

Genómica del almidón y bioarqueología - Revisión

Gabriel Dorado ¹, Francisco Javier S. Sánchez-Cañete ², Plácido Pascual ³,
Inmaculada Jiménez ⁴, Fernando Luque ⁵, Margarita Pérez-Jiménez ¹, Patricia
Raya ⁶, Manuel Gálvez ⁷, Jesús Sáiz ⁸, Adela Sánchez ⁸, Teresa E. Rosales ⁹
Víctor F. Vásquez ⁹, Pilar Hernández ¹⁰

¹ Autor para correspondencia, Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Campus Rabanales C6-1-E17, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba (Spain), eMail: <bb1dopeg@uco.es>; ² EE.PP. Sagrada Familia de Baena, Avda. Padre Villoslada 22, 14850 Baena (Córdoba); ³ Laboratorio Agroalimentario de Córdoba, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 14004 Córdoba; ⁴ IES Puertas del Campo, Avda. San Juan de Dios 1, 51001 Ceuta; ⁵ Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba, Ctra. Madrid-Cádiz km 395, 14071 Córdoba; ⁶ Servicio de Protección Radiológica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁷ Dep. Radiología y Medicina Física, Unidad de Física Médica, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁸ Dep. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pidal, s/n, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba; ⁹ Centro de Investigaciones Arqueobiológicas y Paleoeológicas Andinas ARQUEOBIOS, Apartado Postal 595, Trujillo (Perú); ¹⁰ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14080 Córdoba

RESUMEN

La glucosa se almacena preferentemente como almidón en las plantas. Por tanto, los restos de tal polisacárido pueden representar una fuente inestimable de información arqueológica. La genómica, proteómica y rutas metabólicas pueden ser también explotadas para determinar eventos cruciales en procesos filogenéticos. Estos incluyen la reconstrucción de eventos de poliploidización en plantas y la identificación de posiciones taxonómicas. Estos desarrollos son particularmente relevantes para el estudio de procesos de selección, evolución y domesticación de microorganismos, plantas y animales. Incluyen la adaptación a tal recurso alimentario y el estudio de las paleodietas y sus implicaciones para animales ancestrales y modernos, incluyendo los humanos. *Palabras clave:* arqueobotánica, ADN antiguo, aDNA, secuenciación, dendrograma, árbol filogenético, gen, proteína, ruta metabólica.

Abstract

Glucose is preferentially stored as starch in plants. Thus, the remains of such polysaccharide may represent an invaluable source of archaeological evidence. The genomics, proteomics and metabolomics pathways can be also exploited to ascertain key events in phylogenetic processes. This includes the reconstruction of polyploidization events in plants and the identification of taxonomic positions. These developments are particularly relevant for the study of selection, evolution and domestication events of microorganisms, plants and animals. They include the adaptation to such food resource and the study of paleodiets and their implications for ancient and modern animals, including humans.

Key words: archaeobotany, ancient DNA, aDNA, sequencing, dendrogram, phylogenetic tree, gene, protein, biochemical pathway.

Introducción

Aunque los lípidos tienen más energía por peso seco que los glúcidos, estos últimos son el sustrato-energético preferente de las células. Ello se debe a que el catabolismo en las células vivas está diseñado principalmente para usar glúcidos. Por lo tanto, la energía puede obtenerse de una manera más fácil y rápida de los glúcidos como sustratos. Más específicamente, la glucosa es el mejor sustrato para el catabolismo. Por lo tanto, las células han desarrollado vías anabólicas para almacenar glucosa como fuente de energía química. Estas incluyen la biosíntesis de almidón en las plantas y glucógeno en los animales. El almidón está constituido de dos tipos de moléculas: 20 a 25% de amilasa (lineal y helicoidal) en peso y 75 a 80% amilopectina (ramificada), dependiendo cada especie de planta. Por otro lado, el glucógeno es una versión más ramificada de amilopectina (Figuras 1-3).

