NTC	rbcl chaya	NTC	Undet.	
Chaya	rbcl chaya	Unknown	14.5141	0.0907
Chaya	rbcl chaya	Unknown	14.6424	0.0907

Fig. 43. Valores de Ct de la segunda prueba de especificidad para *Cnidoscopus aconitifolius* (chaya). Cm: *Cnidoscopus multilobus*, Aa: *Acalypha arvensis*, Ep: *Euphorbia pulcherrima*, NTC: Not template control.

Como se observa en las figuras 42 y 43, los cebadores y sonda diseñados son funcionales para identificar *C. aconitifolius* y *C. multilobus*. Cabe destacar que la morfología de *C. multilobus* es muy similar a la morfología de la chaya, inclusive es llamada comúnmente como chaya de monte pero no es frecuente su uso como planta comestible pues contiene una cantidad de vellosidades urticantes considerable (Cifuentes, 2009). Por lo anterior, podemos decir que los cebadores y sonda diseñados si bien no son específicos solo para la especie *aconitifolius* sí nos permiten diferenciar entre otras plantas comestibles pertenecientes a la misma familia botánica y entre diversos ingredientes. Una perspectiva interesante sería corroborar si las diversas variedades de chaya presentan secuencias idénticas al secuenciar el gen *rbcl*, o bien, señales de amplificación idénticas en ensayos de qPCR.

➤ Identificación de alache (*Anoda cristata*)

Finalmente para la pruebas con alache se eligió una región de 110 pb del gen *rbcL* para las pruebas de qPCR (Fig. 44).

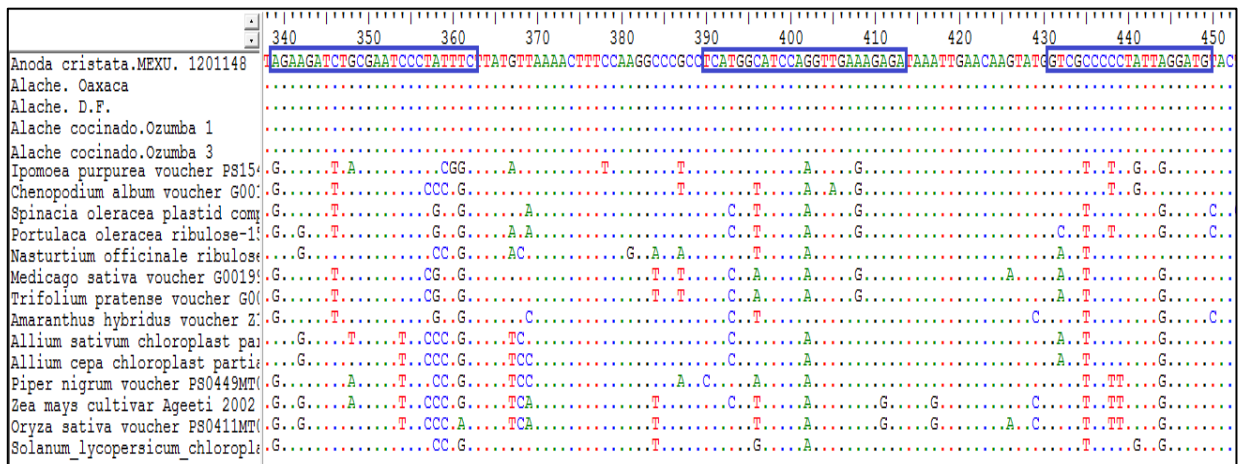


Fig. 44. Alineamiento de la secuencia del gen *rbcL* de *A. cristata* contra secuencias de plantas comestibles y condimentos diversos. Los puntos de colores indican bases iguales a la referencia de herbario, mientras que las letras representan diferencias. Una región con mayor número de diferencias será la indicada para la hibridación de los cebadores y sonda. Entre recuadros se señala las regiones seleccionadas para la síntesis de cebadores (a los extremos) y sonda (en medio).

Con respecto al alache, las curvas de amplificación (Fig. 45) arrojaron resultados positivos para muestras de hoja seca de alache y para una muestra de alache extraído de un alimento (Fig. 46). Al probar el juego de cebadores y sonda contra DNA de chaya se obtuvo amplificación aunque a ciclos más tardíos (Fig. 45). Esto nos indica que con los cebadores y sonda propuestos no tendríamos problema para discriminar chaya de alache como materias primas, pero si los dos especímenes se encontraran en un mismo alimento de manera homogénea, tal vez sería difícil diferenciarlos, sobre todo si chaya estuviera en mayor cantidad que el alache.

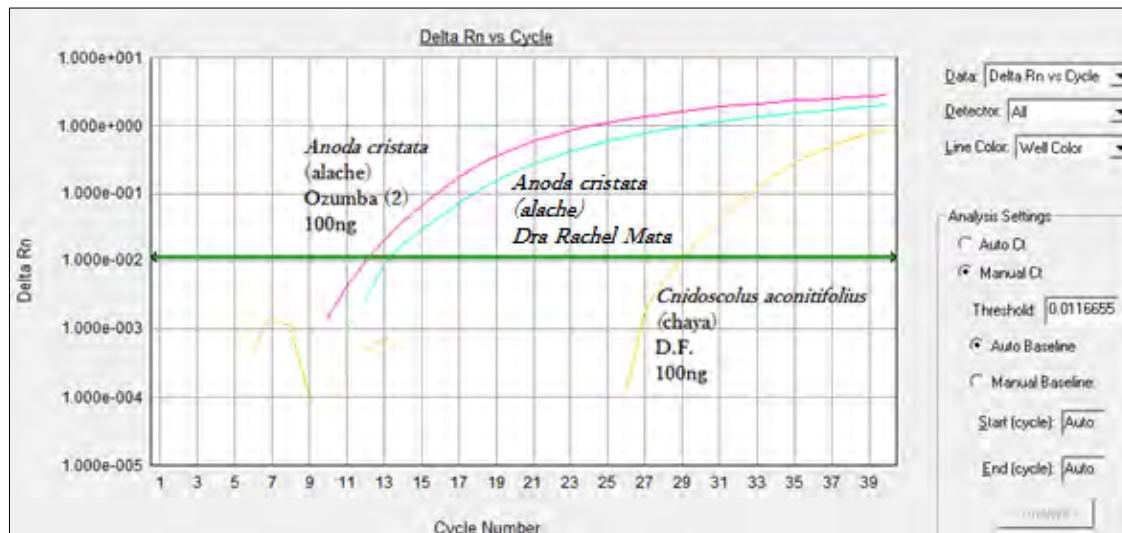


Fig. 45. Amplificación del gen *rbcL* en muestras alache seco. Las curvas en color rojo y azul muestran resultados positivos para *A. cristata* originaria de Ozumba, Edo. de Mex., mientras que la curva en color amarillo muestra un resultado inespecífico para chaya a un valor de Ct más tardío.

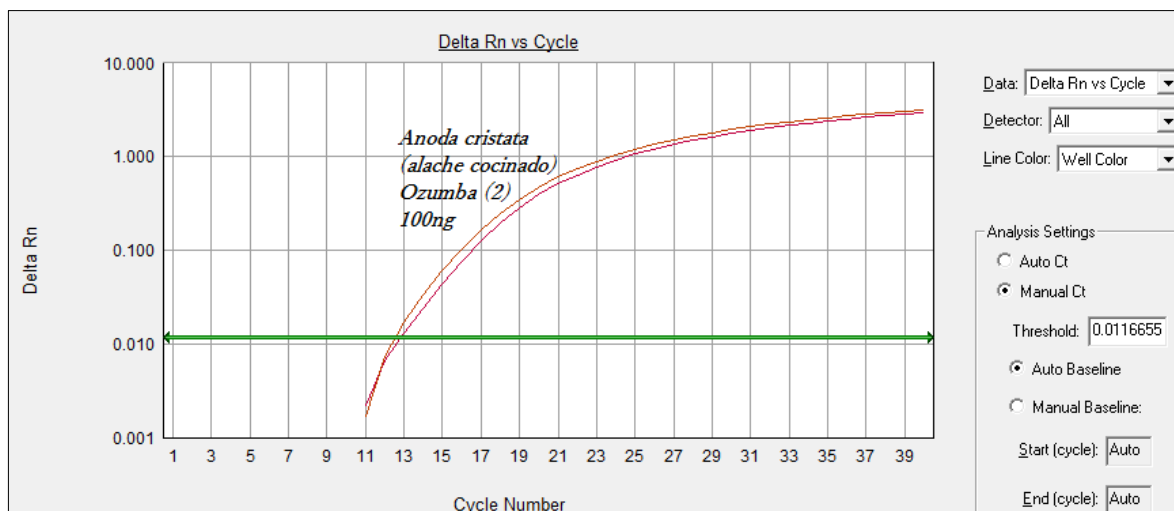


Fig. 46. Amplificación del gen *rbcL* en una muestra de alache cocinado. Las curvas visualizadas muestran resultados positivos para una muestra de *A. cristata* cocinado. Se observa un valor de Ct muy similar al valor de Ct de la hoja seca utilizando la misma cantidad de DNA molde (Fig. 45).

En las Fig. 47 y 48 se observan los resultados obtenidos para la prueba de especificidad de primers y sonda para alache comparando con DNA extraído de otras plantas comestibles. Como puede apreciarse, existe amplificación inespecífica a ciclos tardíos; sin embargo, como se vio en la Fig. 46, el Ct para alache cocinado presentó valores de Ct similares al de la planta seca, por tanto, a pesar de haber cierta inespecificidad, tampoco habría impedimento para poder detectar alache en matrices alimenticias.

