

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECA

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE 64 VARIEDADES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA:

ALEJANDRO RUBIO MELGAREJO

DIRECTORA: DRA. LETICIA MÓNICA SÁNCHEZ HERRERA
CODIRECTOR: DR. MOISÉS ALBERTO CORTES CRUZ

Xalisco, Nayarit, Septiembre 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

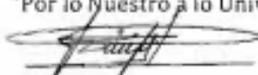
CBAP/170/16.

Xalisco, Nayarit; 20 de septiembre de 2016.

ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 26 de agosto del presente, enviado por los CC. **Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera, Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz, Dra. María Luisa Machuca Sánchez, Dra. Graciela Guadalupe López Guzmán y M.C. Yolotzin Apatzingan Palomino Hermosillo**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al C. **Alejandro Rubio Melgarejo**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universitario"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE NAYARIT
POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICO
AGROPECUARIAS

C.c.p.- Expediente

smefm

Tepec, Nayarit; 26 de Agosto de 2016

DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
P R E S E N T E

Los que suscribimos, integrantes del consejo Tutorial del QFB. Alejandro Rubio Melgarejo, declaramos que hemos revisado la tesis titulada "ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE 64 VARIEDADES DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.) MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES" y determinamos que la tesis puede ser presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias Biológico Agropecuarias con opción terminal en Ciencias Agrícolas

ATENTAMENTE
EL CONSEJO TUTORAL



Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera
Director



Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz
Co-Director



Dra. María Luisa Machuca Sánchez
Asesor



Dra. Graciela López Guzmán
Asesor



M en C. Yolizem Apatzingan Palomino Hermosillo
Asesor

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de ADN y Genómicas en el Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, con financiamiento del proyecto Validación de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con alta concentración de bioactivos, alto rendimiento y tolerantes a enfermedades, determinación de plagas y enfermedades e innovación de la maquinaria agrícola para una producción sustentable con clave: 163972. Fondo SECTORIAL SAGARPA-CONACYT

DEDICATORIAS

Rosalva Melgarejo Torres †

*A quien fuera la luz en mi camino, que por asares del
destino hoy se encuentra cuidándome desde el cielo,
recuerdo con nostalgia las veces en las que en tus brazos
encontré el consuelo que mi corazón buscaba,
las veces en las que tu mirada tierna y tu hermosa
sonrisa alegró mi día.*

A ti Mamita, a quien en mi corazón siempre te tendré.

J. Rafael Rubio Rodríguez

*Por la persona que hizo todo en la vida para
que yo pudiera lograr mis metas y sueños, por darme
la mano en todo momento...*

*A usted padre mío quien no tuvo esta dicha
de las letras, se lo agradezco con todo mi corazón
por siempre agradecido con usted, gracias.*

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por darme vida, salud y permitirme llegar hasta el final de este proceso.
- A mi familia, por el apoyo incondicional que me brindo en todo momento.
- Un especial agradecimiento a mi papá Rafael y a mi mamá Rosalva por sus consejos y enseñarme que cuando se desea algo hay que luchar por ello.
- Al Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz por el tiempo dedicado, asesoría y guía, durante este proceso como estudiante de Maestría y permitirme trabajar dentro su laboratorio.
- Al Dr. Luis Felipe Guzmán Rodríguez por el apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio.
- A mi comité tutorial, Dra. Leticia Mónica Sánchez Herrera, Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz, M en C. Yolotzin Apatzingan Palomino Hermosillo, Dra. María Luisa Machuca Sánchez y a la Dra. Graciela López Guzmán por regalarme mucho de su tiempo y conocimiento.
- A Selene Santos Rosas por estar conmigo desde el inicio y final de este proceso, por enseñarme a que todos los días hay algo por qué sonreír.
- A mis compañeros y colegas del laboratorio de ADN y Genómicas, Sergio, Andrea, Isabel, Maharshi, Isaac, Blanca y Gaby por el apoyo moral y hacer llevaderos los ratos pesados.
- A mis compañeros de generación, un divertido y muy excelente grupo.

AGRADECIMIENTOS A FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al programa de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias y Pesqueras (CBAP) de la Universidad Autónoma de Nayarit, al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) y a la Unidad de Tecnología de Alimentos por el apoyo otorgado.

A CONACyT agradezco la ayuda económica prestada por el apoyo con una beca con Número de CVU 585312.

Al laboratorio de ADN y Genómicas en el Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, por la estancia de investigación bajo la dirección del Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz.

RESUMEN

El cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de África, pertenece a la familia Malvaceae. En nuestro país, es cultivada en 15 estados de la República. La diversidad genética presente en las variedades actualmente utilizadas está dada principalmente por cruzamientos naturales y selección; no obstante, existe un vacío en la identificación varietal, estudios sobre diversidad y estructura genética de las mismas. Aunque existen algunos estudios a nivel internacional, el número de muestras utilizado ha sido limitado o se han enfocado en otras especies de *Hibiscus*. Por tal motivo, es necesario estimar la diversidad genética de las variedades de Jamaica tanto a nivel morfológico como molecular. El objetivo del presente trabajo fue estimar mediante el uso de marcadores moleculares, los niveles de diversidad genética presentes en 64 accesiones de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Se incluyeron 64 accesiones originarias de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido foliar liofilizado mediante el método de CTAB modificado. Para el análisis molecular se utilizaron las combinaciones de primers derivados del Citocromo P450, CYP2B6F/CYP1A1R, CYP1A1F/CYP2B6R, CYP1A1F/CYP2C19R, CYP2C19F/CYP2C19R, CYP2B6F/CYP2B6R y CYP2B6F/CYP2C19R, además se amplificaron cinco combinaciones de AFLPs las cuales fueron altamente informativas Eco RI + AAG/Mse I + CAC, Eco RI + ACG/Mse I + CAAG, Eco RI + AAG/Mse I + CAG, Eco RI + ACG/Mse I + CAGC y Eco RI + AAG/Mse I + CGC. Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida (8%). Los parámetros básicos de diversidad genética y el análisis de coordenadas principales (PCoA) fueron realizados con el software GenAlEx 6.5. El fenograma se construyó con la matriz de distancias genéticas empleando la metodología de Neighbor-Joining (N-J), con el software Mega 5.2. Los resultados de las combinaciones del CYP450 indicaron 82.65% de polimorfismo y 0.403 de heterocigosidad esperada total, siendo esta última considerada como moderada a alta, en comparación con otros resultados reportados previamente (0.305, empleando marcadores AFLP's). A través del PCoA se explicó el 74.76% de la variación genética, mientras que en el fenograma N-J las muestras de

Jamaica fueron separadas en tres grupos principales y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones. Este último análisis separó claramente los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, ubicándolos en los extremos opuestos del fenograma, mientras que el resto de los materiales no mostraron ninguna tendencia en la agrupación. En el caso de los AFLPs se observó un 86.57 % de polimorfismo, con un promedio de 32.4 loci polimórficos por combinación de marcadores, la diversidad genética de (Nei) fue de 0.310, valores similares a los reportados en otros estudios (0.305, también con marcadores AFLPs). Se estableció que no hay genotipos duplicados en la colección, sin embargo, existe un grado de parentesco elevado en los materiales de acuerdo a la dispersión del fenograma

ÍNDICE

Resumen.....	vi
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xii
Índice de símbolos y abreviaturas.....	xv
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. ANTECEDENTES.....	2
1.2.1. Orden Malvaes.....	2
1.2.2. Marcadores Moleculares.....	3
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	5
1.4. HIPÓTESIS.....	6
1.5. OBJETIVOS.....	6
1.5.1. Objetivo General.....	6
1.5.2. Objetivos Específicos.....	6
1.6. LITERATURA CITADA.....	7
CAPÍTULO II. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA AISLAMIENTO DE DNA EN HOJAS DE JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	10
2.1. RESUMEN.....	10
2.2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.3.1. Material vegetal.....	13
2.3.2. Protocolo de Extracción de DNA.....	15

2.3.3. Método general de extracción	16
2.3.6. Evaluación del DNA aislado.....	19
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
2.5. CONCLUSIONES	27
2.6. LITERATURA CITADA.....	28
CAPÍTULO III. ANÁLISIS MOLECULAR CON LOS MARCADORES CYP450.....	30
3.1. RESUMEN	30
3.2. INTRODUCCIÓN	32
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.3.1. Material vegetal.....	35
3.3.2. Extracción de DNA.....	35
3.3.3. Amplificación de los marcadores CYP 450	35
3.3.4. Análisis de agrupamientos	36
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.4.1. Extracción de DNA.....	37
3.4.2. Amplificación de los marcadores CYP450	37
3.5. CONCLUSIONES	42
3.6. LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS MOLECULARES CON LOS MARCADORES AFLP (POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS)	46
4.1. RESUMEN	46
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
4.3.1. Material vegetal.....	50
4.3.2. Extracción de DNA.....	50