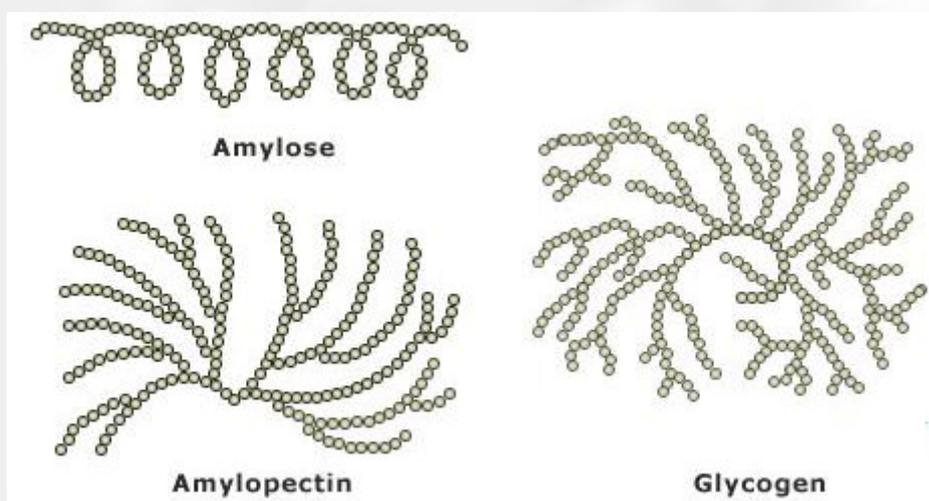


Figure 1. Estructura de bolas de la amilosa, amilopectina y glucógeno. Créditos: Storage polysaccharides. © 2006 NEUROtiker, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

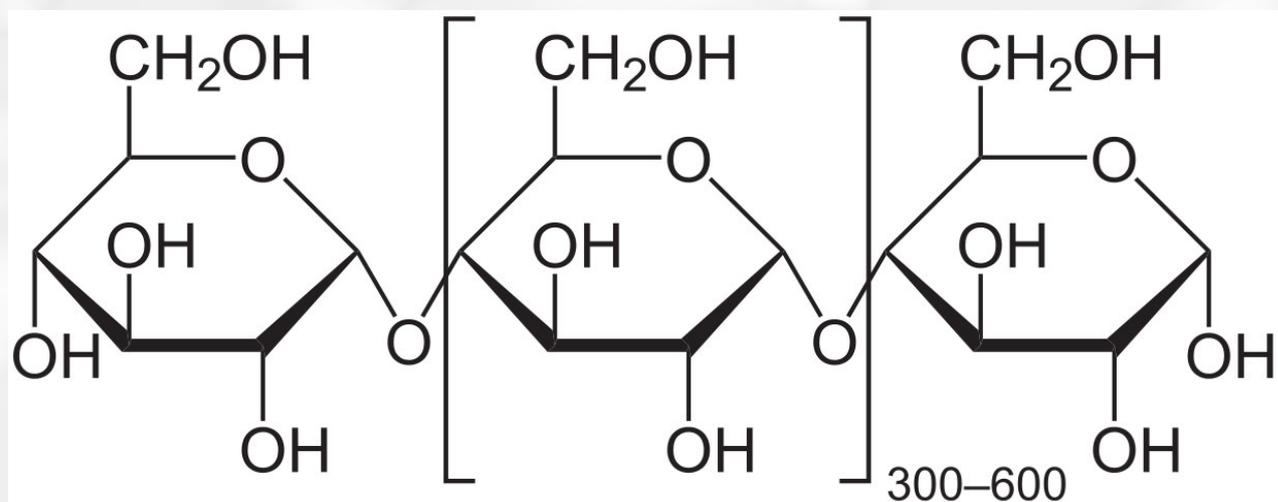


Figure 2. Estructura química de la amilosa. Créditos: Amylose. © 2007 NEUROtiker, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