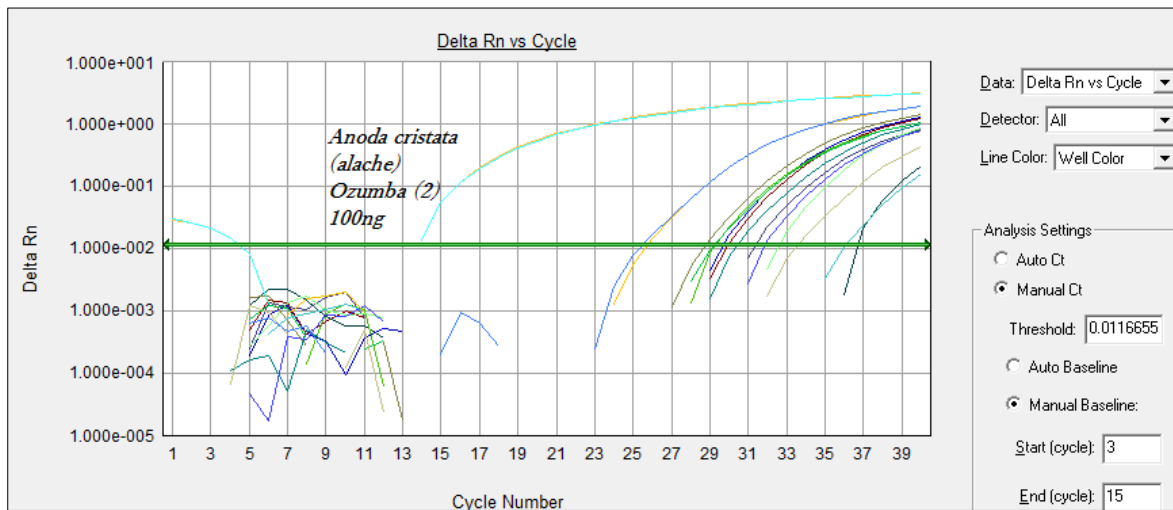


Fig. 47.- Prueba de especificidad de primers y sonda para el gen *rbcL* de *Anoda cristata* (alache). A pesar de haber amplificación inespecífica a ciclos tardíos se observan diferencias entre los valores de Ct del control positivo de alache y los controles negativos.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
A3	BERROS	rbcL alache	Unknown	29.2557	3.80333e-004
A4	BERROS	rbcL alache	Unknown	29.2551	3.80333e-004
B3	CILANTRO	rbcL alache	Unknown	30.7733	3.22
B4	CILANTRO	rbcL alache	Unknown	35.3319	3.22
C3	VERDOLGAS	rbcL alache	Unknown	28.9462	0.049
C4	VERDOLGAS	rbcL alache	Unknown	29.0155	0.049
D3	PAPALO	rbcL alache	Unknown	31.8231	0.323
D4	PAPALO	rbcL alache	Unknown	31.366	0.323
E3	ESPINACA	rbcL alache	Unknown	28.5566	1.12
E4	ESPINACA	rbcL alache	Unknown	30.1364	1.12
F3	CHEPIL SECO SI	rbcL alache	Unknown	33.3016	1.77
F4	CHEPIL SECO SI	rbcL alache	Unknown	35.81	1.77
G3	CHAYA SECA S	rbcL alache	Unknown	25.4337	0.00333
G4	CHAYA SECA S	rbcL alache	Unknown	25.429	0.00333
H3	ALACHE OZUMB	rbcL alache	Unknown	11.0181	0.00486
H4	ALACHE OZUMB	rbcL alache	Unknown	11.0113	0.00486

Fig. 48. Valores de Ct de la prueba de especificidad para *Anoda cristata* (alache).

Alternativamente, al realizar una prueba de especificidad utilizando DNA de *Anoda cristata* y de otros especímenes pertenecientes a la familia de las *Malvaceas* se obtuvo lo siguiente:

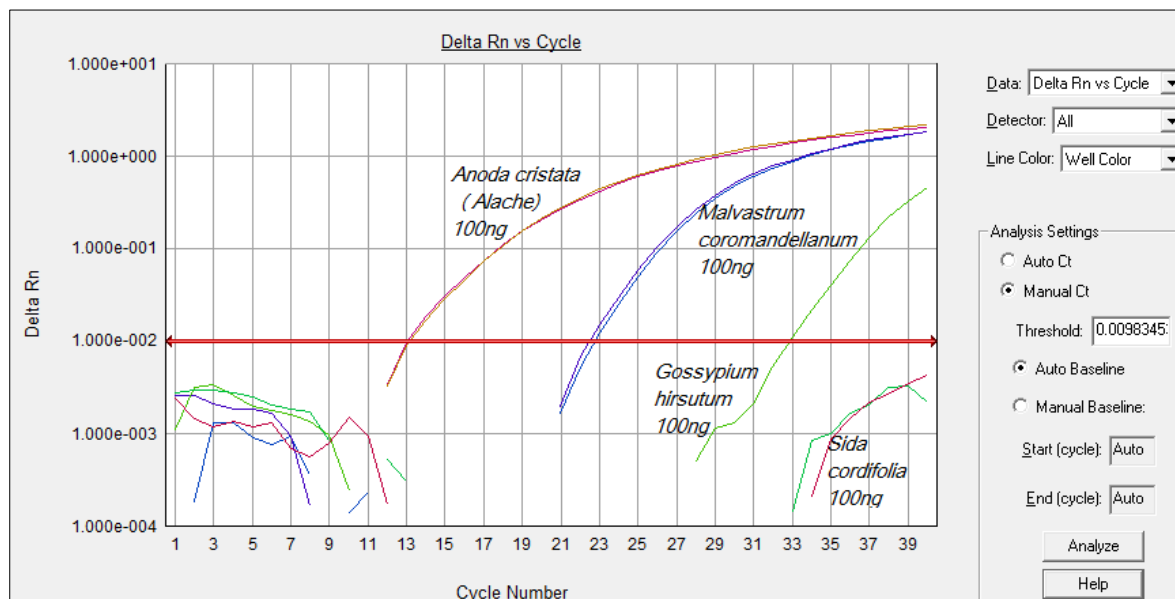


Fig. 49. Segunda prueba de especificidad de primers y sonda para el gen *rbcL* de *Anoda cristata* (alache). Se observa diferencia definida entre los valores de Ct del control positivo de chaya y los controles negativos de otras plantas pertenecientes a la misma familia botánica.

Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct
Mc	rbcL alache	Unknown	22.6668	0.206
Mc	rbcL alache	Unknown	22.3756	0.206
Gh	rbcL alache	Unknown	32.7599	
Gh	rbcL alache	Unknown	Undet.	
Sc	rbcL alache	Unknown	Undet.	
Sc	rbcL alache	Unknown	Undet.	
Ac	rbcL alache	Unknown	12.998	0.0599
Ac	rbcL alache	Unknown	13.0827	0.0599

Fig. 50. Valores de Ct de la segunda prueba de especificidad para diferentes especies de la familia botánica *Malvaceae*. Ac: *Anoda cristata* (alache) Mc: *Malvastrum coromandellianum*, Gh: *Gossypium hirsutum*, Sc: *Sida cordifolia*.

Como se aprecia en las figuras 49 y 50, los cebadores y sonda propuestos resultan adecuados para diferenciar a *Anoda cristata* de otras plantas pertenecientes a la misma familia botánica.

En México llegan a encontrarse otras especies del género *Anoda* sin embargo se sabe que *A. cristata* (L.) Schldl. y *A. palmata* Fryxell conforman las poblaciones más grandes mientras que el resto se encuentran de manera solitaria y en menor cantidad (Contreras-Díaz, 2014).

Resumiendo la sección de trazabilidad alimentaria tenemos lo siguiente:

- Se diseñaron ensayos de PCR en tiempo real para la detección de tres quelites distintos. La optimización de la técnica se basó en la selección adecuada de cebadores y sondas a partir de la discriminación de regiones similares o variables de los genes *rbcL* o *matK* entre plantas pertenecientes a la misma familia botánica y entre plantas que pudiesen estar presentes en distintos platillos.

- En el caso de *Cnidocolus chayamansa* y *Anoda cristata*, el diseño de cebadores y sonda partiendo del gen *rbcL* dio buenos resultados en lo que a especificidad se refiere, no así para el caso de *Crotalaria longirostrata* en donde se presentó poca variabilidad entre especies, para tal efecto, el diseño de cebadores tomando como molde el gen *matK*, arrojó mejores resultados para la diferenciación interespecie.
- Los ensayos de qPCR realizados muestran que la amplificación con los cebadores y sondas propuestos resulta suficientemente confiable para la identificación de los quelites como materia prima, esto es, partiendo del vegetal crudo. En el caso de alimentos preparados, la identificación confiable de la presencia de estos quelites dependerá de la cantidad en la que se encuentre dentro del platillo y de la facilidad con la que se pueda realizar la extracción del material genético. Sin embargo, a pesar de involucrar un proceso de cocción, se vio que el DNA se mantiene con una integridad suficiente para servir apropiadamente de molde para la amplificación.
- En el caso del chepil, el diseño de sondas y cebadores propuesto no logra hacer una discriminación entre especies silvestre y especies cultivadas, esto se debe a que los genes *matK* y *rbcL* de *Crotalaria longirostrata* presentan baja variabilidad intraespecie.

d) Árboles filogenéticos

En el programa BioEdit, el alineamiento del gen *rbcL* de *Crotalaria longirostrata* contra secuencias de especies pertenecientes al mismo género presentó pocas diferencias dentro del gen por lo que se optó por elegir la secuencia del gen *matK* para inferir parentesco interespecie.

Al colocar la secuencia *matK* del espécimen de herbario de chepil (CL5M F) en el programa de alineamiento de secuencias BLAST se describe como especie más semejante a *Crotalaria longirostrata*, la especie *Crotalaria pumila* (Fig.51).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Crotalaria pumila maturase-like protein (matK) gene, complete cds; chloroplast	1356	1356	98%	0.0	99%	AY386867.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria spectabilis chloroplast matK gene for maturase K, complete cds	1306	1306	98%	0.0	98%	AB649973.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria assamica voucher PS0225MT01 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1306	1306	98%	0.0	98%	HM049506.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria teixeirae voucher MIR041 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1301	1301	96%	0.0	99%	JQ041108.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria distans voucher MIR002 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1301	1301	96%	0.0	99%	JQ041024.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria capensis maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1295	1295	98%	0.0	98%	JX905953.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria laburnoides var. laburnoides voucher MIR130 maturase K (matK) gene, partial cds; ch	1295	1295	96%	0.0	98%	JQ041064.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria keniensis voucher MIR118 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1290	1290	96%	0.0	98%	JQ041059.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria humbertiana voucher MIR162 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1290	1290	96%	0.0	98%	JQ041047.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria qriquensis voucher MIR013 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1290	1290	96%	0.0	98%	JQ041044.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria annua voucher MIR058 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1290	1290	96%	0.0	98%	JQ040991.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria allophylla voucher MIR056 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1290	1290	96%	0.0	98%	JQ040989.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria poissonii voucher MIR176 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1288	1288	96%	0.0	98%	JQ041098.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria gamwelliae voucher Bidgood et al. 4596 (UPS) maturase K (matK) gene, partial cds; c	1284	1284	96%	0.0	98%	JQ041037.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria filicaulis voucher MIR098 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1284	1284	96%	0.0	98%	JQ041034.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria eremicola voucher MIR038 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1284	1284	96%	0.0	98%	JQ041031.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria ephemera voucher MIR093 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1284	1284	96%	0.0	98%	JQ041030.1
<input type="checkbox"/>	Crotalaria comanestiana voucher MIR080 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1284	1284	96%	0.0	98%	JQ041012.1
<input type="checkbox"/>	Indigofera rhytidocarpa subsp. rhytidocarpa maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	1279	1279	96%	0.0	98%	JX905943.1

Figura 51. Análisis de alineamiento BLAST de la secuencia matK de *Crotalaria longirostrata* con secuencias de la base de datos de GenBank.

Utilizando el algoritmo de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei para la construcción de filogenias se obtuvo el siguiente árbol filogenético para el gen rbcL de *Crotalaria longirostrata* y otras especies cercanas.