4.3.3. Amplificación de los marcadores AFLPs	50
4.3.4. Análisis de datos	52
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.4.1. Digestión, ligación y Pre-amplificación	53
4.4.2. Amplificación de los marcadores de AFLPs	57
4.5. CONCLUSIONES	63
4.6. LITERATURA CITADA.....	64
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	67
5.1. Conclusiones Generales	67
5.2. Perspectivas Generales.....	68
ANEXOS	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Accesiones de germoplasma que serán objeto de estudio.	14
Cuadro 2. Composición del buffer de extracción de DNA genómico.	16
Cuadro 3. Comparación de Buffer de extracción para los métodos de Haque <i>et al.</i> , (2008), Doyle y Doyle, (1987) y Huang <i>et al.</i> , (2013).	18
Cuadro 4. Información de la secuencia de los primers de PCR basados en los genes P450 conocidos.	36
Cuadro 5. Amplificaciones de CYP450 utilizadas y número de polimorfismos amplificados.	37
Cuadro 6. Parámetros básicos de diversidad genética por poblaciones.	39
Cuadro 7. Combinaciones para amplificación selectiva.	52
Cuadro 8. Amplificaciones de AFLPs utilizadas y número de polimorfismos amplificados.	57
Cuadro 9. Parámetros básicos de diversidad genética por poblaciones.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Comparación de los valores de concentración (ng/μl) entre los tres métodos de extracción de DNA. Método I (Azul), método II (Amarillo) y método III (Gris)..... 20
- Figura 2.** Comparación de los valores de la relación A_{260}/A_{280} entre los tres métodos de extracción de DNA. 22
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%, muestra la calidad de las extracciones de DNA, método I (A), método II (B) y método III (C). El marcador empleado (señalado con la letra M), fue Lambda sin cortar con una concentración de 100 ng. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril las cuales corresponden a las muestras descritas en el Cuadro 1. 23
- Figura 4.** Gel de agarosa al 2%, que muestra la amplificación del gen *rcbL*. El marcador empleado (señalado con la letra M), fue de 100 pb. Los métodos mostrados corresponden a I Haque *et al.*, (2008), II Doyle y Doyle, (1987) y III Huang *et al.*, (2013). El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril las cuales corresponden a las muestras descritas en el cuadro 1. 24
- Figura 5.** Gel de agarosa al 2%, que muestra la amplificación del gen *matK*. El marcador empleado (señalado con la letra M), fue de 100 pb. Los métodos mostrados corresponden a I Haque *et al.*, (2008), II Doyle y Doyle, (1987) y III Huang *et al.*, (2013). El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril las cuales corresponden a las muestras descritas en el Cuadro 1. 25
- Figura 6.** Productos de PCR amplificados con la combinación CYP2B6F + CYP2C19R derivada de CYP450 para diferentes accesiones de jamaica observándose mayor polimorfismo entre 100 y 300 pb. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA ligado corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II. 38
- Figura 7.** Promedio de parámetros de diversidad en poblaciones de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Numero de accesiones por procedencia, Número efectivo de alelos

por locus (barra amarilla) heterocigosidad esperada (barra verde) y porcentaje de loci polimórficos (barra amarilla).....	40
Figura 8. Dendograma basado en N-J (Saitou y Nei, 1987) muestra que las cuatro poblaciones de jamaica fueron separadas en tres principales cada uno con subgrupos y subdivisiones. Nayarit (Azul), Guerrero (rojo), Colima (verde) y Puebla (rosa)	41
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de digestión (1µg de DNA). Los resultados obtenidos sugieren que la digestión de las muestras de DNA fue efectiva. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA digerido corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.	54
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de ligación. Los resultados obtenidos sugieren que la ligación de las muestras de DNA fue parcial. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA digerido corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.	55
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de pre-amplificación. Los resultados obtenidos sugieren que la pre-amplificación de las muestras de DNA fue efectiva con fragmentos que van de 100 a 1000 pb. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA digerido corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.	56
Figura 12. Productos de PCR amplificados con la combinación Eco RI + AAG/ Mse I + CAC de los marcadores AFLPs para diferentes accesiones de jamaica observándose mayor polimorfismo entre 100 y 300 pb. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA ligado corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.	59
Figura 13. Promedio de parámetros de diversidad en poblaciones de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Numero de accesiones por procedencia, Número efectivo de alelos por locus (barra verde), heterocigosidad esperada (barra azul) y porcentaje de loci polimórficos (barra amarilla).....	60

Figura 14. Dendograma basado en N-J (Saitou y Nei, 1987) muestra que las cuatro poblaciones de jamaica fueron separadas en tres principales cada uno con subgrupos y subdivisiones. Nayarit (Azul), Guerrero (rojo), Colima (verde) y Puebla (rosa). 62

ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
% <i>P</i>	Porcentaje de polimorfismo
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
<i>A</i>	Absorbancia
AFLPs	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
Bar	Unidad de presión equivalente a un millón de barias (10 ⁶)
BME	β-mercaptoetanol
Borax	Borato de sodio)
Ca⁺²	Ion calcio
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
CYP450	Citocromo P450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>g</i>	Gravedades
<i>h</i>	Hora
<i>H_e</i>	Heterocigosidad esperada
<i>I</i>	Índice de diversidad de Shannon
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
ISSRs	Inter-secuencias repetidas simples
LSS	Lauril sulfato de sodio
<i>m</i>	Metros
M	Molar
mg	Miligramo
Mg⁺²	Ion magnesio
min	Minutos
mL	Millilitros

mm	Milímetro
mM	Milimolar
N_a	Número de alelos
Na Cl	Cloruro de sodio
N_e	Número de alelos efectivos
ng	Nanogramos
N-J	Neighbor-Joining
No.	Número
pb	Pares de bases
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial Hidrogeno
pmol	Picomol
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPDs	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revolución por minuto
rxn	Reacción
SSR	Secuencias simples repetidas
TA	Temperatura ambiente
TE	(1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA, pH 8.0)
Tris-HCl	Hidroximetil amino metano con ácido clorhídrico
U	Unidades
VNTR	Repeticiones en tandem de número variable
Vol.	Volumen
x	Por
µL	Microlitro

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), también conocida como flor de jamaica, rosa de Jericó y roselle, es una planta dicotiledónea de la familia Malvaceae, que tiene su centro de origen en África (Maiti *et al.*, 2010, Solorzano y Macario, 2002). Actualmente es cultivada en regiones tropicales y subtropicales de Asia, Oceanía y América (Gómez *et al.*, 2008). Su rango de distribución abarca desde el nivel del mar de 0 hasta los 1,400 metros y una temperatura de 22 a 25°C, debido a que su germinación óptima se encuentra a los 25°C. Requiere de una precipitación anual de 500 a 1,000 mm distribuido durante el periodo vegetativo de cuatro a cinco meses. Esta planta crece bien en distintas clases de suelos, pero los más indicados son los suelos francos pesados o arcillosos con humedad permanente y fertilidad moderada (Urbina, 2009). Esta planta fue introducida en México en el siglo XVII, desde entonces se ha cultivado en 15 estados del país, siendo Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Nayarit los principales productores (Dominguez *et al.*, 2007).

Ortiz-Márquez (2008) hace la siguiente clasificación botánica de esta planta:

Reino Plante

Sub-reino Tracheobionta

Super-división Spermatophyta

División Anthophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Dilleniidae

Orden Malvales

Familia Malvaceae

Genero *Hibiscus*.

Especie *Hibiscus sabdariffa* L.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Orden Malvaes

En cuanto a sus características morfológicas, la jamaica es una planta anual con tallo semileñoso, raíz pivotante, hojas alternas de color verde con bordes aserrados, peciolo largos y erguidos. Su tipo de reproducción es autógama de origen alotetraploide con un número cromosómico $2n = 4x = 72$ (Alcoces, 2009). Presenta flores axilares y solitarias que abren un día y después de un tiempo corto, la corola se marchita y cae, quedando los cálices, los cuales se alargan, se tornan carnosos y al final del ciclo vegetativo se cosechan y deshidratan, generalmente al sol, lo que constituye el producto comercial que se obtiene de esta planta. El fruto tiene una forma capsular que contiene un promedio de 20 semillas, las cuales tienen un color negro (Hidalgo *et al.*, 2009). De acuerdo a la variedad, el rendimiento del cáliz, oscila entre 0.5 a 2 toneladas por hectárea (Gómez *et al.*, 2008). Los cálices son utilizados para preparación de bebidas e infusiones, también utilizadas en la medicina tradicional y diferentes trabajos evidencian que contiene compuestos bioactivos que son potencialmente benéficos para la salud (Maganha *et al.*, 2010). En países del continente Africano y Asiático, las hojas tiernas se utilizan en sopas y salsas. En el norte de Nigeria, las semillas se fermentan para preparar un alimento que se conoce como Mungza Ntusa. En Sudán se utilizan como sustituto de la carne y se preparan en forma tradicional mediante la cocción de semillas de jamaica que se fermentan por nueve días (Yagoub *et al.*, 2004). De las semillas también se puede obtener un aceite comestible o se pueden utilizar como alimento para aves (Mohamed *et al.*, 2007). Para realizar mejoramiento genético en el cultivo de la jamaica, se han aplicado los tres métodos tradicionales que son introducción, selección e hibridación. En cuanto a la introducción, es frecuente la movilización de semillas de una región a otra, de manera que, de algún modo, variedades que han sido seleccionadas en Nayarit, son cultivadas actualmente en países como Guatemala y Nicaragua (Hidalgo *et al.*, 2009).

Adicionalmente, la selección es un método aplicado por los productores y como resultado de la misma, existen materiales en diferentes regiones que presentan modificaciones sutiles respecto a las variedades comúnmente cultivadas, lo cual ha dificultado la caracterización de las mismas. Finalmente, el método de hibridación ha sido utilizado en el programa de mejoramiento genético de la Unidad Académica de Agricultura, de la Universidad Autónoma de Nayarit, para generar variación, por lo que a partir de la generación de poblaciones segregantes de los distintos híbridos desarrollados, se ha aplicado la selección, considerando diferentes aspectos de interés como el rendimiento de cálices, contenido de antocianinas, acidez, precocidad, sanidad de las plantas, presencia de tricomas en los cálices y facilidad para cosecha entre otras características (Caro *et al.*, 2010).