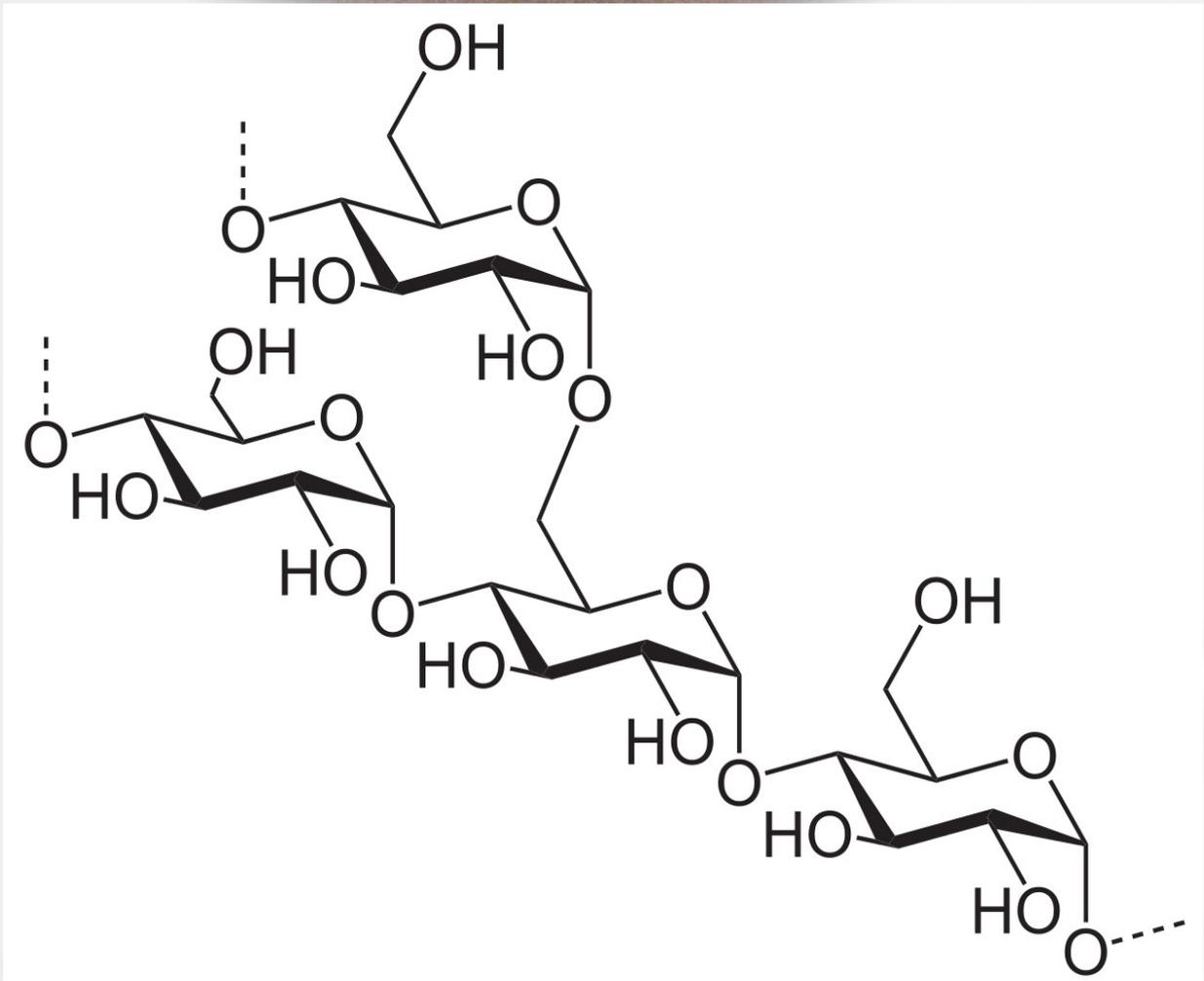


Figure 3. Estructura química de la amilopectina. Créditos; Amylopectin. © 2008 NEUROtiker, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

Por otro lado, los animales no contienen generalmente un alto porcentaje de glucógeno (que se almacena principalmente en el hígado y en menor cantidad en los músculos). De hecho, suelen tener otros componentes ricos en energía como las proteínas, que son generalmente menos abundantes en las plantas. Las plantas pueden acumular grandes cantidades de glucosa como el disacárido sacarosa (sucrosa) (hecho de glucosa y fructosa), como es el caso de la remolacha azucarera y la caña de azúcar. Otras plantas como la patata y los cereales (trigo, arroz, maíz, etc) almacenan glucosa en forma de almidón (Figura 4).

Curiosamente, los hongos también almacenan glucógeno, estando más relacionados con los animales que con las plantas, como lo demuestran los proyectos de secuenciación de genomas en los últimos años. Esto está también de acuerdo con el hecho de que la pared celular de los hongos no está hecha de celulosa (como la de las plantas), sino de quitina (como la de los artrópodos).