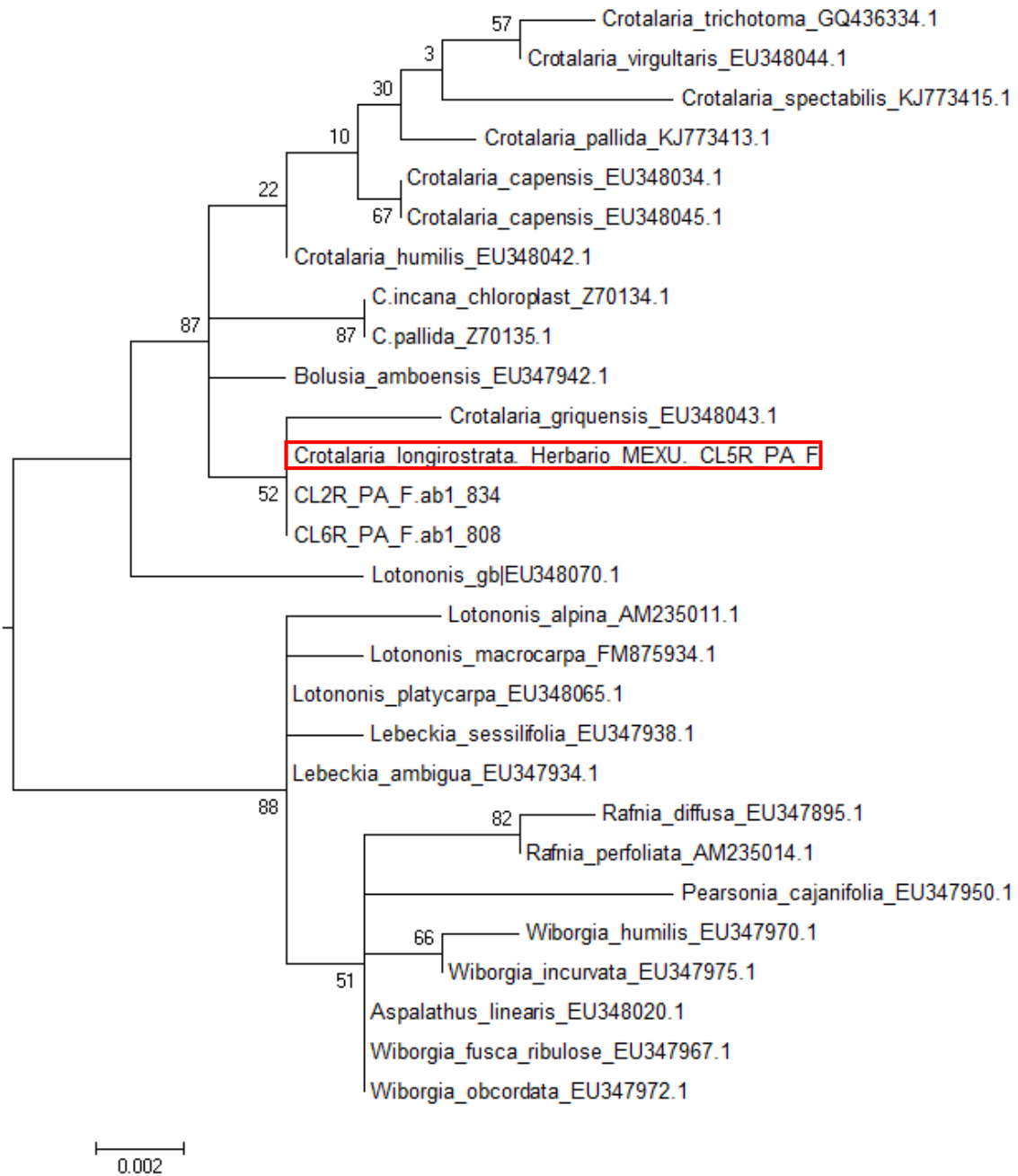


Fig. 52. Árbol filogenético de *Crotalaria longirostrata* y otras especies de la familia *Fabaceae* utilizando el gen marcador *rbcL* como marcador filogenético y el algoritmo de inferencia de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) y bootstrapping con 1,000 repeticiones. Como se puede apreciar, las especies *longirostrata* y *C. griquensis* son especies altamente emparentadas pues se ubican en el mismo clado. (CL2R y CL6R son las muestras de Chiapas y de Ozumba respectivamente).

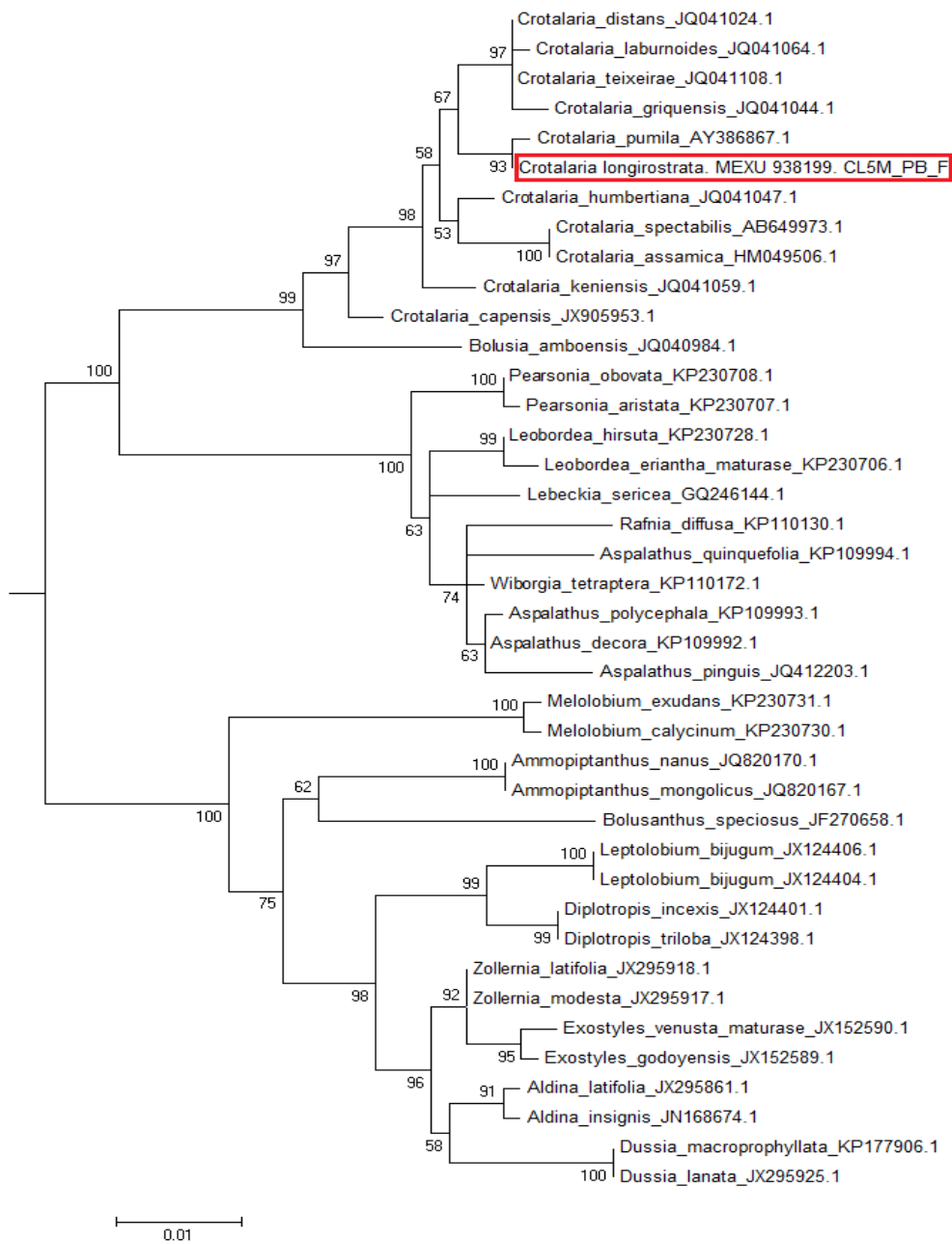


Fig. 53. Árbol filogenético de *Crotalaria longirostrata* y otras especies de la familia *Fabaceae* utilizando el gen marcador *matK* como marcador filogenético y el algoritmo de inferencia de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) y bootstrapping con 1,000 repeticiones, valor de SBL de 0.3232. Como se puede apreciar, las especies *longirostrata* y *pumila* son especies altamente emparentadas pues se ubican en el mismo clado.

En la Fig. 53, se ve reflejado que *Crotalaria longirostrata* está ubicada en otra rama distinta a otras especies de *Crotalaria* y muy emparentada a la especie *pumila*. Utilizando el gen *matK* como marcador, los géneros más cercanos a *Crotalaria* son *Bolusia* y *Pearsonia*.

En el caso de *Cnidoscolus aconitifolius* o *Cnidoscolus chayamansa*, un alineamiento del gen *rbcL* en BLAST permitió extraer las secuencias más parecidas y con ellas realizar la filogenia correspondiente obteniéndose así el siguiente árbol:

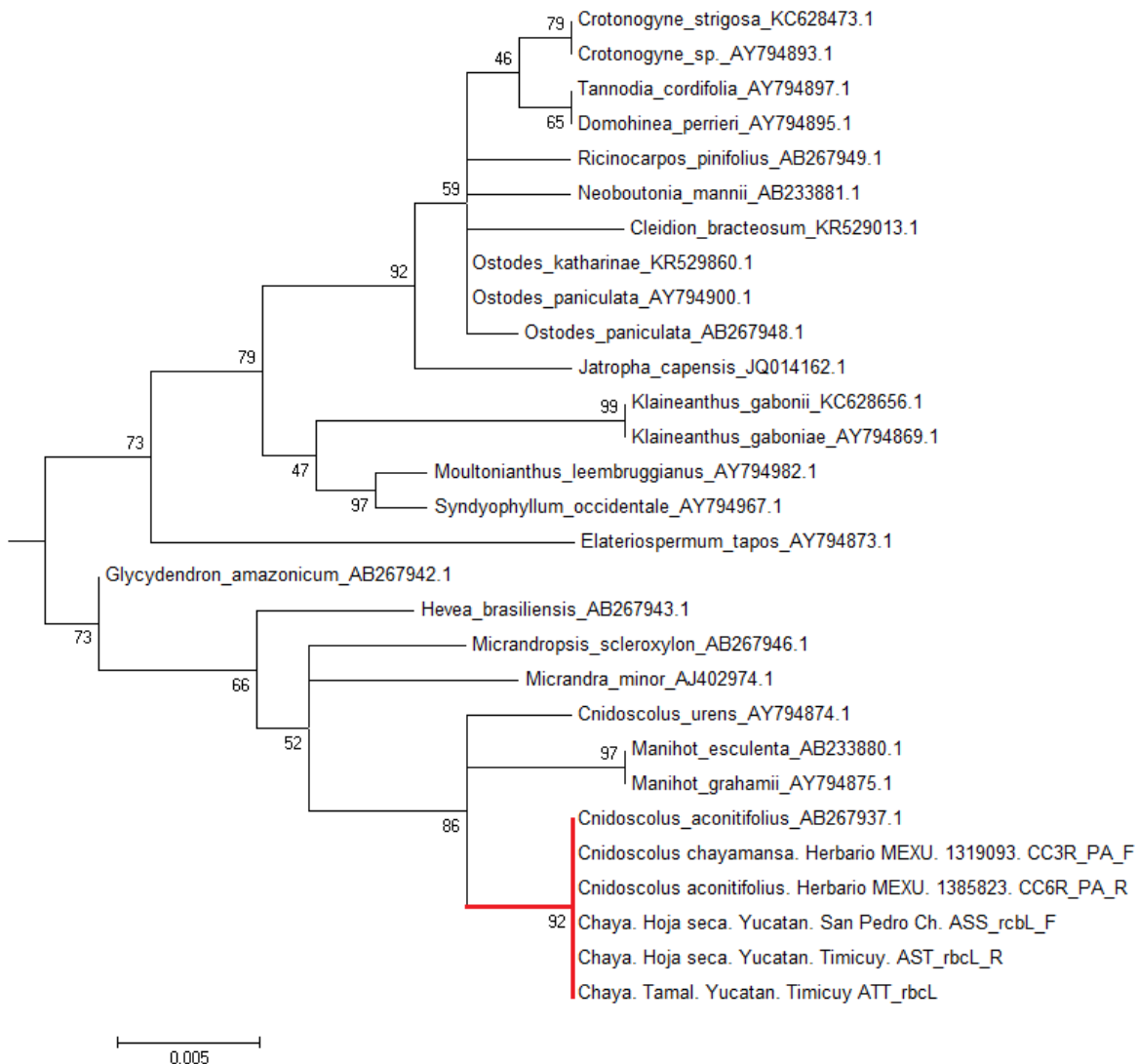


Fig. 54. Árbol filogenético para *Cnidoscolus aconitifolius* o *Cnidoscolus chayamansa* utilizando el gen *rbcL* como marcador filogenético y el modelo de inferencia de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) con un bootstrapping de 1,000 repeticiones. Se observa que parten del mismo nodo las especies *C. aconitifolius* y *C. chayamansa*.