1.2.2. Marcadores Moleculares

A pesar de la importancia de la jamaica, existe una restringida información sobre la diversidad genética en esta especie. La mayoría de los estudios disponibles se han realizado con marcadores RAPDs y AFLPs donde el número de muestras utilizadas ha sido limitado o se han enfocado en otras especies del género *Hibiscus* (Gómez *et al.*, 2008). Sin embargo, con base en las observaciones en campo, se sospecha que existe una amplia diversidad genética, reflejado en su fenotipo, producto de la adaptación en los diferentes sitios de introducción (Ponciano e Hidalgo, 2012). Pocos autores han reportado sus esfuerzos en el establecimiento de la diversidad genética de la rosa de jamaica utilizando la técnica de RAPDs en países como Egipto, Estados Unidos y México (Hussein *et al.*, 2010, Jendreck *et al.*, 1997, Gómez *et al.*, 2008). Menos frecuentes son los estudios hechos con microsatélites (Torres *et al.*, 2011) y AFLP. Aunque existen estos reportes a nivel mundial, en México los análisis de diversidad genética en jamaica son incipientes. Los marcadores moleculares son herramientas que permiten cuantificar la diversidad genética; la elección del sistema de marcadores moleculares dependerá del tipo de estudio, ya sean para análisis de diversidad genética o estudios evolutivos entre otros. Algunos sistemas de marcadores están basados en la hibridación del DNA, como los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) o polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción.

Estos marcadores han sido usados en el mapeo comparativo entre especies. También hay marcadores basados en la amplificación arbitraria o semiarbitraria del DNA como lo son los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, que pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del DNA molde y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, esto son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles. (Martínez *et al.*, 2010). Tales marcadores suelen registrar la diversidad genéticamente en regiones neutras, pero la pregunta sigue siendo si esta diversidad refleja todo el genoma. Los VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) o repeticiones en tandem de número variable o conocidos como minisatélites, que son repeticiones en tandem de número variable que pueden tener entre 15 y 100 pares de bases (pb). Además, los VNTR pueden estar dentro de genes o entre ellos. Los ISSRs (Inter-simple Sequence Repeats) o intersecuencias repetidas simples, son una técnica relativamente nueva y similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el primer es un di ó trinucleótido repetido. Los SSR (Simple Sequence Repeats) también conocidos como secuencias simples repetidas o simplemente, microsátélites, son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el DNA (su principal ventaja es que se trata de un marcador codominante).

Otro marcador que se ha empezado a emplear para tener un mayor conocimiento de la especie cuando se conoce poco de ellas ya que los genes de Citocromo P450 (CYP450) podrían proporcionar herramientas universales para la evaluación de la diversidad genética de todo el genoma en diversas especies de plantas que no tienen marcadores genéticos. El CYP450 se encuentra ampliamente en animales plantas y microorganismos (Schalk *et al.*, 1999). En plantas superiores, el CYP450 juega un

papel importante en la síntesis de enzimas que intervienen el proceso de las biosíntesis de metabolitos y desintoxicación. Debido a su abundancia en los organismos vivos, se ha explorado la posibilidad de emplearlos como marcadores universales en estudios genéticos (Inui *et al.*, 2000).

En el caso particular de los estudios realizados de especies del género *Hibiscus* los más cercanos son el hecho por Tang *et al.*, (2003) el cual utilizó los marcadores de AFLPs para revelar los niveles de diversidad genética presentes en nueve poblaciones de la costa sur de China para un mayor conocimiento de la especie (*H. tiliaceus*). Por otra parte, Cheng *et al.*, (2004) analizó las relaciones genéticas e identificó las especies existentes en China, de kenaf (*H. cannabinus* L.) también empleando AFLPs. Ponciano e Hidalgo, (2012) mediante marcadores AFLPs realizaron un estudio de caracterización y diversidad genética en la especie de jamaica (*H. sabdariffa* L.) en una colección de 17 genotipos cultivados en Guatemala.

El presente trabajo buscó analizar la diversidad genética de las variedades de jamaica cultivadas en México mediante el empleo de marcadores derivados del CYP450 y marcadores AFLPs.

1.3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la importancia de la jamaica, existe restringida información sobre la diversidad genética en la especie, por lo que es necesario usar marcadores moleculares que nos permitan tener un gran número de polimorfismos, como lo son los marcadores derivados del CYP450 y o los AFLPs, los cuales permitirán conocer la diversidad genética presente en las variedades de jamaica en México que puedan dar pauta a nuevos esquemas de mejoramiento en nuestro país.

1.4. HIPÓTESIS

La alta diversidad morfológica presente en la jamaica, puede ser un reflejo de la diversidad genética existente como respuesta a diferentes sitios de cultivo en México.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo General

- Estimar mediante el uso de marcadores moleculares, los niveles de diversidad genética presentes en 64 accesiones de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).

1.5.2. Objetivos Especificos

- ✓ Estandarizar el protocolo para extracción de DNA en hojas de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).
- ✓ Emplear marcadores moleculares derivados de genes estructurales, utilizar el Citocromo 450 (CYP450), para estimar los parámetros de diversidad genética.
- ✓ Emplear marcadores moleculares neutrales como los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), para estimar los parámetros de diversidad genética.

1.6. LITERATURA CITADA

Alcoces, N. (2009). Estudios citogenéticos de *H. sabdariffa* L. (Malveaceae). *UDCA Agrícola*, 9 (3): 595-598.

Caro-Velarde, F., Flores-Berrios, E. and Machuca-Sánchez, M. (2010). El Cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Nayarit. Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, México. 103.

Cheng, Z., Lu, B. R., Sameshima, K., Fu, D. X. and Chen, J. K. (2004). Identification and genetic relationships of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and crop evolution*, 51 (4): 393-401.

Domínguez, L., Sánchez, M., López, S. and Morales, R. (2007). Propiedades físicas de la semilla de Jamaica Criolla Mexicana (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de su contenido de humedad. *Ciencias Agrícolas Informa*, 16: 30-36.

Gómez-Leyva, J. F., Acosta, L. M., Muraira, I. L., Espino, H. S., Ramírez-Cervantes, F. and Andrade-González, I. (2008). Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany*, 4 (3): 326-302.

Hidalgo-Villatoro, S. G., Cifuentes-Reyes, W. D., L. Ruano-Solis, H. H. and Cano-Castillo, L. E. (2009). Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala. *Agronomía mesoamericana*, 20 (1): 101-109.

Hideyuki, I., Takuya, K., Yasunobu, O. and Hideo, O. (2000). Herbicide Metabolism and Cross-Tolerance in Transgenic Potato Plants Co-Expressing Human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 116-129.

Hussein, R., Shahein, Y., Hakim, A. and Awad, H. (2010). Biochemical and molecular characterization of three colored types of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of American Science*, 6 (11):726-733.

- Jendereck, M., Shierenbeck, K. and Olney, A. (1997). Development of randomly amplified polymorphisms DNA markers characteristic of *H. rosa sinensis* and *H. syriacus*. *California Agricultural Technology Institute*, Number 970902. 7 p.
- Maganha, G. E., Da Costa, H. R., Moreira, R. R., Pegas, H. J. A., Lia de Paula, R. A. L. and Saffi, J. (2010). Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry*, 118:1-10.
- Maiti, R., Rodriguez, H. and Satya, P. (2010). Horizon of world plant fibers: an insight. *Pushpa Publishing Hause*, Kolkata.
- Martínez, M., Helguera, M. and Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. *Bioteconología y mejoramiento vegetal II*, 70-85.
- Mohamed, R., Fernández, J., Pinada, M. and Aguilar, M. (2007). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ tocopherol. *Journal of Food Science*, 72 (3):207-211.
- Ortiz-Márquez, S. (2008). Composición en macronutrientes, minerales y metales pesados en cálices de jamaica cultivada en el estado Monagas. *Tecnología y pensamiento*, 3 (1-2):61-75.
- Ponciano-Samayoa, K.M. and Hidalgo-Villatoro, S.G. (2012). Diversidad Genética de Rosa de Jamaica en Guatemala Revelada por Marcadores AFLP. *Agronomía Mesoamericana*, 23 (1): 63-71.
- Solórzano, R. and Macario, T. (2002). Estudio de la factibilidad del cultivo, procesamiento y comercialización de la rosa de Jamaica. *ALTERTEC/SEPRAGO*, 16.
- Schalk, M., Nedelkina, S., Schoch, G., Batard, Y. and Werck-Reichhart, D. (1999). Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of a plant P450, CYP73A1. *Biochemistry*, 38 (19): 6093-6103.
- Urbina, T. F. (2009). Proyecto de Desarrollo de la Cadena de Valor y Conglomerado Agrícola – Cultivo de Flor de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L. y *Hibiscus cruentus* Bertol). *Chemonics Internacional*, 7-8.

Tang, T., Zhong, Y., Jian, S. and Shi, S. (2003). Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) in China assessed using AFLP markers. *Annals of Botany*, 92 (3): 409-414.

Torres-Morán, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Ron-Parra, J., Parra-Tovar, G., Mena-Munguia, S., Rodriguez-García, A. and Rodriguez-Sahagún, A. (2011). Relationships among twelve genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivated in western Mexico. *Industrial Crops and Products*, 34 (1):1079-1083.

Yagoub, A.G., Moahmed, B. E., Ahmed, A. H. and El Tinay, A. H. (2004). Study on furundu, a traditional Sudanese fermented roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed: effect on in vitro protein digestibility chemical composition, and functional properties of the total proteins. *J. Agric. Food Chem*, 52 (20):6143-50.

CAPÍTULO II. OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA AISLAMIENTO DE DNA EN HOJAS DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa* L.)