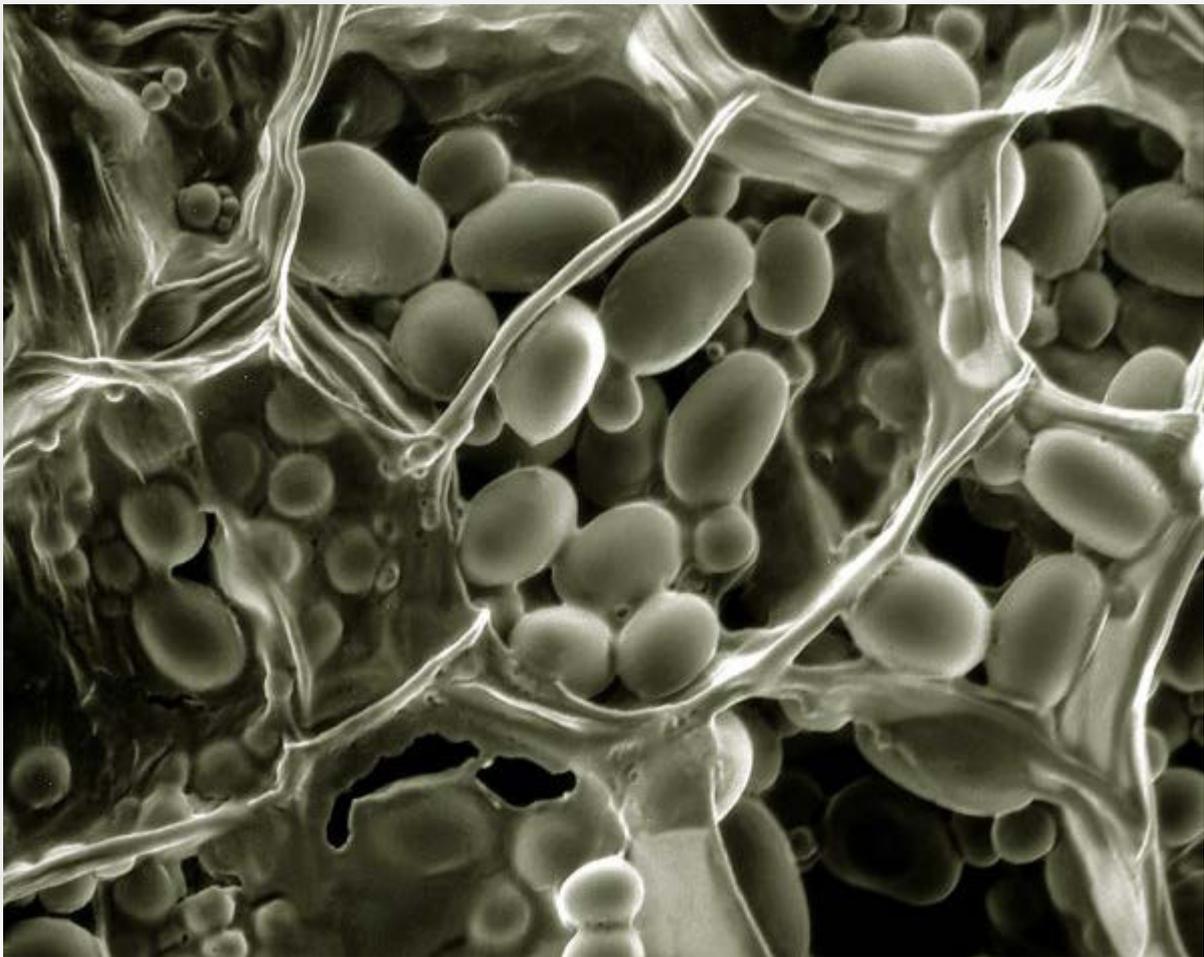


Figure 4. Fotografía de células de patata con almidón, obtenida mediante microscopio electrónico de barrido. Créditos: Potato cells. © 1998 Philippa Uwins, Wikimedia Commons <<http://commons.wikimedia.org>> y Creative Commons <<http://creativecommons.org>>.

Como consecuencia, los animales en general y los seres humanos en particular, han desarrollado rutas metabólicas para utilizar glucosa, sacarosa, almidón y glucógeno como fuentes de energía. Esto ha significado la adaptación hacia los recursos alimenticios disponibles, por medio de la evolución de las vías correspondientes, incluyendo genómica, proteínica y metabólica. Ello ha implicado también la selección y domesticación de los microorganismos, plantas y animales mejor adaptados a estas fuentes de alimento.

Es difícil encontrar restos de glucógeno para realizar estudios arqueológicos, por razones obvias. Pero, afortunadamente, los restos de almidón son relativamente comunes. Por lo tanto, tienen una gran importancia en bioarqueología, utilizándose para rastrear e inferir paleodietas, como se ha hecho con isótopos estables (Dorado et al, 2012). Los genes de la biosíntesis del almidón se utilizan también para estudios filogenéticos, como se describe a continuación.