Como se aprecia en la Fig. 54, se ubican en el mismo clado a las especies de herbario y a las muestras de colecta; con este marcador no existe diferencia entre *chayamansa* y *aconitifolius*. Los géneros más cercanos a la chaya son *Manihot* y *Micrandra*.

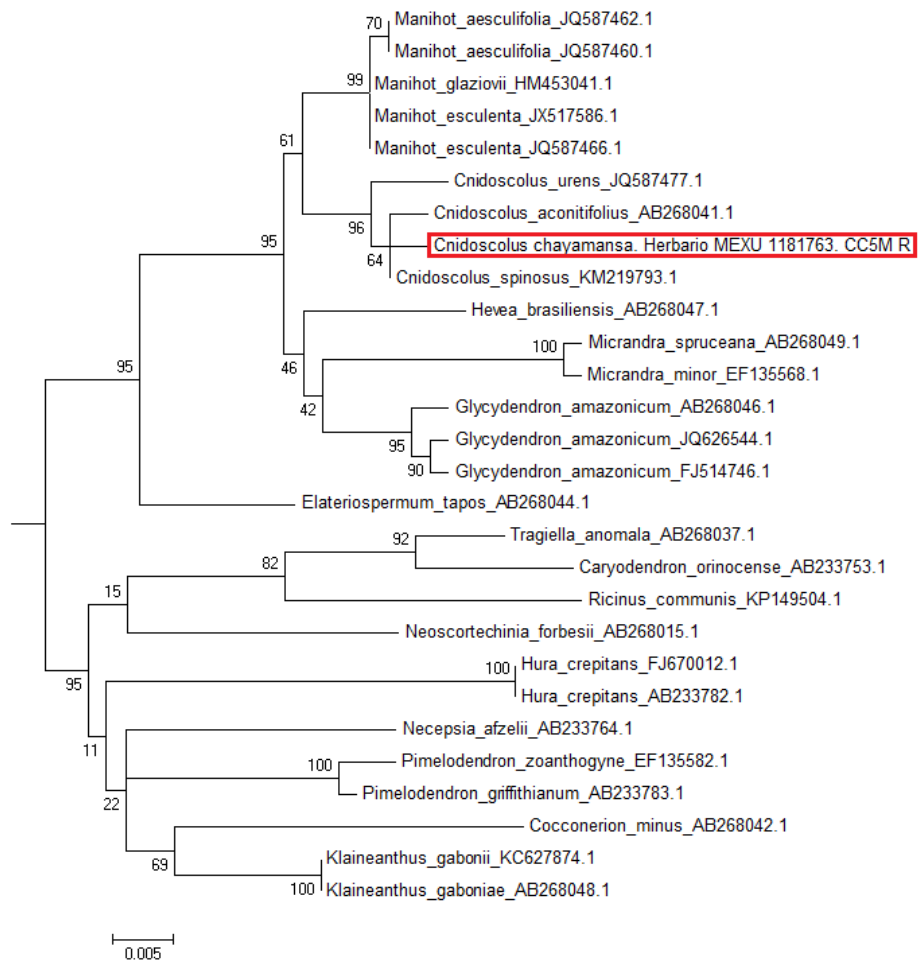


Fig. 55. Árbol filogenético para *Cnidoscopus aconitifolius* o *Cnidoscopus chayamansa* utilizando el gen *matK* como marcador filogenético y el modelo de inferencia de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) con un bootstrapping de 1,000 repeticiones. Se observa que *C. aconitifolius*, *C. chayamansa* y *C. spinosus* comparten el mismo clado.

Finalmente para *Anoda cristata* se obtuvo el árbol filogenético ilustrado en la Fig. 56. Como se puede apreciar, las muestras colectadas y la muestra de herbario parten del mismo nodo, confirmándose con ello la identidad de las muestras colectadas no importando las diferencias morfológicas observadas en un inicio. Como géneros cercanos a *A. cristata* tenemos a *Abutilon*, *Sida*, *Lavatera* y *Malva*.

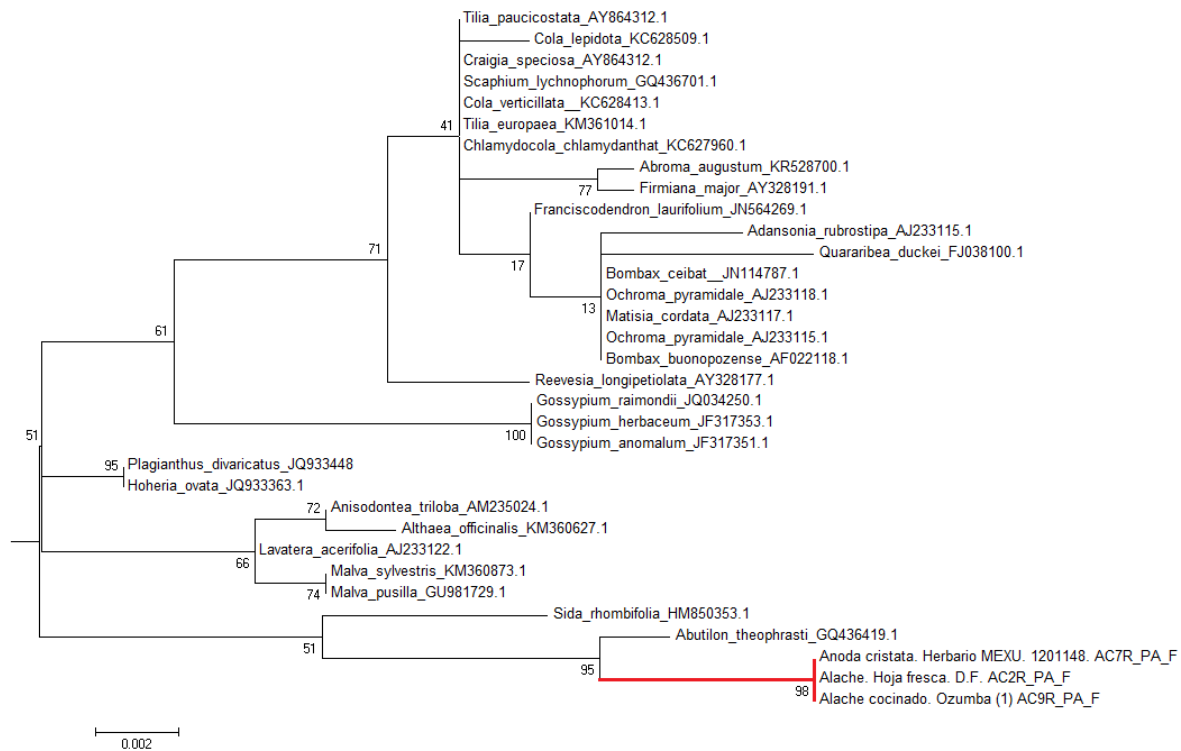


Fig. 56. Árbol filogenético para *Anoda cristata* utilizando el gen *rbcL* como marcador filogenético. El modelo de inferencia utilizado fue el de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood) y un bootstrapping de 1,000 repeticiones.

En general, los árboles obtenidos con un solo marcador permitieron relacionar especies pertenecientes a la misma familia, no obstante para reafirmar estas hipótesis se deben realizar otros análisis con diferentes marcadores y otros modelos estadísticos. El modelo de máxima parsimonia podría utilizarse en combinación con caracteres morfológicos y dar árboles más precisos pues como lo describe Sandoval E. et al, “A pesar de que los marcadores moleculares, como las secuencias de DNA, en la actualidad son la fuente principal de datos para la reconstrucción filogenética, consideramos que las clasificaciones taxonómicas no se deben basar únicamente en la similitud entre nucleótidos, sino también en la información que brindan otras fuentes de caracteres como los morfológicos y anatómicos. La inclusión de este tipo de caracteres incrementa el soporte de los clados y proporciona oportunidades para probar hipótesis alternativas” (Sandoval- Zapotitla et al, 2010).

Entre los estudios anatómicos y caracteres estructurales que podrían evaluarse sobre todo en géneros tan grandes como lo es *Fabaceae*, a la cual pertenece el chepil, se encuentran: caracteres anatómicos foliares (presencia de pailas en lámina foliar, pelos o glándulas en epidermis, ubicación de estomas en lámina foliar) y caracteres morfológicos (tipo de crecimiento, forma de tallo, número de entrenudos en el tallo, ubicación de las hojas en el tallo) entre otros.

De manera general, la construcción de árboles filogenéticos con los marcadores *rbcL* y *matK* nos da una idea general de la cercanía de parentesco entre los especímenes evaluados y otras especies pertenecientes a la misma familia botánica. Este fue solamente un acercamiento, ya que para

obtener una filogenia fidedigna de especies, es necesario construir árboles filogenéticos de una variedad de familias de genes para ofrecer una comparación global de la evolución de las mismas, no obstante esta forma de esquematizar los resultados obtenidos en la secuenciación. Así mismo se pudo notar la importancia que tiene el enriquecimiento de las bases de datos existentes, pues entre mayor sea la cantidad de secuencias comparadas, más certeras serán las hipótesis planteadas.