2.1. RESUMEN

La extracción de DNA para diversos estudios en el campo de la biología molecular es el paso inicial el cual necesita que el DNA esté libre de polisacáridos, polifenoles, proteínas y RNA de plantas. En general, existen diversos métodos de extracción de DNA, sin embargo, algunos de ellos consumen mucho tiempo y utilizan reactivos y/o equipos costosos. El objetivo del presente estudio fue optimizar un protocolo rápido, eficiente y de bajo costo para extraer DNA a partir de hojas de *Hibiscus sabdariffa* L. Las variables evaluadas fueron el rendimiento (ng/μl), pureza ($A_{260/280}$), integridad (Gel agarosa al 1%) y funcionalidad del DNA (PCR) purificado a partir de hojas de jamaica, empleando tres diferentes métodos de extracción de DNA: Haque *et al.*, (2008) (método I); Doyle-Doyle *et al.*, (1987) (método II) y Huang *et al.*, (2013) (método III). Las variables de rendimiento y pureza del DNA mostraron diferencias significativas en los tres métodos. La funcionalidad del DNA obtenido por los métodos (I y II) fue evaluada por la amplificación de los marcadores *rcbL* y *matK* los cuales generaron perfiles de bandas nítidas, de buena calidad y de fácil interpretación para el DNA que se obtuvo mediante el método (I) la amplificación fue inhibida debido a existe presencia de metabolitos secundarios. Se recomienda el uso de método (III) para la extracción de DNA de *H. sabdariffa* para obtener mayor rendimiento de DNA con calidad y pureza óptima para aplicaciones de marcadores moleculares.

2.2. INTRODUCCIÓN

Los protocolos de extracción y purificación de ácidos nucleicos son esenciales para la mayoría de las aplicaciones en biología molecular, técnicas como PCR tiempo real, microarreglos y los marcadores moleculares que utilizan DNA, requieren como punto de partida que el DNA esté íntegro y libre de contaminantes (Menossi *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012 y Garcés *et al.*, 2014).

En plantas, el éxito en las diversas aplicaciones biotecnológicas que involucran el uso de DNA depende en gran medida del rendimiento y pureza que se obtiene. Uno de los problemas en la obtención del material genético en el reino vegetal son los productos de su metabolismo secundario que las plantas secretan (flavonoides, terpenos, polifenoles, quinonas y alcaloides). Estos compuestos son muy variados entre especies, por lo tanto no es posible la aplicación de un solo método de extracción de DNA universal (Khanuja *et al.*, 1999), ya que estos metabolitos ocasionan la degradación del DNA y pueden inhibir posteriores técnicas básicas y análisis moleculares, como por ejemplo la secuenciación del DNA o la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

La mayoría de los protocolos existentes para aislar y purificar el DNA de buena calidad, se basan en el método de CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), por ser un método más económico (Doyle-Doyle, 1990 y Sahu *et al.*, 2012). Esta es una de las razones de por qué es recomendable estandarizar un protocolo de extracción de DNA para cada especie (Kim *et al.*, 1997). Para la optimización de un método de extracción para *Hibiscus Sabdariffa* L., se establecieron tres protocolos de extracción de DNA basados en método de CTAB de acuerdo con Haque *et al.*, (2008); Doyle-Doyle *et al.*, (1987) y Huang *et al.*, (2013) para remover polisacáridos que se encuentran presentes en esta especie.

La PCR es una de las técnicas básicas en el campo de la biología molecular. Esta técnica es empleada para la amplificación enzimática *in vitro* de una región de DNA conocida. Está basada en el mecanismo de replicación *in vivo* de DNA. Presenta tres

etapas principales: la desnaturalización de la doble cadena de DNA, el alineamiento de los iniciadores con cada cadena sencilla y por último la síntesis de los fragmentos o también llamada extensión (Mullis K *et al.*, 1986, Somma y Querci, 2007).

Esta técnica puede determinar indirectamente, el grado de pureza del DNA al permitir que se lleve a cabo la actividad de la DNA polimerasa. Los parámetros de temperatura y tiempo en el que se efectúan cada una de las etapas son dependiente de la temperatura de fusión del DNA y de activación de la DNA polimerasa, la composición nucleotídica de los iniciadores y la cantidad de productos que deseamos obtener para posteriores análisis (White, 1993).

El objetivo del presente trabajo estudio fue establecer un protocolo optimizado para purificar DNA de hojas de *H. sabdariffa* a concentraciones altas con una pureza óptima, que sea de forma rápida y económica.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal

Se emplearon 64 accesiones de germoplasma de jamaica, las cuales fueron recolectadas en cuatro estados productores de México: Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Los materiales fueron agrupados en cuatro poblaciones de acuerdo con su procedencia. Estas accesiones son materiales mejorados y de uso común en estas regiones, obtenidos por la Universidad Autónoma de Nayarit y el Campo Experimental Iguala, del INIFAP en el estado de Guerrero (Cuadro 1).

Por accesión se sembraron 20 semillas individualmente en charolas de poliestireno con 240 cavidades con sustrato peat moss esterilizado. Las semillas se incubaron en un cuarto de germinación con condiciones controladas (27 ± 2 °C, 90%HR), con 16 horas luz y 8 horas oscuridad. Para la extracción de DNA, se emplearon hojas verdaderas de cada accesión después de 25 días de germinación las cuales se recolectaron en bulk, por cada accesión. Las hojas recolectadas fueron almacenadas a -80 °C para su congelación por al menos 48 horas. Posteriormente, se liofilizaron con una presión de vacío de 0.35 Bar y una temperatura de -85 °C durante una semana. Una vez liofilizadas, el tejido foliar se pulverizó empleando el equipo TissueLyser II. Para el ensayo de extracción de DNA, se colocaron 50 mg de tejido liofilizado de cada accesión, en tubos de 2.0 mL.

Cuadro 1. Accesiones de germoplasma que serán objeto de estudio.

No. Accesoión	Varietal	Procedencia	No. Accesoión	Varietal	Procedencia
1	Tempranilla negra	Colima	33	UAN 17	Nayarit
2	Tempranilla flor	Colima	34	UAN 26	Nayarit
3	Colima	Colima	35	UAN 27	Nayarit
4	Yersey acrollada	Puebla	36	UAN 23 ₁	Nayarit
5	Criolla roja	Puebla	37	UAN 12 ₁	Nayarit
6	Criolla roja violeta	Puebla	38	UAN 13 ₁	Nayarit
7	Criolla Huajicori	Nayarit	39	UAN 15	Nayarit
8	Negra UAN	Nayarit	40	UAN 24 ₁	Nayarit
9	Criolla morada	Colima	41	UAN 12	Nayarit
10	UAN 5	Nayarit	42	UAN 20	Nayarit
11	UAN 4	Nayarit	43	UAN 22	Nayarit
12	Criolla súper precoz	Colima	44	UAN 10 ₁	Nayarit
13	Criolla puebla precoz	Nayarit	45	UAN 29	Nayarit
14	Criolla precoz	Puebla	46	UAN 25 ₁	Nayarit
15	Negra Quiviquinta	Nayarit	47	UAN 19	Nayarit
16	China	Nayarit	48	UAN 30	Nayarit
17	UAN 6 Puga	Nayarit	49	UAN 9	Nayarit
18	UAN 31	Nayarit	50	UAN 16	Nayarit
19	UAN 6 ₁	Nayarit	51	UAN 18	Nayarit
20	UAN 16 ₂	Nayarit	52	UAN 21 ₁	Nayarit
21	UAN 6 Novillero	Nayarit	53	UAN 10 ₂	Nayarit
22	Morada x roja	Puebla	54	UAN 16 ₁	Nayarit
23	UAN 25	Nayarit	55	2 MQ ₂	Guerrero
24	Bellotuda	Nayarit	56	2Q ₂	Guerrero
25	UAN 7	Nayarit	57	4 Q ₄	Guerrero
26	Tempranilla roja	Colima	58	6 Q ₆	Guerrero
27	UAN 23	Nayarit	59	7 Q ₇	Guerrero
28	UAN 11	Nayarit	60	8Q ₈	Guerrero
29	UAN 24	Nayarit	61	9 cruza negra	Guerrero
30	UAN 21	Nayarit	62	10	Guerrero
31	UAN 8	Nayarit	63	11 coneja	Guerrero
32	UAN 13	Nayarit	64	Q ₁₂ CR	Guerrero

2.3.2. Protocolo de Extracción de DNA

Se establecieron tres protocolos de extracción y purificación de DNA basados en el método de CTAB. Las 64 accesiones se emplearon para ser evaluadas con tres diferentes protocolos de extracción de DNA basados en el método de CTAB: Haque *et al.*, (2008); Doyle-Doyle *et al.*, (1987) y Huang *et al.*, (2013).

La mayoría de los métodos existentes, para purificar y aislar el DNA con una buena calidad, están basados en el método del CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) el cual es un detergente que sirve para solubilizar las membranas y auxiliar en la inactivación de algunas enzimas. NaCl (Cloruro de sodio) es una sal para disociar las proteínas del DNA, Tris (hidroximetil) Tris-HCl (Aminometano con ácido clorhídrico) estabiliza el pH en torno de 8, EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) es un agente quelante de iones divalentes, como el Mg^{+2} y el Ca^{+2} , y por lo tanto un poderoso inhibidor de las nucleasas que usan estos iones como cofactores. El BME (β -mercaptoetanol) es un agente reductor que desnaturaliza peroxidasas y polifenoloxidasas, impidiendo la acción de estas enzimas sobre el DNA. El PVP (polivinilpirrolidona) es un antioxidante que inhibe la acción de compuestos fenólicos además actúa absorbiendo los polifenoles, LSS (Lauril sulfato de sodio) precipita las proteínas liberadas sin producir la despolimerización del núcleo, Borax (Borato de sodio) para remover polisacáridos en la etapa de precipitación. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición del buffer de extracción de DNA genómico.