Biosíntesis del almidón, genómica y evolución de las plantas

La biosíntesis del almidón y su acumulación son importantes para la supervivencia de las plantas, siendo considerada un proceso de output circadiano (Serrano et al, 2009). Además, el estudio de ADN antiguo y su comparación con los genomas modernos se ha convertido en una herramienta extraordinaria en la arqueología moderna, permitiendo realizar estudios filogenéticos y evolutivos (Dorado et al, 2007-2013). De este modo, los análisis de varios genes, incluyendo a los involucrados en la producción de almidón, han permitido revelar que los alelos actuales del maíz estaban ya presentes hace 4.400 años, aunque la selección alélica puede seguir actuando (Jaenicke-Despres et al, 2003; Dorado et al, 2011).

Otros resultados interesantes incluyen el gen *Shrunken 2* (*Sh2*), que codifica la subunidad grande de la ADP-glucosa pirofosforilasa (enzima principal de la biosíntesis del almidón del endospermo). Sorprendentemente, el polimorfismo de tal gen en teosinte (ancestro del maíz) en 50 accesiones de maíz fue muy bajo (genes muy conservados, al igual que sus secuencias de proteínas), en comparación con otros genes y proteínas. Esto indica una selección purificadora anterior a la domesticación. Un antiguo barrido selectivo en tal gen también fue descubierto cuando se compararon subespecies de *Zea mays* y grupos externos. Por lo tanto, los alelos *Sh2* fueron mantenidos por la selección natural antes de la domesticación de esas especies, sin posterior implicación en la domesticación de teosinte hasta el maíz cultivado (Manicacci et al, 2007).

Por su parte, el gen *waxy* (*Wx*) codifica una enzima sintasa unida a gránulos (del inglés, "granule-bound starch synthase"; GBSS), que interviene en la síntesis de amilosa en las plantas. Curiosamente, los análisis bioinformáticos han permitido proponer una transferencia antigua del gen *Gbss* del maíz (*Zea mays*) a *Dimeria lawsonii*. Así, la región polimórfica de los exones 8-9 fue amplificada mediante la reacción en cadena de polimerasa (del inglés, "polymerase chain-reaction"; PCR), secuenciada y alineada, generando el dendrograma correspondiente (árbol filogenético) (Baranov et al, 2014).

Por otro lado, la mayoría de los eucariotas son diploides, teniendo así dos conjuntos (pares homólogos) de cromosomas (uno heredado de cada padre). La duplicación de un cromosoma entero es conocida como poliploidización. Esto genera conjuntos adicionales de cromosomas, siendo especialmente común en las plantas vasculares (Pecinka et al, 2011). La poliploidización puede contribuir a la adaptación de las especies, y por lo tanto a su éxito evolutivo. Sin embargo, el estudio y la reconstrucción de la poliploidización pueden ser complicados, debido a las historias complejas de genes y genomas en plantas. Afortunadamente, los estudios filogenéticos del genoma, incluyendo los parálogos del gen *waxy* han permitido clarificar tales procesos (Yuan et al, 2006; Okuyama et al, 2012). En este sentido, la secuenciación del gen *Gbss* en la familia de las rosáceas reveló la presencia de varios loci, con diferencias en la presencia o ausencia de intrones y mutaciones en sitios de ajustamiento (del inglés, "splicing"). Tales estudios

filogenéticos han arrojado nueva luz sobre la evolución y especiación de dichas especies (Evans et al, 2000).

Además, los retroposones han sido propuestos como marcadores moleculares prometedores para analizar la evolución de las plantas poliploides. Así, la secuenciación del gen *Gbss* de especies diploides, tetraploides y hexaploides del grupo Geinae (Colurieae: Rosaceae), sugieren que las especies hexaploides fueron generadas mediante dos eventos consecutivos de alopoliploidización. Además, los eventos de especiación alopoliploide fueron relativamente antiguos (Geinae debe tener ~17 millones de años) (Smedmark et al, 2003). Asimismo, los análisis de los eventos de inserción de retroposones en el gen *Gbss* de la especie poliploide belladona (*Atropa belladonna*), han servido para identificar su posición taxonómica (tribu Hyoscyameae; familia Solanaceae) e historia de hibridaciones antiguas. Esto ha sido confirmado por los análisis filogenéticos de esta planta medicinal (Yuan et al, 2006).