CONCLUSIONES

- El uso de los cebadores ya establecidos para la obtención de códigos de barras en plantas aunado a la obtención de secuencias de calidad permitió generar exitosamente códigos de barras biológicos para las tres especies en estudio.
- Con el marcador *rbcL* se obtuvieron mejores resultados de amplificación que con los marcadores *matK*, *ITS2* y *trnH-psbA*.
- Con la información obtenida del análisis de secuencias fue posible la alimentación de la Base de Datos de Código de Barras de la Vida (BOLD System) con 17 nuevas secuencias provenientes de muestras de colección del herbario MEXU. Con la apertura de este proyecto se consiguieron los primeros registros de especímenes mexicanos para *Anoda cristata* y *Cnidoscolus aconitifolius* así como los dos primeros registros para la especie *Crotalaria longirostrata* en el portal BOLD.
- Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para la detección de los tres quelites distintos, tanto crudos como cocinados. La optimización de la técnica se basó en el diseño adecuado de cebadores y sondas a partir de la discriminación de regiones similares o variables de los genes *rbcL* o *matK* entre plantas pertenecientes a la misma familia botánica y entre plantas que pudiesen estar presentes en distintos platillos.
- En el caso de *Cnidoscolus chayamansa* y *Anoda cristata*, el diseño de cebadores y sonda partiendo del gen *rbcL* dio buenos resultados en lo que a especificidad se refiere, no así para el caso de *Crotalaria longirostrata* en donde se presentó poca variabilidad entre especies, para tal efecto, el diseño de cebadores tomando como molde el gen *matK*, arrojó mejores resultados para la diferenciación interespecie.
- Los ensayos de qPCR realizados en matrices alimenticias muestran que la técnica resulta suficientemente confiable para la identificación de los quelites como materia prima. En el caso de alimentos preparados, la identificación confiable de los quelites dependerá de la cantidad en la que se encuentre dentro del platillo y de la facilidad con la que se pueda realizar la extracción del material genético. Sin embargo, a pesar de involucrar un proceso de cocción, se vio que el DNA se mantiene con una integridad suficiente para servir apropiadamente de molde para la amplificación.
- Los cebadores y sondas propuestos para chepil y chaya permiten hacer discriminación confiable entre diferentes ingredientes, incluso entre otras especies pertenecientes a la misma familia botánica, sin embargo no sería posible discriminar *Cnidoscolus aconitifolius* de *Cnidoscolus multilobus*, pues las señales de amplificación son muy

similares en ambos casos. Lo mismo ocurrió en el caso de *Crotalaria longirostrata* y *Crotalaria pumila*.

- Los árboles filogenéticos obtenidos permitieron relacionar a los quelites en estudio dentro de los phyllum de otras especies pertenecientes a la misma familia botánica.

La identificación molecular forma parte del conocimiento y estudio de las especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas. Definir una estrategia para su identificación así como de las propiedades nutrimentales, medicinales y organolépticas permitirá una caracterización completa de dichas especies. La información obtenida en conjunto se espera permita a largo plazo la revaloración de estos alimentos en la dieta de la población mexicana así como la inserción de las mismas en mercados locales y ambientalmente hablando en un mayor conocimiento y conservación de la biodiversidad en nuestro país.

ANEXO 1

Fotografías de las muestras analizadas y ejemplares del herbario MEXU

CHAYA

Como se vio en los antecedentes, la morfología de la chaya dependerá de la variedad y de la región donde nos encontremos. Durante la recolecta del espécimen es importante trabajar con guantes ya que las vellosidades urticantes llegan a causar molestia importante sobre todo en personas con piel sensible. Un detalle importante a considerar para obtener éxito en la amplificación de productos de PCR y obtención de códigos de barras es partir de material genético fresco o de un espécimen herbarizado lo más fresco posible, pues entre más antiguo sea, menor será la calidad del DNA extraído.

Chaya (Yucatán)



Chaya (Herbario MEXU):

Tres especímenes de *Cnidoscolus chayamansa*



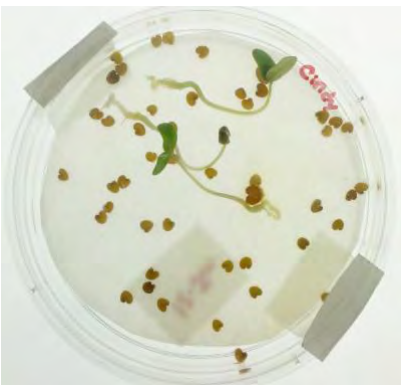
Especimen de *Cnidoscolus aconitifolius* colectada en Honduras



CHEPIL

En el caso del chepil, se tuvieron varios tipos de tejidos, semilla, embrión, hoja seca y hoja fresca. La problemática de trabajar con semilla es que si no se tiene nitrógeno líquido para trabajar, la matriz es muy dura y se dificulta la extracción de material genético. Trabajar con embriones genera extracciones de muy buena calidad pero bajos rendimientos, trabajar con hoja fresca macerada con ayuda de nitrógeno líquido es buena opción pero la viscosidad generada llega a ser un punto crítico durante la lisis celular, la mejor opción en este caso fue realizar extracciones partiendo de 25mg de hoja de chepil seco.

Chepil germinado (Edo de Méx.)



Chepil seco (Chiapas)



Chepil (Herbario MEXU). Dos especímenes de *Crotalaria longirostrata*:



ALACHE

Con *Anoda cristata* resultó interesante observar la diversidad de caracteres taxonómicos encontrados dependiendo de la región de origen, en algunos casos la hoja era larga y con terminación en punta mientras que en otros la hoja era amplia y sin extremos largos. En las flores también se encontraron algunas diferencias interesantes pues mientras en algunos especímenes los pétalos eran amplios y de color violeta, en otros casos las flores eran más cerradas y de pétalos más pequeños con un color más pálido. Al principio incluso se dudaba que realmente fuera la especie, sin embargo al secuenciar se vio que al comparar los genes *rbcl* y *matK* no hubo diferencias entre ellos.

Alache (D.F.)



Alache (Oaxaca)



Alaches (Edo. de México, Ozumba)



Alaches (herbario MEXU):

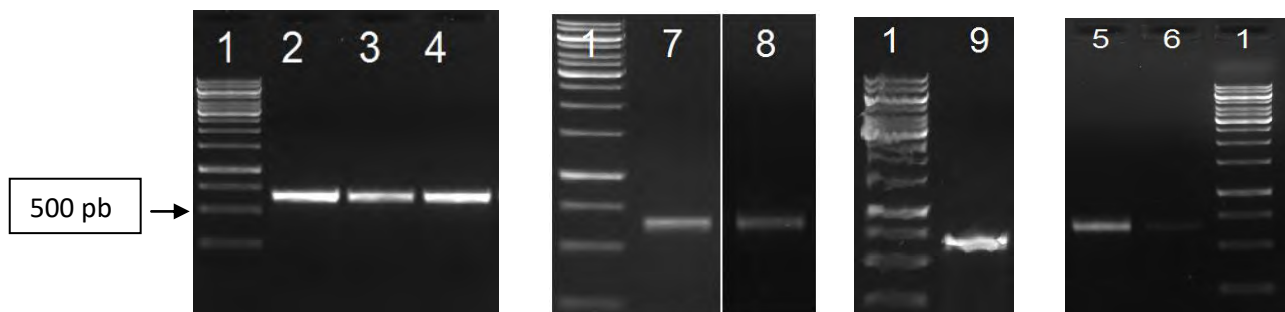


ANEXO 2

Imágenes de los productos de amplificación obtenidos utilizando los cebadores descritos en la Tabla 7 en PCR punto final.

Crotalaria longirostrata (Chepil) *rbcL* (640pb)

Condiciones de amplificación de (Kress, 2012)

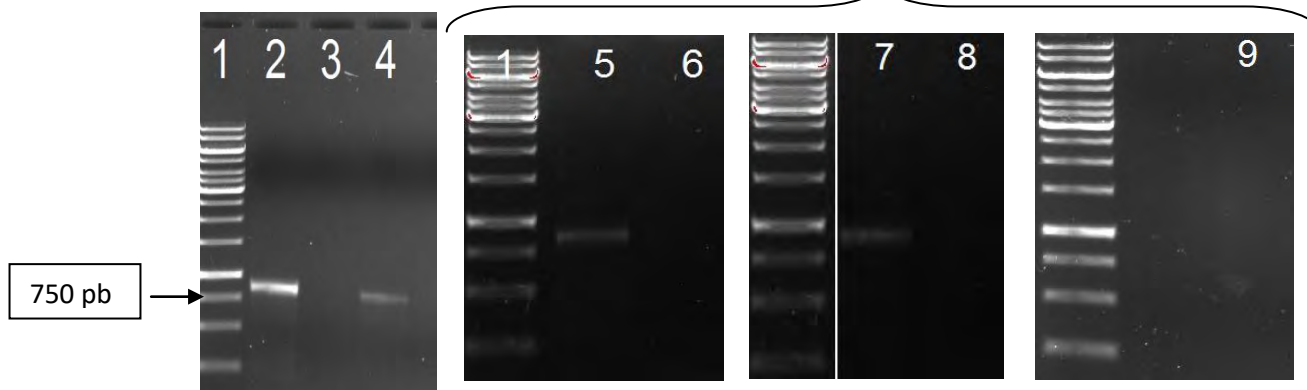


- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 Marcador de peso molecular DNA 1KB | 6 Chepil Chiapas (seco) herbario 07 |
| 2 Chepil Chiapas (seco). Réplica A | 7 Chepil Oaxaca (seco) |
| 3 Chepil Chiapas (seco). Réplica B | 8 Chepil Oaxaca (cocinado) |
| 4 Chepil Edo. México (germinado) | 9 Chepil Central de abastos (seco) |
| 5 Chepil Oaxaca (seco) herbario 99 | |

Crotalaria longirostrata (Chepil) *matK* (840pb)

Condiciones Jeanson

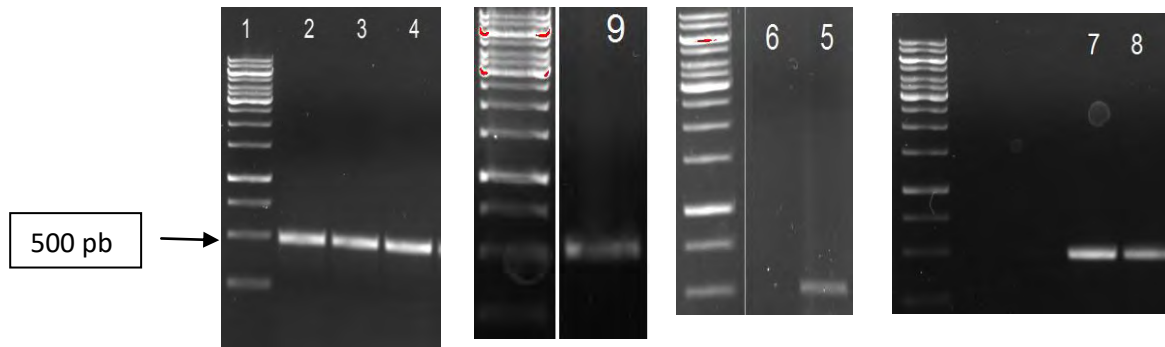
Condiciones Kress



- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 Marcador de peso molecular DNA 1KB | 6 Chepil Chiapas (seco) herbario 07 |
| 2 Chepil Chiapas (seco). Réplica A | 7 Chepil Oaxaca (seco) |
| 3 Chepil Chiapas (seco). Réplica B | 8 Chepil Oaxaca (cocinado) |
| 4 Chepil Edo. Mex. (germinado) | 9 Chepil Central de abastos (seco) |
| 5 Chepil Oaxaca (seco) herbario 99 | |