Método	Tris-HCl mM	NaCl mM	EDTA mM	CTAB %	BME mM	PVP %	Borax mM	LSS %
I. Haque <i>et al.</i> (2008)	100	700	50	3.5	420	3	0	0
II. Doyle-Doyle <i>et al.</i> (1987)	100	700	50	2	280	2	0	0
III. Huang <i>et al.</i> (2013)	200	2 M	25	2	140	2	20	1

Tris-HCl (Hidroximetil amino metano con ácido clorhídrico), NaCl (Cloruro de sodio), EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio), BME (β -mercaptoetanol), PVP (Polivinilpirrolidona), LSS (Lauril sulfato de sodio) y Borax (Borato de sodio).

2.3.3. Método general de extracción

El procedimiento general de extracción se describe a continuación: se colocaron 50 mg de tejido liofilizado en tubos de 2 mL, a los cuales se agregaron 1000 μ l del buffer de extracción con concentraciones diferentes, dependiendo del método a evaluarse (Cuadro 3) (previamente calentado a 65 °C), realizándose al menos 10 inversiones manuales suaves de cada tubo, para lograr una mezcla homogénea del buffer y la muestra de tejido. Posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 65 °C, en agitación constante, durante 90 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se retiraron del horno y se dejaron enfriar durante 5 minutos aproximadamente a temperatura ambiente (TA). Se adicionaron 500 μ l de cloroformo/isoamil alcohol (24:1) mezclando suavemente los tubos por inversión durante 10 min a TA. Para el método III, se empleó diclorometano en lugar de la solución de cloroformo/isoamil alcohol. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 14,000 x g. La fase superior fue decantada en un tubo nuevo de 2 mL y se repitió el mismo procedimiento. Después de la segunda centrifugación, la fase superior fue transferida a un tubo nuevo de 2 mL que contenía 5 μ l de RNasa (10 mg/mL) por medio

de una pipeta, teniendo especial cuidado de no absorber la interfase, nuevamente las muestras se mezclaron por inversión cuatro veces y se dejaron incubar por 30 minutos a TA.

El DNA fue precipitado con 600 μ l de isopropanol frio (en este paso se observó la formación de la hebra de DNA), para después centrifugar los tubos a 4500 \times g durante 10 minutos. El isopropanol fue decantado, teniendo especial cuidado de no desprender la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Se realizaron dos lavados con etanol al 75 y 95% durante cinco minutos, centrifugando después de cada lavado a 14, 000 \times g durante 10 minutos.

Finalmente, la pastilla de DNA se dejó secar durante toda la noche en oscuridad, para eliminar todo el residuo de alcohol. Al día siguiente la pastilla de DNA fue resuspendida en 300 μ l de buffer TE (1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.0).

Cuadro 3. Comparación de Buffer de extracción para los métodos de Haque *et al.*, (2008), Doyle y Doyle, (1987) y Huang *et al.*, (2013).

Stok	Método I [Final]	Método II [Final]	Método III [Final]
dH2O	-----	-----	-----
1 M Tris HCl pH 7.5	100 mM	100 Mm	200 mM
5 M NaCl	700 mM	700 mM	2 M
0.5 M EDTA pH 8.0	50 mM	50 mM	25 mM
CTAB	3.50%	2%	2%
14 M BME	420 mM	280 mM	140 mM
PVP	3%	2%	2%
LSS	-----	-----	1%
0.25 M Borax	-----	-----	20 mM

Tris-HCl (Hidroximetil amino metano con ácido clorhídrico), NaCl (Cloruro de sodio), EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio), BME (β -mercaptoetanol), PVP (Polivinilpirrolidona), LSS (Lauril sulfato de sodio), Borax (Borato de sodio) y dH2O (agua).

2.3.6. Evaluación del DNA aislado

Cuantificación, pureza e integridad del DNA.

La concentración y pureza de las muestras de DNA obtenido en cada método fue determinada por medio de espectrofotometría, mientras que la integridad de los ácidos nucleicos se verificó de manera visual mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, la funcionalidad de las muestras de DNA fue evaluada por medio de la amplificación de los genes *rcbL* y *matK*.

Para la primera evaluación, se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000® Thermo Scientific, el cual permite obtener por medio de un microlitro (μl) de muestra la cantidad de DNA ($\text{ng}/\mu\text{l}$) y la calidad por medio del rango $A_{260:280}$. Este último valor nos permitió determinar la presencia de contaminantes. Si los valores resultantes fueron por debajo (1.8) indica que aún hay restos celulares que no se pudieron eliminar durante la extracción de DNA, por el contrario, valores mayores a (2.0) indicaban residuos de soluciones empleadas durante la aplicación del protocolo de extracción.

En la segunda evaluación la cantidad e integridad del DNA se verificó visualmente mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido en solución GelRed™ 0.001X, se cargó por pozo 30 $\text{ng}/\mu\text{l}$ de DNA genómico el cual se corrió en un buffer TBE 1X por 30 minutos a 80 volts y visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador. Para comprobar la ausencia de los contaminantes y medir el rendimiento del DNA se utilizó la técnica de la PCR, su producto se visualizó por medio de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2%. La reacción se realizó en un volumen final de 20 μL , con 0.8X de Taq polimerasa (RedTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, SIGMA-ALDRICH), 1 μM de cada iniciador y 40 ng de DNA y H_2O bidestilada, hasta alcanzar el volumen final. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 segundos, un paso de alineamiento a 48 °C durante 40 segundos y un paso de extensión a 72 °C durante un minuto, para terminar con una paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del protocolo para extracción de DNA en jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Los tres protocolos evaluados lograron aislar el DNA genómico con concentraciones y parámetros de calidad que parecían permitir realizar posteriores estudios moleculares. Sin embargo, el método de Doyle-Doyle *et al.*, (1987) y Huang *et al.*, (2013) fueron los que permitieron obtener mayores concentraciones y mejores resultados de calidad, identificados por medio del espectrofotómetro (Figura 1 y 2). Sin embargo, la visualización de estos productos en el gel de agarosa al 1%, mostro que la calidad e integridad del DNA con los tres métodos utilizados tuvo grandes diferencias cualitativas entre ellos.

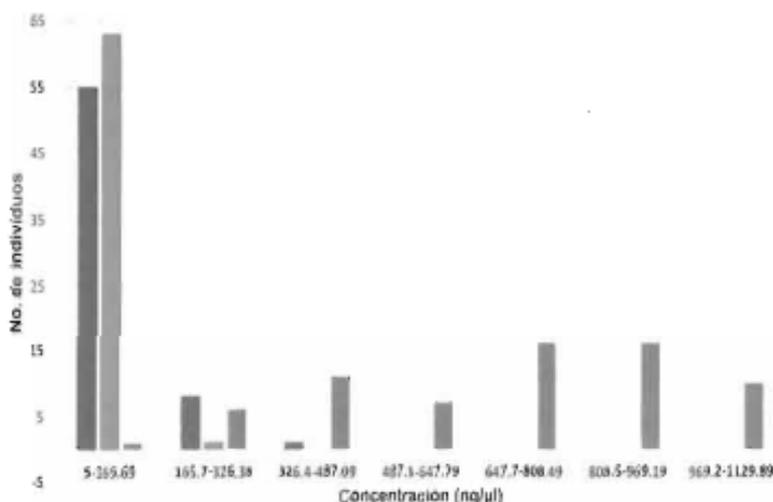


Figura 1. Comparación de los valores de concentración (ng/μl) entre los tres métodos de extracción de DNA. Método I (Azul), método II (Amarillo) y método III (Gris).

Al analizar cada una de las muestras individuales en el gel de agarosa al 1%, y relacionar estos resultados con los valores obtenidos por medio del espectrofotómetro, se observó productos que no fueron homogéneos. El método que tuvo menor homogeneidad fue el método de Doyle y Doyle, *et al.*, (1987) (Figura 3) ya que como se muestra en la figura 3 la concentración por $\text{ng}/\mu\text{l}$ no correspondió con la lectura del espectrofotómetro por lo tanto se observó el gel de agarosa con carriles sin DNA. En este método se identificó valores bajos de concentración y los más elevados en el rango $A_{260/290}$ lo cual nos indican que la extracción del DNA no fue la mejor. En el caso de los otros dos métodos Haque *et al.*, (2008) y Huang *et al.*, (2013) se observa claramente una diferencia cualitativa en el número de muestras extraídas ya que el DNA se visualizó nitidamente en el gel de agarosa esto corrobora que las lecturas del espectrofotómetro en cuanto concentración por $\text{ng}/\mu\text{l}$ fueron correctas lo que nos indicó que la extracción de DNA en estos dos métodos fue aceptable ya que se obtiene un DNA de alto peso molecular en relación con el marcador lambda sin cortar, además no se observó degradación del DNA ni barrido de residuos de sales de la extracción, como se puede observar en la figura 3.

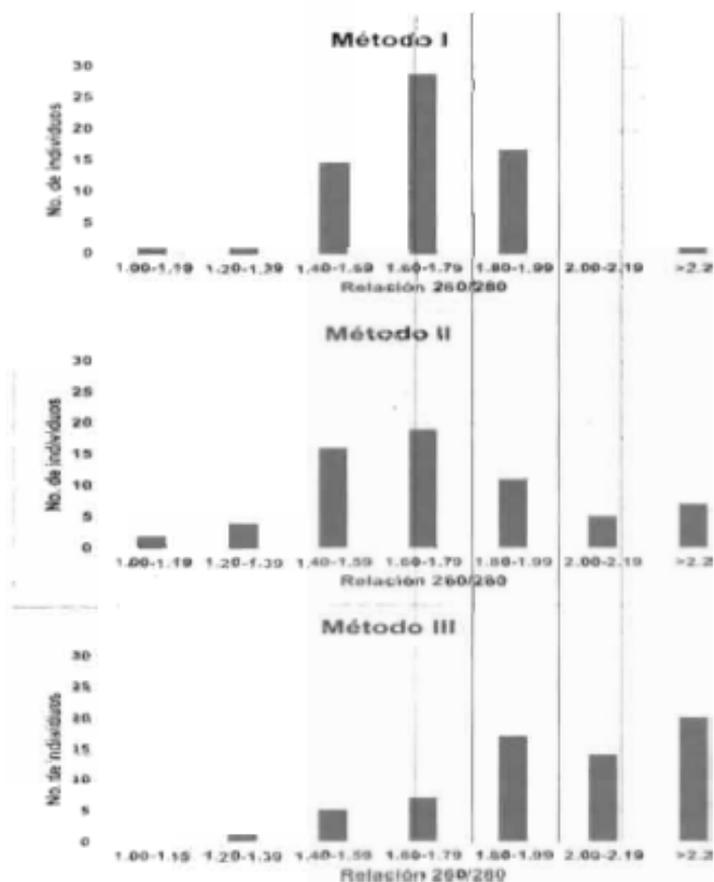


Figura 2. Comparación de los valores de la relación A_{260}/A_{280} entre los tres métodos de extracción de DNA.