Asimismo, el nenúfar conocido como loto sagrado (*Nelumbo nucifera*) también es relevante para los estudios filogenéticos de plantas con flores, como un eudicota (del inglés, "eudicot") basal. Además, se utiliza para fines médicos y ornamentales, siendo también una fuente de alimento. Su genoma se ha secuenciado recientemente, permitiendo así confirmar su posición evolutiva, lo que sugiere un interesante evento de duplicación de todo el genoma. Además, también fue encontrada una expansión de genes de sintasa de almidón. Ello debió estar probablemente relacionado con tasas mayores de almacenamiento y síntesis de almidón en los rizomas (Wang et al, 2013).

Fuentes de almidón y domesticación de especies

La presencia de restos de granos de almidón se ha utilizado para analizar la domesticación de plantas en los estudios arqueobotánicos (Piperno, 2012). Diversos análisis paleoecológicos, arqueobotánicos y de genética molecular sobre el ADN antiguo y el almidón se han utilizado para determinar el origen de la domesticación de plantas y por lo tanto de la agricultura (Zizumbo-Villarreal y Colunga-GarcíaMarín, 2010). Inicialmente se consideró que la agricultura permitió el desarrollo de asentamientos antiguos y de sociedades complejas, lo que eventualmente dio origen a rituales religiosos. Sin embargo, los sorprendentes descubrimientos en Göbekli Tepe (Turquía) han invertido dicha asunción, siendo el templo religioso más antiguo que se conoce. En otras palabras, como Klaus Schmidt dijo, "Primero llegó el templo, después la ciudad". De hecho, tal descubrimiento lo ha cambiado todo, en el sentido de que demuestra que la construcción de complejos templos monumentales fue realizada por los cazadores y recolectores, antes del establecimiento de sociedades agrícolas sedentarias y ciudades, con sus desarrollos posteriores de civilización (Dietrich et al, 2012)

Por otro lado, el estudio de ADN antiguo también ha demostrado la domesticación de lobos (*Canis lupus*) para dar lugar a perros (*Canis lupus familiaris*) (*Canis lupus*) (Dorado et al, 2009). Además, la secuenciación del genoma de estos animales ha revelado la evolución del metabolismo del almidón en el proceso de domesticación. En este sentido, se identificaron un

total de 10 genes que codifican proteínas con funciones clave en el metabolismo del almidón. Las mutaciones en estos genes deben haber contribuido al paso de una dieta carnívora (lobo) a una rica en almidón (perro), facilitando su adaptación y domesticación por las comunidades humanas (Axelsson et al, 2013).

La domesticación no sólo implica a las plantas y los animales, sino también a los microorganismos. En este sentido, *Aspergillus flavus* es un hongo saprófito, o filamentosos, saprófito y patógeno, ampliamente distribuido. Curiosamente, se considera que su antigua domesticación, a través de la fermentación del almidón en azúcares simples, dio lugar a *Aspergillus oryzae*. Por lo tanto, la selección experimental de los seres humanos, para aumentar la secreción de enzimas degradadoras del almidón, generó a la nueva especie, que es ampliamente utilizada actualmente (Hunter et al, 2011).

Almidón y paleodietas

Las antiguas civilizaciones consideraban el consumo de etanol (azúcares fermentados) y otras drogas como una forma de contacto con el mundo espiritual. Así, la fermentación del almidón para generar cerveza fue un proceso importante en civilizaciones como el antiguo Egipto, donde también se consumía como alimento básico. Algunos restos arqueológicos que contienen almidón han mostrado una microestructura muy bien conservada, siendo sometidos a distintos análisis, incluyendo la microscopía electrónica de barrido (del inglés "scanning-electron microscopy"; SEM). Esto ha revelado detalles interesantes del proceso de elaboración de la cerveza, como el uso en dátiles en lugar de pan como ingrediente estándar (Samuel, 1996).

Algunos restos arqueológicos de granos de almidón de patata (planta andina) tienen 6.000 años. Han sido identificados en los sitios precerámicos de la costa norte de Perú, revelando que no era un exclusivo cultivo andino. Por otra parte, los análisis microscópicos de los sedimentos adheridos a fragmentos de cerámica han permitido la visualización y el aislamiento de estos granos de almidón en las diferentes culturas prehispánicas de los Andes. De hecho, tales pruebas microbotánicas han permitido actualizar el registro arqueobotánico. De este modo, fue posible revelar la presencia de restos de almidón de dicha planta en la cerámica doméstica de la época Moche (200 a 700 años d.C.) (Vásquez y Rosales, 2014).