***Crotalaria longirostrata* (Chepil)
ITS2 (538pb)**

Condiciones Jeanson



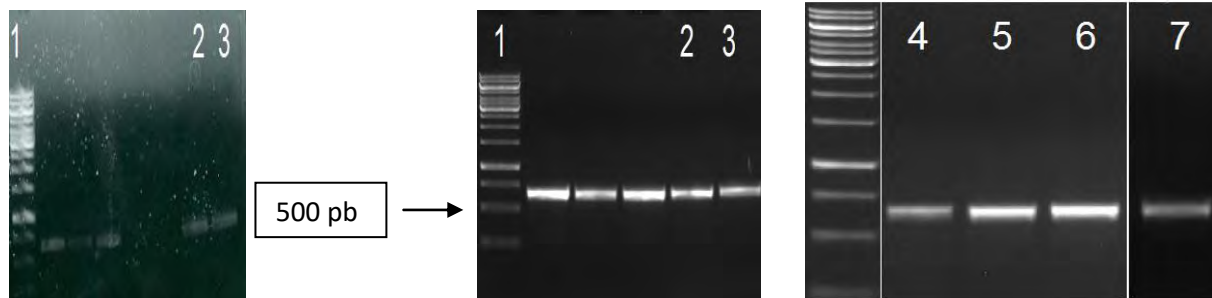
- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 Marcador de peso molecular DNA 1KB | 6 Chepil Chiapas (seco) herbario 07 |
| 2 Chepil Chiapas (seco). Réplica A | 7 Chepil Oaxaca (seco) |
| 3 Chepil Chiapas (seco). Réplica B | 8 Chepil Oaxaca (cocinado) |
| 4 Chepil Edo. Mex. (germinado) | 9 Chepil Central de abastos (seco) |

***Cnidoscopus aconitifolius* o *Cnidoscopus chayamansa* (Chaya)
rbcL (640pb)**

Condiciones Jeanson

Condiciones Kress

Condiciones Jeanson

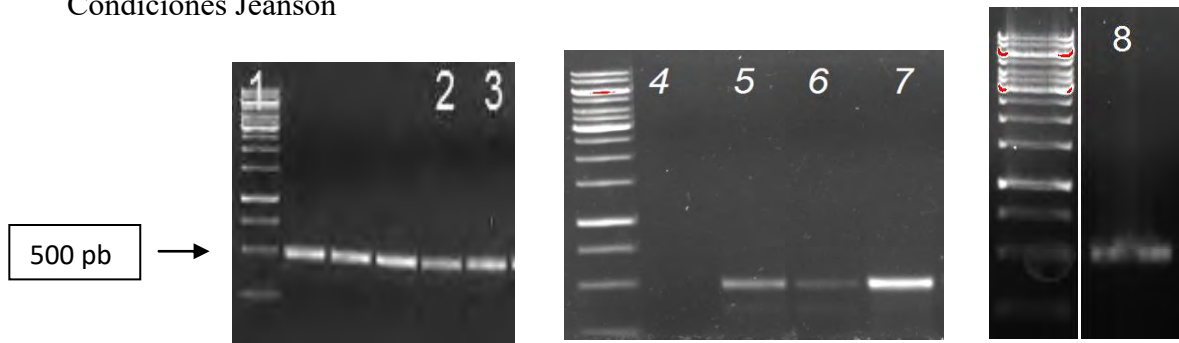


- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 Marcador de peso molecular DNA 1kb | 5 Chaya Honduras (seco). Herbario 23 |
| 2 Chaya Yucatán (fresco). Réplica A | 6 Chaya Campeche (seco). Herbario 63 |
| 3 Chaya Yucatán (fresco). Réplica B | 7 Chaya Chiapas (seco). Herbario 93 |
| 4 Chaya Yucatán (seco). Herbario 37 | |

***Cnidoscopus aconitifolius* o *Cnidoscopus chayamansa* (Chaya)**

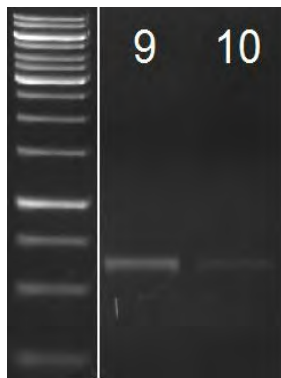
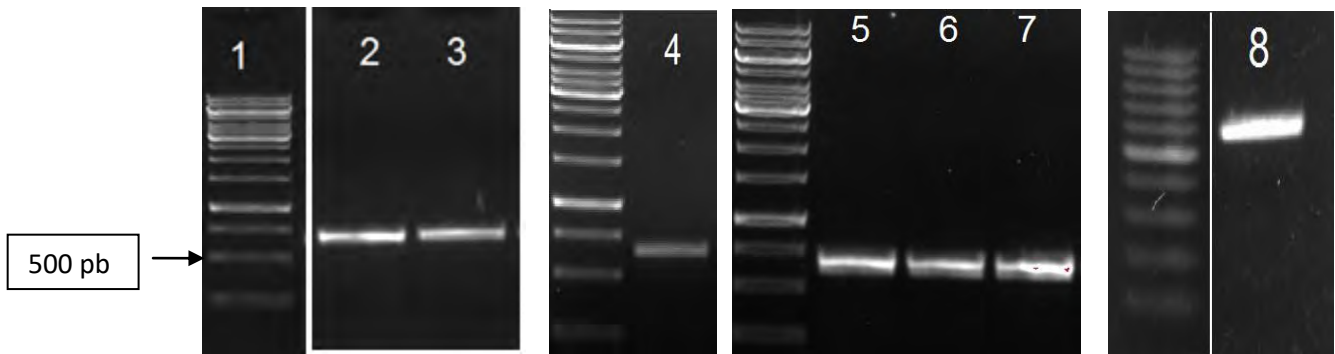
ITS2 (538pb)

Condiciones Jeanson



- | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 Marcador de peso molecular DNA | 5 Chaya Chiapas (seco). Herbario 93 |
| 2 Chaya Yucatán (fresco). Réplica A | 6 Chaya Honduras (seco). Herbario 23 |
| 3 Chaya Yucatán (fresco). Réplica B | 7 Chaya Campeche (seco). Herbario 63 |
| 4 Chaya Yucatán (seco). Herbario 37 | 8 Chaya Central de Abastos (seco) |

Anoda cristata (Alache) *rbcL (654pb)*



- | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 1 Marcador 250 a 10,000 pb | 6 Alache Ozumba 2 (seco) |
| 2 Alache D.F. (fresco). Réplica 1 | 7 Alache Ozumba 3 (seco) |
| 3 Alache D.F. (fresco). Réplica 2 | 8 Alache Ozumba 2 (cocinado) |
| 4 Alache Oaxaca (fresco) | 9 Alache Puebla (seco). Herbario 48 |
| 5 Alache Edo. Mex. 1 (seco) | 10 Alache Puebla (seco). Herbario 71 |
- Condiciones de ciclado Kress (52°C)

APÉNDICE A

Formulación de los alimentos evaluados por qPCR

Las recetas descritas a continuación fueron realizadas por estudiantes del laboratorio de Análisis sensorial a cargo de la Maestra Patricia Severiano Pérez en el Anexo del laboratorio 4D del Edificio A de la Facultad de Química. Agradecimiento especial a Fabiola Alcántara Ayala por la información y las muestras proporcionadas. Su proyecto de tesis denominado: *Perfil Sensorial de Especies Tradicionales Subvaloradas y Subutilizadas de México: Quelites* es fuente importante de información para este trabajo (Ayala, 2015).

ALACHES CALDOSOS

(Receta proporcionada por los vendedores de alaches en el mercado de Ozumba)

Formulación (g/100g)

Alaches crudos y secos (%)	Agua (%)	Cebolla (%)	Sal (%)	Tequesquite (%)
33.3	55.6	10.8	0.2	0.1

Los pasos que se siguieron para la preparación de las muestras son los siguientes:

1. Poner a fuego medio los alaches en una olla de barro con el agua y dejar hervir.
2. Por separado, en 100 mL de agua, disolver 2 o 3 piedras de tequesquite y la sal. Decantar el tequesquite, añadiendo solo el sobrenadante a los alaches.
3. Añadir la cebolla picada.
4. Agitar hasta que estén bien cocidas las hojas de alaches, 30 minutos aproximadamente.

ARROZ CON CHEPIL

(Receta tomada de *Tradiciones Gastronómicas Oaxaqueñas*) (Guzmán de Vázquez, 1982)

Formulación (g/100g)

Forma de preparación	Chepil (hojas) crudo seco (%)	Arroz (%)	Caldo de Pollo (%)	Cebolla (%)	Ajo (%)	Sal (%)
Arroz	0.6	30.4	60.7	7.6	0.4	0.3

1. Remojar el arroz en agua caliente por 10 min.

2. Escurrir y lavar después con agua fría hasta que el agua salga casi transparente.
3. Se escurre muy bien y en aceite caliente se fríe; sin dejar que dore se escurre la grasa.
4. Agregar la cebolla y el ajo finamente picado y se deja freír a que sazone, después el caldo de pollo y por último las hojas de chepil.
5. Sazonar con sal, se tapa y se baja el fuego para que se cueza bien.

TAMALES DE CHEPIL (Formulación 4 y 5)

Receta de tamal de la Chef Alma Cervantes del Restaurante Azul y Oro de la Torre de Ingeniería de la UNAM.

Se siguió el mismo procedimiento de la Formulación 3, pero se realizaron algunos cambios en la formulación. Uno de ellos fue omitir el agua porque la masa estaba congelada y al batirla ésta tomó una consistencia aguada. Sin embargo al finalizar la cocción se observó que era necesario adicionar el agua a la formulación, si no quedan con una apariencia y textura seca.

Formulación para preparar 1 kg de tamales

Lugar de Procedencia de Chepil Pueblo/Estado	Formulación	Cantidad de chaya fresca (%)	Cantidad de chaya deshidratada (%)	Masa nixtamalizada de molino (5)	Masa para tamal -Maseca®- (%)	Harina de maiz -Minsa®- (%)	Manteca (%)	Agua (%)	Sal (%)	Royal (%)
San Antonino (Cultivado)/Oaxaca	4	-	2.4	71.3	-	-	17.8	7.1	0.7	0.7
San Antonino (Silvestre)/Oaxaca	5	-	2.4	71.3	-	-	17.8	7.1	0.7	0.7
San Antonino (Cultivado)/Oaxaca	7	-	1.4	72	-	-	18	7.2	0.7	0.7
San Antonino (Silvestre)/Oaxaca	8	-	1.4	72	-	-	18	7.2	0.7	0.7

Por otro lado, para las formulaciones 4, 5 y 6 se aumentó la cantidad de sal de 0.4% a 0.7%. Así como la cantidad de chepil de 0.7% a 2.4% (Formulación 4 y 5) y 2.6% Formulación 6), casi 3 veces más la concentración que inicialmente se había añadido a la formulación 3. La diferencia entre las tres formulaciones es que el chepil utilizado provenía de diferentes lugares. Pero de acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió realizar las Formulaciones 7 y 8 la cuales contenían 1.4% de chepil (valor intermedio entre la mínima y máxima concentración de chepil utilizado 0.7% y 2.6%).

TAMALES DE CHAYA (Formulación 1)

De acuerdo a la receta consultada en línea: (Blog Yucatán, 2013)

Formulación para 1 kg de tamales

Lugar de Procedencia de Chepil Pueblo/Estado	Formulación	Cantidad de chaya fresca (%)	Cantidad de chaya deshidratada (%)	Masa nixtamalizada de molino (5)	Masa para tamal -Maseca®- (%)	Harina de maíz -Minsa®- (%)	Manteca (%)	Agua (%)	Sal (%)	Royal (%)
San Miguel Peras/Oaxaca	1	4.6	-	85.5	-	6.8	1.1		2.0	-

1. Se revuelve la masa de maíz (de molino), si está muy pegajosa se le añade masa en polvo y Minsa® en cantidades iguales.
2. Se agrega la manteca y se bate en aproximadamente por media hora, hasta que la consistencia sea manejable, es decir ni muy dura ni muy aguada.
3. Se agrega la sal.
4. Lavar y desinfectar las hojas de chaya, picar finamente y agregar a la mezcla anterior.
5. Una vez lista la masa de tamal, se van formando los tamalitos sobre pedazos de hojas de plátano (previamente asadas), con las que se envuelven uno a uno, para luego ir acomodando en una olla (express) o vaporera.
6. Se dejan cocer aproximadamente media hora.