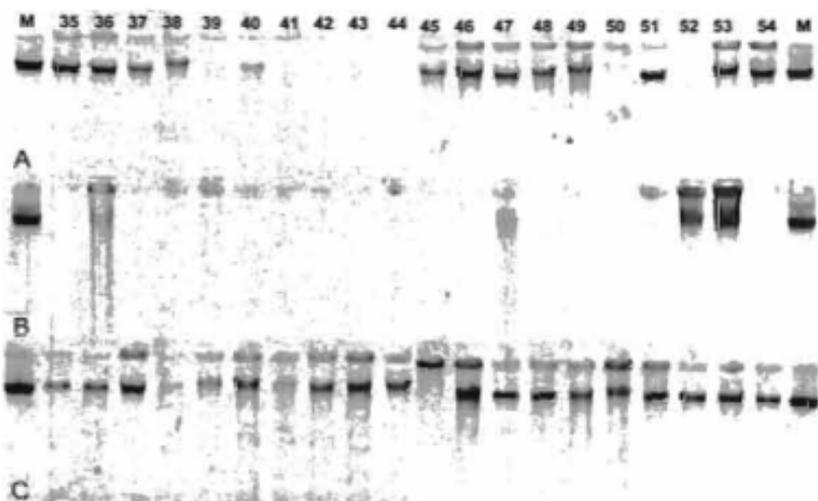


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, muestra la calidad de las extracciones de DNA, método I (A), método II (B) y método III (C). El marcador empleado (señalado con la letra M), fue Lambda sin cortar con una concentración de 100 ng. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril las cuales corresponden a las muestras descritas en el Cuadro 1.

Los resultados de la evaluación de la pureza por medio de la PCR, mediante la amplificación de los genes *rcbL* y *matK*, demostraron la ausencia de los inhibidores enzimáticos que pudieran haber sido acarreados durante el proceso de extracción principalmente para los métodos de Haque *et al.* (2008) y Huang *et al.*, (2013). Por el contrario, el método de Doyle y Doyle (1987) no logró eliminar los inhibidores de reacciones enzimáticas, al no haberse obtenido productos de amplificación de dichos genes (Figuras 4 y 5).

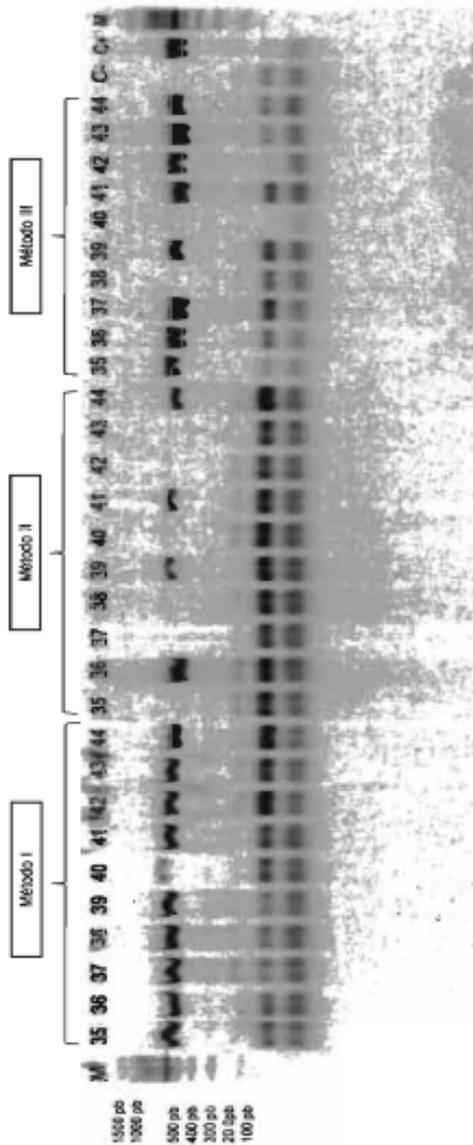


Figura 4. Gel de agarosa al 2%, que muestra la amplificación del gen *rcbL*. El marcador empleado (señalado con la letra M), fue de 100 pb. Los métodos mostrados corresponden a I Haque *et al.*, (2008), II Doyle y Doyle, (1987) y III Huang *et al.*, (2013). El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril las cuales corresponden a las muestras descritas en el cuadro 1.

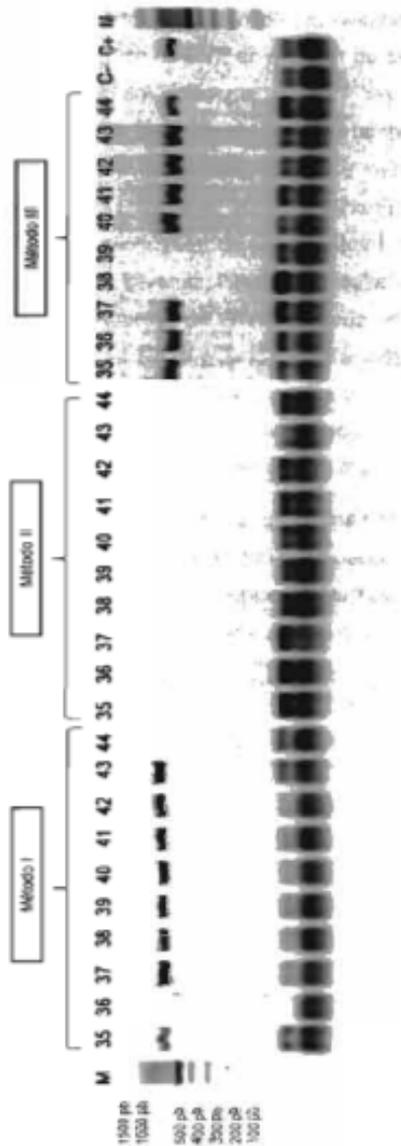


Figura 5. Gel de agarosa al 2%, que muestra la amplificación del gen *matK*. El marcador empleado (señalado con la letra M), fue de 100 pb. Los métodos mostrados corresponden a I Haque *et al.*, (2008), II Doyle y Doyle, (1987) y III Huang *et al.*, (2013). El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril las cuales corresponden a las muestras descritas en el Cuadro 1.

Una posible explicación de los resultados obtenidos puede ser la diferencia en la concentración de PVP en el buffer de extracción de los diferentes métodos. Como se mencionó anteriormente, el PVP es un antioxidante que inhibe la acción de compuestos fenólicos absorbiendo también los polifenoles, evitando la acción de estos compuestos que oxidan al DNA e impiden la acción de las enzimas de restricción (Vankar y Srivastava, 2008). Galicia-Flores *et al.*, (2008), reportaron la presencia de grandes cantidades de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavononas y antocianinas en jamaica. Así mismo la concentración de CTAB utilizada en el método I, favoreció en la ruptura de las membranas. En cambio al utilizar el método III en el cual tiene en su composición LSS y Borax, permitió precipitar a las proteínas más eficientemente debido a que el LSS resulto ser más eficaz en la remoción de polisacáridos y el Borax tiene como principal función eliminar polisacáridos en el proceso de precipitación del DNA.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos y los antecedentes del género *hibicus*, que presenta especies con diferente contenido de metabolitos secundarios, se decidió elegir el método III propuesto por Huang *et al.*, 2013 (modificado), el cual permitió obtener DNA con una alta calidad e integridad en las accesiones de la especie *hibicus sabdariffa*.

2.5. CONCLUSIONES

Las modificaciones realizadas al método del CTAB para la extracción de DNA de *H. sabdariffa* L. permitieron optimizar un protocolo para obtener DNA de buena calidad y elevada cantidad.

Los mayores rendimientos de DNA se obtuvieron en método de Huang *et al.*, (2013).

En cuanto a la funcionalidad del DNA se obtuvieron perfiles de bandas nítidas y bien definidas con el uso de los marcadores moleculares *rcbL* y *matK* en los métodos (I y III). Mientras que para el método (II) no se obtuvo el patrón de bandeo esperado.

Se recomienda emplear el método modificado por Huang *et al.*, (2013) (método III) por los altos rendimientos y calidad del DNA obtenido, pudiendo este ser empleado en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

2.6. LITERATURA CITADA

Chang, D., Yang, F. Y., Yan, J. J., Wu, Y. Q., Bai, S. Q., Liang, X. Z., Zhang, Y. W. and Gan, Y. M. (2012). SRAP analysis of genetic diversity of nine native populations of wild sugarcane, *Saccharum spontaneum*, from Sichuan, China. *Genetics Mol. Res*, 11 (2):1245-1253.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.

Galicia-Flores, L.A., Salinas-Moreno, Y., Espinoza-García, B. M. and Sánchez-Feria, C. (2008). Caracterización Físicoquímica y Actividad Antioxidante de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Nacional e Importada. *Chapingo Serie Horticultura*, 14 (2): 121-129.