Por otro lado, las heces fosilizadas (coprolitos) pueden ser una fuente útil de datos arqueológicos. Pueden contener almidón entre otros restos, revelando así paleodietas. De esta manera, se ha encontrado que las dietas antiguas de los habitantes de algunas regiones del suroeste americano eran diversas y ricas en fibra, incluyendo plantas que contienen inulina en lugar de almidón. Curiosamente, esto puede estar relacionado con el hecho de que los descendientes actuales de dichas poblaciones son más propensos a la obesidad y diabetes de tipo II cuando consumen dietas occidentales ricas en almidón (Bryant y Reinhard, 2012).

Por otra parte, los antiguos esqueletos humanos, y en particular los restos dentales, pueden representar fuentes interesantes de datos arqueológicos. Esto es especialmente relevante para las partes comestibles de plantas, que pueden ser de otra manera difíciles de preservar en restos arqueológicos. Así, la presencia de almidón en los cálculos dentales ha revelado el consumo de plantas cultivadas. Esto ha permitido inferir dietas antiguas y actividades agropecuarias (Piperno y Dillehay, 2008).

Finalmente, los neandertales pertenecen a una subespecie extinta de *Homo sapiens* (*Homo sapiens neanderthalensis*), que comparte regiones del genoma con el hombre moderno (*Homo sapiens sapiens*) (Dorado et al, 2008, 2013). Algunos han propuesto que los neandertales no consumieron alimentos vegetales, lo que pudo favorecer su extinción. Sin embargo, el estudio de cálculos dentales de esqueletos neandertales ha revelado la presencia de granos de almidón. Su dieta incluyó dátiles, legumbres y cereales. Curiosamente, muchos almidones de semillas de cereales mostraron daños típicamente producidos durante el cocinado, lo cual sugiere una dieta sofisticada (Henry et al, 2011).

Conclusiones

El almidón es una fuente de alimento ubicuo en la naturaleza, como un eficiente almacenamiento de glucosa en las plantas. Por lo tanto, los restos de plantas y animales que contienen tales polisacáridos pueden representar fuentes inestimables de pruebas arqueológicas, como en el caso de las paleodietas. De esta manera, las rutas genómicas, proteómicas y metabolómicas del almidón son también herramientas útiles para determinar la filogenia y evolución de microorganismos, plantas y animales, incluyendo eventos de domesticación.

Agradecimientos. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (proyectos MINECO AGL2010-17316 y BIO2011-15237-E) e Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (MINECO e INIA RF2012-00002-C02-02); Consejería de Agricultura y Pesca (041/C/2007, 75/C/2009 y 56/C/2010), Consejería de Economía, Innovación y Ciencia (P11-AGR-7322 y P12-AGR-0482) y Grupo PAI (AGR-248) de la Junta de Andalucía; y Universidad de Córdoba (Ayuda a Grupos), Spain.

Referencias Bibliográficas

- Axelsson E, Ratnakumar A, Arendt ML, Maqbool K, Webster MT, Perloski M, Liberg O, Arnemo JM, Hedhammar A, Lindblad-Toh K (2013): The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature* 495: 360-364.
- Baranov YO, Slischuk GI, Volkova NE, Sivolap YM (2014): Bioinformatic analysis of maize granule-bound starch synthase gene. *Cytol Genet* 48: 150-154.
- Bryant VM, Reinhard KJ (2012): Coprolites and archaeology: the missing links in understanding human health. *Bulletin of the New Mexico Museum of Natural History and Science* 57: 379-387.