TAMALES DE CHAYA (Formulación 3 y 4)
(Receta proporcionada por la Chef Alma Cervantes)

Formulación para 1kg de tamales

Lugar de Procedencia de Chepil Pueblo/Estado	Formulación	Cantidad de chaya fresca (%)	Cantidad de chaya deshidratada (%)	Masa nixtamalizada de molino (5)	Masa para tamal -Maseca®- (%)	Harina de maíz -Minsa®- (%)	Manteca (%)	Agua (%)	Sal (%)	Royal (%)
Mercado de Tlacolula/Oaxaca	3	-	0.7	72.8	-	-	18.2	7.3	0.4	0.7
San Antonino (Cultivado)/Oaxaca	4	-	2.4	71.3	-	-	17.8	7.1	0.7	0.7

1. Se desvena la chaya y se lava al chorro de agua.
2. Se hierva agua y en ella se cuece la chaya alrededor de 3 minutos (hasta que cambie de color, las hojas no deben deshacerse).
3. Se deja reposar la chaya junto con su agua de cocción.
4. Una vez fría la chaya, se corta finamente y se reserva, en lo que se prepara la masa.
5. Para la preparación de la masa, se bate la manteca junto con el royal hasta que ésta tenga un aspecto brillante y semilíquida.
6. Se agrega la mitad de la masa e incorporar con la manteca; el movimiento es de las manos es como si se estuviera lavando (arriba y abajo).
7. Se incorpora el agua (deberá ser la que se obtiene de la cocción de la chaya) y la sal, se sigue amasando.
8. Una vez integrados todos los ingredientes se agrega la chaya.

9. Con las hojas de plátano ya brillantadas, se coloca del lado no brillante 2 cucharas o media taza de masa en cada hoja. Se envuelven uno a uno los tamalitos y se cubren con kleen pack (este ayudará a que el agua que contiene la masa no se pierda y que el vapor que genere se concentren aún más. También permite que al recalentarse no se sequen los tamales).
10. Al acomodarlos para que se cuezan, deberán colocarse como ladrillos, esto permitirá que el vapor suba entre los tamales y se cuezan uniformemente.
11. A partir de que empiece a salir el vapor por la tapadera de la olla, deberá reducirse la temperatura a la mitad y a partir de ese momento contarle 1.5 horas, ni un minuto más, ni un minuto menos, no importa la cantidad de tamales.
12. Una vez transcurrido el tiempo de cocción, no destapar ni mover la olla, hasta después de 15 minutos.

APENDICE B

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE DNA DE QUELITES PARTIENDO DE ALIMENTOS PREPARADOS

Matriz: Caldo de Alaches

- 1.- Retirar 5 hojas de alache del caldo y enjuagar con agua destilada.
- 2.- Con ayuda de una espátula o cuchillo fragmentar en trozos muy pequeños y pesar 200 mg de tejido en un tubo para centrifuga de 2mL.
- 3.- Agregar 1.5mL de buffer de lisis, 3uL de proteinasa K y agitar en vortex a velocidad alta durante 1 min.
- 4.- Agregar dos perlas de tungsteno de 3mm y agitar a 900 rpm durante el periodo de incubación.
- 5.- Continuar con el protocolo de extracción como lo describe el kit de extracción Mericon Food de QIAGen.

Matriz: Tamal de Chaya

- 1.- Cortar el tamal por la mitad y con ayuda de una espátula o pinzas retirar los trozos grandes de chaya y colocarlos sobre una superficie plana.
- 2.- Con ayuda de un cutter o cuchillo fragmentar en trozos muy pequeños y pesar 200mg de tejido en un tubo para centrifuga de 2mL.
- 3.- Agregar 1.5mL de buffer de lisis, 3uL de proteinasa K y agitar en vortex a velocidad alta durante 1 min.
- 4.- Agregar dos perlas de tungsteno de 3mm y agitar a 900 rpm durante el periodo de incubación.
- 5.- Continuar con el protocolo de extracción como lo describe el kit de extracción Mericon Food de QIAGen.

Cuando la chaya se encuentre mezclada con la masa del tamal lo más conveniente es realizar una homogenización en stomacher (30s a velocidad baja) de aprox. 200g de tamal en 250mL de agua destilada y pasar la solución a través de una gasa o papel filtro de poro grande para retener los fragmentos más grandes de chaya y recuperarlos más fácilmente.

Matriz: Tamal de chepil

- 1.- Cortar el tamal por la mitad y con ayuda de una espátula o pinzas retirar las hojitas de chepil en un tubo para centrifuga de 2mL.
- 2.- Agregar 1.5mL de buffer de lisis agitar en vortex a velocidad alta durante 1 min.
- 3.- Traspasar la solución a tubos de homogenización para el equipo disruptor tissue lysser.

4.- Agregar dos perlas de tungsteno de 3mm a cada tubo y homogenizar durante 2m a 30 hz en el tissue lysser.

5.- Regresar la solución a los tubos de centrifuga, añadir 3uL de proteinasa K, agregar 2 perlas de tungsteno de 3mm e incubar en thermomixer por media hora a 900 rpm a 60°C.

6.- Continuar con el protocolo de extracción como lo describe el kit de extracción Mericon Food de QIAGEN.

Cuando el chepil se encuentre mezclado con la masa del tamal lo más conveniente es realizar una homogenización en stomacher (30s a velocidad baja) de aprox. 200g de tamal en 250mL de agua destilada y pasar la solución a través de una gasa o papel filtro de poro grande para retener los fragmentos más grandes de chepil y recuperarlos más fácilmente.

REFERENCIAS

Ardón, C., 2008. “*Descripción y uso de especies con propiedades medicinales en las comunidades de San Francisco Chancó, Salitrón, y Corral de Piedra, de la microcuenca del Río Chancó, del Municipio de San Juan Ermita, Departamento de Chuquimula*”. [Tesis en línea] Chiquimula, Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp.74. Disponible en: http://cunori.edu.gt/descargas/DESCRIPCIN_Y_USO_DE_ESPECIES_CON_PROPIEDADES_MEDICINALES_EN_LAS_COMUNIDADES_DE_SAN_FRANCISCO_CHANC_SALIT.pdf. [Último acceso: noviembre de 2015].

Arias, L., Losada, H., et al. 2003. “Evaluation of Chipilín (*Crotalaria longirostrata*) as a forage resource for ruminant feeding in the tropical areas of Mexico”, *Livestock Research for Rural Development*. (15) 4. Retrieved August 25, México D.F.

Avila, E., 2015. “*Quelites y capulines en dieta escolar*”. EL UNIVERSAL [En línea]. Disponible en: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/estados/2015/07/10/quelites-y-capulines-en-dieta-escolar> [Último acceso: 6 de marzo de 2016].

Ayala, F., 2016. “Perfil sensorial de especies tradicionales subvaloradas y subutilizadas de México: quelites”. México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2016/febrero/306069716/Index.html> [Último acceso: 13 de marzo de 2017].

Badui, S. 2006. *Química de los alimentos*. Cuarta Edición: México. Pp. 567-569

Bazzano, LA, Serdula MK, Liu S. 2003. “Dietary Intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease”. *Rev PUBMED US National Library of medicine*. 5(6): 492-499.

Bernal, L. y Rendón, B., 2011. “Diferenciación fenotípica en poblaciones de *Anoda cristata* con diferente grado de manejo”. [Tesis en línea] México, Universidad Autónoma Metropolitana. Disponible en: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI15437.pdf> [Último acceso: 6 de marzo de 2016].

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. *Chaya. Cnidoscolus chayamansa* McVaugh.[En línea] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. [Último acceso: 6 de marzo de 2016].

Bottero, M. y Dalmasso, A., 2011. “Animal especies identificación in food products. Evolution of Biomolecular methods”. *The Veterinary Journal*. 190. Pp. 34-38

Bourges, H., Morales, J., Escobedo, G., Camacho, E. 1996. Tablas de composición de alimentos. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F. pp. 248.

Bye, R., 1981. Ethnoecology of edible greens-past, present, and future. *Journal of Ethnobiology*.1 (1): 109-123.

Bora, L., 2010. Principles of Paleobotany. *International Scientific Publishing Academy*. New Delhi. Pag. 121-125, 125-126.

Bye, R., 2013. Todo sobre quelites. Especies Vegetales poco valoradas. Una alternativa para la seguridad alimentaria. [En línea] Disponible en: <http://redquelites.blogspot.mx/2013/02/especies-vegetales-poco-valoradas-una.html> [Último acceso: noviembre de 2016]

Bye, R. y Linares E., 2000. Los quelites, plantas comestibles de México: una reflexión sobre intercambio cultural. *Biodiversitas*. 31. Pp. 11-14

BOLD. *BoldSystems V3*. 2013. [En línea] (Actualizado a 2013) Disponible en: <http://www.boldsystems.org/> [Último acceso: 12 de octubre de 2015]

Carisaghi, M. et al., 2010. “DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method”. PUBMED. PMID: 20156987. 11(4): Pp440-53

Castro-Lara, Bye-Boettler et al., 2014. Revalorización, conservación y promoción de quelites. *Revista AgroProductividad*. CONACyT 17 (1).

Castro-Lara, Basurto-Peña, et al., 2011. Los quelites, tradición milenaria en México. Universidad autónoma de Chapingo. Red Quelites. Pp 8, 9, 12

Chávez, E., Roldán J., et al. 2009. “PLANTAS COMESTIBLES NO CONVENCIONALES EN CHIAPAS, MÉXICO”. Hospital General Zona II, Instituto Mexicano del Seguro Social (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; México). *Revista de salud pública y nutrición*. 10 (2)

Chen S., Yao H., et al. 2010. “Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species”. *Plos One* 5(1).

Chízar, C., et al., 2009. “Plantas comestibles de Centroamérica” - 1ª ed. - Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio. Pag. 195 <http://www.inbio.ac.cr/web-ca/biodiversidad/regional/PlantasComestiblesCA-VE.pdf> [Último acceso: Agosto de 2016].

CIMMYT., 2012. Estadísticas y tendencias de la industria molinera en México. 7º Simposio internacional del trigo. Estadísticas y tendencias de la industria molinera en México. Mazatlán, Sinaloa. Presentación en línea. <http://www.slideshare.net/CIMMYT/simposio-trigo-2012> [Último acceso: 17 de Abril de 2014]

CONABIO., 2016. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Biodiversidad Mexicana. Grupo de países megadiversos afines. http://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/internacional/paises_megadiversos.html . [Último acceso: 21 de Mayo de 2017]

CONACYT. 2008. “Código de Barras, una alternativa para estudiar la biodiversidad. El futuro de los códigos de barras”. *Ciencia y desarrollo, el conocimiento a tu alcance*. [En línea]

<http://www.cyd.conacyt.gob.mx/215/Articulos/Codigo/Codigo6.html> [Último acceso: 14 de Mayo de 2014].