Garces, F. F., Gutierrez, A. and Hoy, J. W. (2014). Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by PCR and potencial characterization of sugarcane resistance to leaf scald. *Plant Dis*, 98 (1):121-126.

Haque, I., Bandopadhyay, R. and Mukhopadhyay, K. (2008). An optimised protocol for fast genomic ADN isolation from high secondary metabolites and gurm containing plants. *Asian Journal of plant Sciences*, 7 (3): 304-308.

Kim, C., Lee, C., Shin, J., Chung, Y. and Hyung, N. (1997). A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using pvp. *Nucleic Acids Research*, 25 (5): 1085-1086.

Khan, I. A., Bibi, S., Yasmeen, S., Seema, N., Khatri, A., Siddiqui, M. A., Nizamani, G. S. and Afghan, S. (2011). Identification of elite sugarcane clones through TRAP. *Pak. J. Bot*, 43 (1):261-269.

Khanuja, S. P. S., Shasany, A. K., Darokar, M. P. and Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 17 (1):1-7.

Menossi, M., Silva-Filho, M. C., Vincentz, M., Van-Sluys, M. A. and Souza, G. M. (2007). Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. *Int. J. Plant Gen*, 2008:1-11.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51: 263-273.

Sahu, S. K., Thangaraj, M. and Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *Int. Scholarly Res. Network Mol*, 1:1-6.

Somma, M. and Querci, M. (2007). Análisis de Presencias de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. *European Comission JRC*, 53-70.

Qi-Xing, H., Xu-Chu, W., Hua, K., Yun-Ling, G. and An-Ping, G. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 12 (19): 2727-2732.

Vankar, P. and Srivastava, J. (2008). Comparative study of total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity in *Canna indica* and *Hibiscus rosa sinensis*: Prospective natural food dyes. *International journal of food engineering*, 4 (3).

White, B. (1993). PCR protocols: current methods and applications. *Springer Science & Business*, P.387.

CAPÍTULO III. ANÁLISIS MOLECULAR CON LOS MARCADORES CYP450

3.1. RESUMEN

El cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de África, pertenece a la familia Malvaceae. En nuestro país, es cultivada en 15 estados de la República. La diversidad genética presente en las variedades actualmente utilizadas está dada principalmente por cruzamientos naturales y selección; no obstante, existe un vacío en la identificación varietal, estudios sobre diversidad y estructura genética de las mismas. Aunque existen algunos estudios a nivel internacional, el número de muestras utilizado ha sido limitado o se han enfocado en otras especies de *Hibiscus*. Por tal motivo, es necesario estimar la diversidad genética de las variedades de Jamaica tanto a nivel morfológico como molecular. El objetivo del presente trabajo fue estimar la diversidad genética de las variedades de Jamaica cultivadas en México con marcadores derivados del citocromo P450 (CYP450). Se incluyeron 64 accesiones originarias de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido foliar liofilizado mediante el método de CTAB modificado. Para el análisis molecular se utilizaron las combinaciones de primers CYP2B6F/CYP1A1R, CYP1A1F/CYP2B6R, CYP1A1F/CYP2C19R, CYP2C19F/CYP2C19R, CYP2B6F/CYP2B6R y CYP2B6F/CYP2C19R. Se realizó la amplificación de los fragmentos por PCR y se visualizaron en geles de poliacrilamida (8%). Los parámetros básicos de diversidad genética y el análisis de coordenadas principales (PCoA) fueron realizados con el software GenAIEx 6.5. El fenograma se construyó con la matriz de distancias genéticas empleando la metodología de Neighbor-Joining (N-J), con el software Mega 5.2. Los resultados indicaron 82.65% de polimorfismo y 0.403 de heterocigosidad esperada total, siendo esta última considerada como moderada a alta, en comparación con otros resultados reportados previamente (0.305, empleando marcadores AFLP's). A través del PCoA se explicó el 74.76% de la variación genética, mientras que en el dendrograma N-J las muestras de Jamaica fueron separadas en tres grupos principales

y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones. Este último análisis separó claramente los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, ubicándolos en los extremos opuestos del dendograma, mientras que el resto de los materiales no mostraron ninguna tendencia en la agrupación.

3.2. INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), también conocida como flor de jamaica, rosa de Jericó y roselle, es una planta dicotiledónea de la familia Malvaceae, que tiene su centro de origen en África (Maiti *et al.*, 2010, Solorzano y Macario, 2002). Actualmente es cultivada en regiones tropicales y subtropicales de Asia, Oceanía y América (Gómez *et al.*, 2008). Esta planta fue introducida en México en el siglo XVII, desde entonces se ha cultivado en 15 estados del país, siendo Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Nayarit los principales productores (Dominguez *et al.*, 2007). En cuanto a sus características morfológicas, la jamaica es una planta anual con tallo semileñoso, raíz pivotante, hojas alternas de color verde con bordes aserrados, peciolo largos y erguidos. Su tipo de reproducción es autógama de origen alotetraploide con un número cromosómico $2n = 4x = 72$ (Alcoces, 2009). Presenta flores axilares y solitarias que abren un día y después de un tiempo corto, la corola se marchita y cae, quedando los cálices, los cuales se alargan, se tornan carnosos y al final del ciclo vegetativo se cosechan y deshidratan, generalmente al sol, lo que constituye el producto comercial que se obtiene de esta planta. El fruto tiene una forma capsular que contiene un promedio de 20 semillas, las cuales tienen un color negro (Hidalgo *et al.*, 2009). De acuerdo a la variedad, el rendimiento del cáliz, oscila entre 0.5 a 2 toneladas por hectárea (Gómez *et al.*, 2008). Para realizar mejoramiento genético en el cultivo de la jamaica, se han aplicado los tres métodos tradicionales que son introducción, selección e hibridación. En cuanto a la introducción, es frecuente la movilización de semillas de una región a otra, de manera que, de algún modo, variedades que han sido seleccionadas en Nayarit, son cultivadas actualmente en países como Guatemala y Nicaragua (Hidalgo *et al.*, 2009). Adicionalmente, la selección es un método aplicado por los productores y como resultado de la misma, existen materiales en diferentes regiones que presentan modificaciones sutiles respecto a las variedades comúnmente cultivadas, lo cual ha dificultado la caracterización de las mismas. Finalmente, el método de hibridación ha sido utilizado en el programa de mejoramiento genético de la Unidad Académica de Agricultura, de la Universidad Autónoma de Nayarit, para generar variación, por lo que

a partir de la generación de poblaciones segregantes de los distintos híbridos desarrollados, se ha aplicado la selección, considerando diferentes aspectos de interés como el rendimiento de cálices, contenido de antocianinas, acidez, precocidad, sanidad de las plantas, presencia de tricomas en los cálices y facilidad para cosecha entre otras características (Caro *et al.*, 2010).

A pesar de la importancia de la jamaica, existe una restringida información sobre la diversidad genética en esta especie. La mayoría de los estudios disponibles se han realizado con marcadores RAPD's y AFLP's donde el número de muestras utilizadas ha sido limitado o se han enfocado en otras especies del género *Hibiscus* (Gómez *et al.*, 2008). No obstante, con base en las observaciones en campo, se sospecha que existe una amplia diversidad genética, reflejado en su fenotipo, producto de la adaptación en los diferentes sitios de introducción. Los marcadores moleculares son herramientas que permiten cuantificar la diversidad genética; la elección del sistema de marcadores moleculares dependerá del tipo de estudio, ya sean para análisis de diversidad genética o estudios evolutivos entre otros. Algunos sistemas de marcadores están basados en la hibridación del DNA, como los RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) o polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción. Estos marcadores han sido usados en el mapeo comparativo y estudios de sintenia entre especies. También hay marcadores basados en la amplificación arbitraria o semiarbitraria del DNA como lo son los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) o DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, que pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del DNA molde y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, esto son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles. (Martínez *et al.*, 2010). Tales marcadores suelen registrar la diversidad genéticamente en regiones neutras, pero la pregunta sigue siendo si esta diversidad refleja todo el genoma. El otro

tipo de marcadores, está basado en la metodología de la reacción en cadena de la polimeras (o PCR, por sus siglas en inglés). Los VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) o repeticiones en tandem de número variable o conocidos como minisatélites que son repeticiones en tandem de número variable que pueden tener entre 15 y 100 pares de bases. Además, los VNTR pueden estar dentro de genes o entre ellos. Los ISSRs (Inter-simple Sequence Repeats) o inter-secuencias repetidas simples, son una técnica relativamente nueva y similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el primer es un di ó trinucleotido repetido. Los SSR (Simple Sequence Repeats) o secuencias simples repetidas son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el DNA siendo también un marcador codominante. Los genes de Citocromo P450 (CYP450) podrían proporcionar herramientas universales para la evaluación de la diversidad genética de todo el genoma en diversas especies de plantas que no tienen marcadores genéticos. El citocromo p450 se encuentra ampliamente en animales plantas y microorganismos (Schalk *et al.*, 1999). En plantas superiores, el citocromo P450 juega un papel importante en la síntesis de enzimas que intervienen el proceso de las biosíntesis de metabolitos y desintoxicación. Debido a su abundancia en los organismos vivos, se ha explorado la posibilidad de emplearlos como marcadores universales en estudios genéticos (Inui *et al.*, 2000). Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad genética de las variedades de jamaica cultivadas en México mediante el empleo de marcadores derivados del CYP450.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Material vegetal

Se emplearon 64 accesiones de germoplasma de jamaica, la cuales fueron recolectadas en cuatro estados productores de México: Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla anteriormente descritos.

3.3.2. Extracción de DNA

El método empleado fue el basado en CTAB con modificaciones de acuerdo a Huang *et al.*, (2013), descrito a detalle en resultados del Capítulo II: Extracción de DNA.