- Dietrich O, Heun M, Notrofft J, Schmidt K, Zarnkow M (2012): The role of cult and feasting in the emergence of Neolithic communities. New evidence from Gobekli Tepe, south-eastern Turkey. *Antiquity* 86: 674-695.
- Dorado G, Jiménez I, Rey I, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Rosales TE, Vásquez VF, Hernández P (2013): Genomics and proteomics in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 7: 47-63.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF (2009): Ancient DNA to decipher the domestication of dog (REVIEW). *Archaeobios* 3: 127-132.
- Dorado G, Rey I, Rosales TE, Sánchez-Cañete FJS, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P, Vásquez VF (2010): Biological mass extinctions on planet Earth (REVIEW). *Archaeobios* 4: 53-64.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2011): Ancient nucleic acids from maize - A review. *Archaeobios* 5: 21-28.
- Dorado G, Rosales TE, Luque F, Sánchez-Cañete FJS, Rey I, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Vásquez VF, Hernández P (2012): Isotopes in bioarchaeology - Review. *Archaeobios* 6: 79-91.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Luque F, Jiménez I, Morales A, Gálvez M, Sáiz J, Sánchez A, Hernández P (2008): Sequencing ancient and modern genomes (REVIEW). *Archaeobios* 2: 75-80.
- Dorado G, Vásquez V, Rey I, Vega JL (2007): Archaeology meets Molecular Biology (REVIEW). *Archaeobios* 1: 1-2.
- Evans RC, Alice LA, Campbell CS, Kellogg EA, Dickinson TA (2000): The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the Rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility. *Mol Phylogenet Evol* 17: 388-400.
- Henry AG, Brooks AS, Piperno DR (2011): Microfossils in calculus demonstrate consumption of plants and cooked foods in Neanderthal diets (Shanidar III, Iraq; Spy I and II, Belgium). *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 486-491.
- Hunter AJ, Jin B, Kelly JM (2011): Independent duplications of alpha-amylase in different strains of *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 48: 438-444.
- Jaenicke-Despres V, Buckler ES, Smith BD, Gilbert MT, Cooper A, Doebley J, Paabo S (2003): Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 302: 1206-1208.
- Manicacci D, Falque M, Le Guillou S, Piegu B, Henry AM, Le Guilloux M, Damerval C, De Vienne D (2007): Maize Sh2 gene is constrained by natural selection but escaped domestication. *J Evol Biol* 20: 503-516.

- Okuyama Y, Tanabe AS, Kato M (2012): Entangling ancient allotetraploidization in Asian *Mitella*: an integrated approach for multilocus combinations. *Mol Biol Evol* 29: 429-439.
- Pecinka A, Fang W, Rehmsmeier M, Levy AA, Mittelsten Scheid O (2011): Polyploidization increases meiotic recombination frequency in *Arabidopsis*. *BMC Biol* 9: 24 (7 pp).
- Piperno DR (2012): New archaeobotanical information on early cultivation and plant domestication involving microplant (phytolith and starch grain) remains. In Gepts P, Famula TR, Bettinger RL, Brush SB, Damania AB, McGuire PE, Qualset CO (Eds): "Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution and Sustainability". Cambridge University Press (Cambridge, UK): 136-159.
- Piperno DR, Dillehay TD (2008): Starch grains on human teeth reveal early broad crop diet in northern Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 19622-19627.
- Samuel D (1996): Archaeology of ancient Egyptian beer. *J Am Soc Brew Chem* 54: 3-12.
- Serrano G, Herrera-Palau R, Romero JM, Serrano A, Coupland G, Valverde F (2009): *Chlamydomonas CONSTANS* and the evolution of plant photoperiodic signaling. *Curr Biol* 19: 359-368.
- Smedmark JE, Eriksson T, Evans RC, Campbell CS (2003): Ancient allopolyploid speciation in *Geinae* (Rosaceae): evidence from nuclear granule-bound starch synthase (GBSSI) gene sequences. *Syst Biol* 52: 374-385.
- Vásquez VF, Rosales TE (2014): Origen del maíz andino: arqueobotánica y genética molecular. *Revista Arqueológica SIAN* 22:2-19.
- Wang Y, Fan G, Liu Y, Sun F, Shi C, Liu X, Peng J, Chen W, Huang X, Cheng S, Liu Y, Liang X, Zhu H, Bian C, Zhong L, Lv T, Dong H, Liu W, Zhong X, Chen J, Quan Z, Wang Z, Tan B, Lin C, Mu F, Xu X, Ding Y, Guo AY, Wang J, Ke W (2013): The sacred lotus genome provides insights into the evolution of flowering plants. *Plant J* 76: 557-67.
- Yuan YW, Zhang ZY, Chen ZD, Olmstead RG (2006): Tracking ancient polyploids: a retroposon insertion reveals an extinct diploid ancestor in the polyploid origin of belladonna. *Mol Biol Evol* 23: 2263-2267.
- Zizumbo-Villarreal D, Colunga-GarcíaMarín P (2010): Origin of agriculture and plant domestication in West Mesoamerica. *Genet Res Crop Evol* 57: 813-825.