Cifuentes, R., et al. 2009. "Caracterización botánica, molecular, agronómica y química de los cultivares de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) de Guatemala". *Revista 21 de la Universidad del Valle de Guatemala*. Pp 34-49.

Contreras-Díaz, D. y Cruz-Durán R., 2014. Una especie nueva de Anoda de Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, pp. 677-681.

Duana, A. y Benítez, M., 2010. "Situación actual de los alimentos en México". *Observatorio de la Economía Latinoamericana*. 127. Disponible en línea: http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icea/LI_EcoReg/Danae_Duana/alimentos.pdf [Último acceso: 17 de Abril de 2014].

ENIGH. Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares 2012. INEGI. Encuestas en hogares. Página en línea. <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/Proyectos/encuestas/hogares/regulares/enigh/> [Último acceso: 16 de Abril de 2014].

ENSANUT MC, 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición y Nutrición de medio camino. Disponible en línea: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/encuestas/resultados/ENSANUT.pdf> [Último acceso: 04 de Febrero de 2017]

ePIC, 2015. (Electronic Plant Information Centre). Royal Botanic Gardens, Kew (2002). Published on the Internet; <http://epic.kew.org/epic/> [Último acceso: 26 Octubre 2015].

EUFIC, 2012. European Food Information Council. INFORMES EUFIC 01/2012 <http://www.eufic.org/article/es/page/RARCHIVE/expid/Consumo-frutas-verduras-Europa/>

Euromonitor International. Country report. Carbonates in Mexico. (2017)

FAO <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro11/cap2.htm>

Figueroa, J., 2009. "*Cnidoscolus chayamansa*, *Ruta Graveolens* y *Citrus aurantium*". *Rev. Bras. Farmacogn., Pharmacogn.*19(4).

Galimberti, A., et al., 2012. "DNA Barcoding as a new tool for food traceability". *Journal of Food Research International*. 50, pp. 55-63.

Gálvez, M. y Peña, C. 2015. "Revalorización de la dieta tradicional mexicana: Una vision interdisciplinaria". *Revista digital universitaria*. 16 (5). ISSN 1607-6079

Grasroot-gardens, 2016. Página de ciencias. Disponible en línea. http://www.grassrootsgardens.org/uploads/2/6/3/8/26383225/gardenmosaics_sciencepages-sp.pdf . [Última consulta: 24 de Mayo de 2017]

Harish, F., et al., 2003. “Physiological and antioxidant responses of cotton and spurred anoda under interference and mild drought”. *Journal of Experimental Botany*. 54 (391). pp. 2293-2305.

Integrated DNA Technologies. IDT, 2015. Disponible en línea en: <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index> [Último acceso el 14 de octubre de 2015].

INCHEM, 2004. Chemical Safety Information from intergovernmental organizations. Concise International Chemical Assessment. Document 61. Hydrogen Cyanide and Cyanides: human health aspects. Disponible en línea: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad61.htm> [Último acceso: Octubre de 2105]

ITIS (Integrated Taxonomic Information System) *Cnidoscolus aconitifolius* from the on-line database, <http://www.itis.gov>. [Último acceso: 26 de Octubre de 2015].

Jeanson, M., 2011. “DNA barcoding: a new tool for palm taxonomist?” *Annals of botany*. 108: 1445-1451. N.Y

Juárez- Reyes K, Brindis F., et al., 2014. “Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*”, Facultad de Química e Instituto de Biología. UNAM, México.

Knebelberger, T. and Stoger I., 2012. DNA Extraction. Preservation, and Amplification. En: Kress, W. J. and Erickson, D. L., DNA Barcodes: Methods and Protocols. Humana Press, pag. 333.

Kress, W. J. and Erickson, D. L. 2012. DNA Barcodes: Methods and Protocols. In: *DNA Barcodes: Methods and Protocols*. Humana Press, (Methods in molecular biology) pp.3-8.

Linares, E., 2012. Conferencia: "La ciencia detrás de la dieta tradicional mexicana y alimentos funcionales, el caso de los quelites". Simposio: Revalorando la dieta tradicional mexicana, aspectos culinarios, socioeconómicos, científicos y culturales. Semana de la Ciencia y la Innovación D.F. México.

Linares, E., 1992. “Los quelites. Un tesoro culinario”. Todo sobre quelites. Portal web. <http://redquelites.blogspot.mx/2013/01/los-quelites-un-tesoro-culinario.html> [Último acceso: Noviembre de 2014].

Mangan, F., Moreia M. et al. (2009). “Malezas de México, 2004. Portal Web CONABIO. *Malvaceae. Anoda cristata* (L.) Schltld. [En línea]. (Actualizado 24 de Julio de 2009). Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/malvaceae/anoda-cristata/fichas/ficha.htm#9.%20Referencias> [Último acceso: 6 de Marzo de 2015].

How to Get Fresh Produce into the Boston Food System: Example of East Boston and Chipilín”. Dept. Plant, Soil & Insect Sciences, French Hall. University of Massachusetts, Amherst. Disponible en línea.

http://www.newenglandvfc.org/pdf_proceedings/2009/HGFPitBFS.pdf. (Consultada en Septiembre de 2015)

Marin, A., 1981. “La chaya”. INIREB Informa, no.45. Icones. Geog=4 Systematics: ANGIOSPERMAE (EUPHORBIACEAE: CNIDOSCOLUS) (IR 198103551).

Mendoza-Revilla, J., 2012. “Aportes de la filogenética a la investigación médica”. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú. *Rev Med Hered.* 23(2):119-127.

Mera, L., M., D. Castro, R.A. Bye (Compiladores). 2011. “Especies vegetales poco valoradas: una alternativa para la seguridad alimentaria”. *UNAM-SNICS-SINAREFI*. Pag. 215. México, DF.

MEXBOL, 2010. <http://www.mexbol.org/index.php?cmd=user:home>

Morton, J., 1994. “Pito (*Erythrina berteroana*) and Chipilin (*Crotalaria longirostrata*), (Fabaceae), two soporific vegetables of Central America”. *Econ. Bot.* 48. Pp. 130-138.

Nabhan, G. 1985. *Gathering the dessert*. Tucson: The University of Arizona Press. Pag. 94.

NOM-051. Norma Oficial Mexica NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Información comercial y sanitaria.

Quezada T., Hacero Ma. Gpe, et al., 2007. “Evaluación del contenido de minerales y ácido cianhídrico en hojas de chaya (*Cnidocolus chayamansa*) con tres niveles de fertilización orgánica y química”. Memorias IX congreso de ciencia de los alimentos y v foro de ciencia y tecnología de alimentos, Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad de Guanajuato, México. pp. 63 -70.

Ratnasingham, S. y Hebert, P., 2007. “Bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>)” *Molecular Ecol Notes.* 7(3): Pp: 355–364

Recetas mexicanas. Portal web <https://www.recetas-mexicanas.org/>. [Último acceso: Febrero de 2017].

Rendon, B., Bye, R., Nuñez F. J., 2001. “Ethnobotany of *Anoda cristata* (L.) Schl. (Malvaceae) in Central Mexico: uses, management and population differentiation in the community of Santiago, Mamalhuazuca, Ozumba, State of Mexico”. *Econ. Bot.* 55. (4): 545-554.

Rivadeneira-Dominguez, E., Rodríguez-Landa J., Salas-Montero D., 2012. “Neuropatía atáxica tropical y Konzo asociadas al consumo excesivo de Yuca”. *Arch. Neurocién* (Mex) Vol 17, N°1. Pp. 45-48. Disponible en línea en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/arcneu/ane-2012/ane121f.pdf> [Último acceso: Septiembre de 2015].

Ross-Ibarra, J. and Molina-Cruz, A. 2002. “The ethnobotany of chaya”. *Econ. Bot.* 56(4):350-365

Royal Botanic Gardens, Kew, 2002. Electronic Plant Information Centre. Portal web. Consultado en <http://epic.kew.org/epic/> [Último acceso: 29 de Abril de 2014].

Sandoval-Zapotitla E., García-Cruz J, Terrazas T y Villaseñor J., 2010. “Relaciones filogenéticas de la subtribu Oncidiinae (Orchidaceae) inferidas a partir de caracteres estructurales y secuencias de DNA (ITS y matK): un enfoque combinado”. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 81. Pp 263-279.

SIIT. Sistema Integrado de Información Taxonómica. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Fecha de consulta: 15 de Mayo de 2014 http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxaget?p_ifx=itismx&p_lang=es

SINAREFI. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. RED QUELITE. Disponible en: http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_quelite.html#cajaInformes. [Último acceso: 9 de Febrero de 2017].

Spillari-Figueroa, M.M., 1983. Composición química de diferentes cultivos de hierbamora (*Solanum sp.*), chipilín (*C. longirostrata*) y amaranto (*Amaranthus spp.*) Tesis Universidad Rafael Landívar. Guatemala, Instituto de Ciencias Ambientales. pp41

The PLANTS Database. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. <http://plants.usda.gov> [Último acceso 26 de Octubre de 2016].

The Plant List 2013. Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> [Último acceso 27 de Octubre 2016].

ThermoFisher Scientific. Taqman® chemistry vs. SYBR® chemistry for Real Time PCR. <https://www.thermoFisher.com/mx/es/home/life-science/pcr/> [Último acceso 18 de Febrero de 2017].

UNICEF. México. Salud y Nutrición. Portal Web: <http://www.unicef.org/mexico/spanish/17047.htm> [Último acceso: 15 de Abril de 2014].

Valenzuela, R., Morales M., *et al.*, 2015. *Cnidoscopus chayamansa* hidropónica orgánica y su capacidad hipoglucemiante, calidad nutraceutica y toxicidad. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*. 6 (4). Pp 815-825.

Valle, P., 2006. Tóxicos presentes en los alimentos. **En:** Badui, *Química de los alimentos*. Cuarta edición. México: Pearson Education. Pp 567, 568.

Velásquez, L., “Chepil: Oro verde alimenticio.” Nota periodística. Noticias.net.mx. <http://noticiasnet.mx/portal/oaxaca/general/agropecuarias/248604-chepil-oro-verde-alimenticio> [Último acceso: Septiembre de 2016].

Villaseñor, J., *et al.* 2016. “Checklist of the native vascular plants of Mexico”. Taxonomy and systematics. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87. Pp 559-902.

Wiley, E. y **Lieberman, B.**, 2011. *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Segunda Edición. Wiley.Blackwell: NewJersey. Pp 3-7, 24, 85

Wiley, B., 2014. "Novel Planta Bioresources Application in Food, Medicine and Cosmetics". Ameenah Gurib-Fakim. UK. Pp.10.

Wu-Leung, W.T. y **Flores, M.** 1961. Tabla de composición de alimentos para uso en América Latina. Guatemala, C.A., INCAP/ICNND.

Más información sobre las muestras herborizadas en:

Instituto de Biología. "***Cnidoscolus aconitifolius (Mill.) I. M. Johnst.*** - ***IBUNAM:MEXU:PV112030***".

UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-05-27.

Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2014-6-9.

Disponible en:

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV112030>

Instituto de Biología. "***Anoda cristata (L.) Schldl.*** - ***IBUNAM:MEXU:PVsn20720***".

UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-05-27.

Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2014-6-9.

Disponible en:

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PVsn20720>