3.3.3. Amplificación de los marcadores CYP 450

Análisis con marcadores derivados de CYP450 (Cuadro 4). Para el análisis molecular se emplearon seis combinaciones de primers, derivados del citocromo P450: CYP2B6F/CYP1A1R, CYP1A1F/CYP2B6R, CYP1A1F/CYP2C19R, CYP2C19F/CYP2C19R, CYP2B6F/CYP2B6R y CYP2B6F/CYP2C19R las cuales, en trabajos previos con materiales de Jamaica, resultaron ser las más polimórficas.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un volumen total de 10 μ L, conteniendo 40 ng de DNA, 0.7 μ M de cada primer (Forward y Reverse), 0.24 μ L (3 mM de $MgCl_2$), 0.8X de REDTaq® ReadyMix™ PCR (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) y agua bidestilada estéril. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 94°C durante 60 seg, un paso de alineamiento con temperatura de acuerdo a la combinación durante 60 seg y un paso de extensión de 72°C durante 60 seg. La amplificación tuvo un ciclo final de extensión de 72°C durante 10 min. Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador Prime G Thermal Cycler (Techne Inc., Burlington, N.J., USA). Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata de acuerdo a la metodología descrita por Sanguinetti *et al.*, (1994).

Cuadro 4. Información de la secuencia de los primers de PCR basados en los genes P450 conocidos.

Primers	Secuencia (5'a 3')	Temperatura de alineamiento
CYP1A1F	GCC AAG CTT TCT AAC AAT GC	52 °C
CYP2B6F	GAC TCT TGC TAC TCC TGGG TT	52 °C
CYP2C19F	TCC TTG TGC TCT GTC TCT CA	47 °C
CYP1A1R	AAG GAC ATG CTC TGA CCA TT	52 °C
CYP2B6R	CGA ATA CAG AGC TGA TGA GT	52 °C
CYP2C19R	CCA TCG ATT CTT GGT GTT CT	47 °C

Inui *et al.*, (2000).

3.3.4. Análisis de agrupamientos

Se elaboró de manera manual una matriz de datos binarios a partir de la presencia y ausencia de bandas en los geles de poliacrilamida. Los parámetros básicos de diversidad genética calculados fueron el número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (H), heterocigosidad esperada (H_e) y porcentaje de polimorfismo (%P), los cuales se determinaron con el programa GenAIEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Las relaciones entre las diferentes accesiones de jamaica fueron establecidas empleando la metodología de Neighbor-Joining (N-J) (Saitou y Nei, 1987) con el programa Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), además se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando el programa GenAIEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Extracción de DNA

El método de Huang *et al.*, (2013) permitió obtener altas concentraciones y una mejor calidad de DNA las cuales fueron necesarias para llevar a cabo la técnica de CYP450 ya que esta necesita de una concentración alta, además de una buena calidad y pureza del DNA (Figura 3, Capítulo II).

3.4.2. Amplificación de los marcadores CYP450

Se detectaron un total de 85 loci (Cuadro 5), donde la combinación CYP2B6F/CYP2C19R reveló el número mayor de bandas polimórficas, con un total de 25, mientras que la combinación que detectó la menor cantidad de polimorfismos fue CYP2B6F/CYP1A1R, 10 bandas. Las seis combinaciones revelaron un 82.65% de polimorfismo (Figura 6).

Cuadro 5. Amplificaciones de CYP450 utilizadas y número de polimorfismos amplificados.

No.	Combinación CYP450	No. de loci
1	CYP2B6F + CYP1A1R	10
2	CYP1A1F + CYP2B6R	12
3	CYP1A1F + CYP2C19R	11
4	CYP2C19F + CYP2C19R	12
5	CYP2B6F + CYP2B6R	15
6	CYP2B6F + CYP2C19R	25

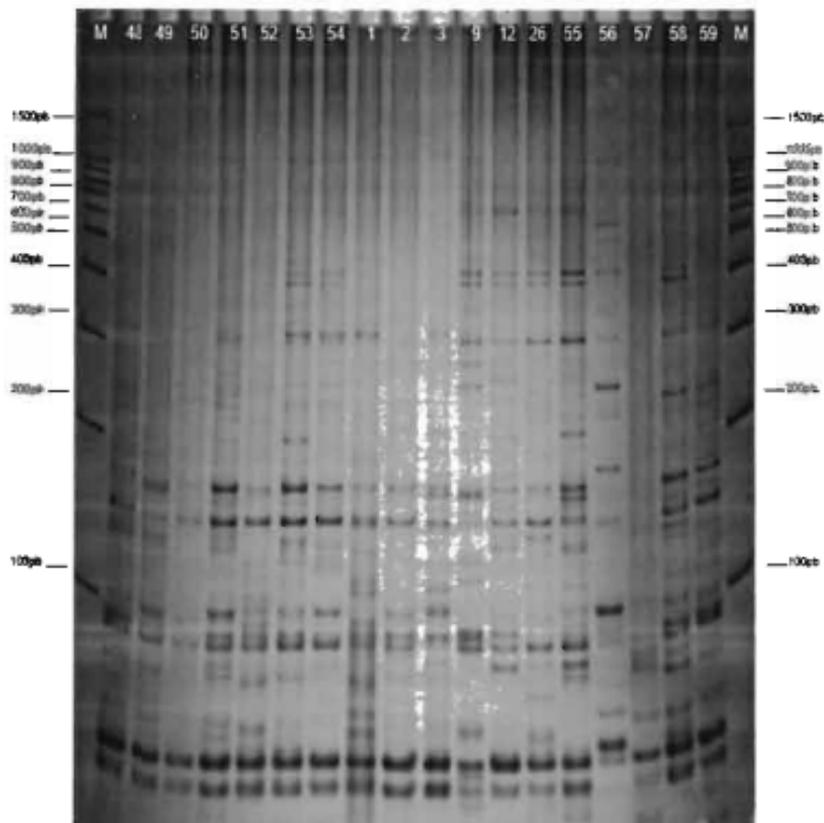


Figura 6. Productos de PCR amplificados con la combinación CYP2B6F + CYP2C19R derivada de CYP450 para diferentes accesiones de jamaica observándose mayor polimorfismo entre 100 y 300 pb. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA ligado corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.

Los parámetros de diversidad genética por poblaciones mostraron valores en el número promedio de alelos por locus de 1.73, número efectivo de alelos por locus 1.49, índice de Shannon 0.43, heterocigosidad esperada 0.40 y el porcentaje de loci

polimórficos 82.65 % (Cuadro 6). El Análisis de Coordenadas Principales logró explicar el 62.87% de la variación.

Cuadro 6. Parámetros básicos de diversidad genética por poblaciones.

Poblaciones	N	Na	Ne	I	He	%P
Nayarit	41.78	2.00	1.57	0.51	0.45	100.00%
Guerrero	49.41	1.69	1.45	0.41	0.19	82.35%
Colima	45.86	1.56	1.47	0.41	0.48	75.29%
Puebla	44.86	1.65	1.47	0.40	0.49	72.94%
Total	15.48	1.73	1.49	0.43	0.40	82.65%

La H_e en el presente trabajo (0.403) se considera como moderada a alta, en comparación con otros estudios previos (0.305), en el cual emplearon marcadores AFLPs (Ponciano y Hidalgo, 2012), de la misma naturaleza dominante. Además, el CYP450 se ha utilizado en estudios de otras especies como (*Oryza sativa* L.) (Yamanaka *et al.*, 2013) y (*Curcuma amada* Roxb) (Jatoi *et al.*, 2010), en los cuales se han identificado niveles altos de diversidad genética. Esto demuestra que los marcadores derivados del CYP450 son útiles en la estimación de parámetros de diversidad genética.

Las poblaciones con mayor valor de H_e son Puebla, Colima y Nayarit, con 0.49, 0.48, y 0.45 respectivamente mientras que la población con menor diversidad genética fue Guerrero, con 0.19. La población más polimórfica fue Nayarit ya que se obtuvo un 100% de polimorfismo, Puebla fue la población que tuvo el polimorfismo más bajo 72.94. Todas las poblaciones tuvieron en promedio, el mismo número de alelos efectivos (1.5) los cuales se transmitirán a la siguiente generación (Figura 7).

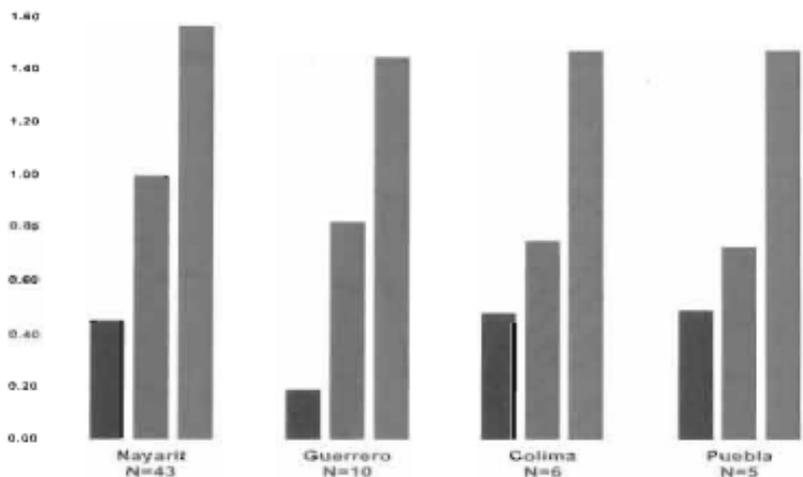


Figura 7. Promedio de parámetros de diversidad en poblaciones de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Número de accesiones por procedencia, Número efectivo de alelos por locus (barra amarilla) heterocigosidad esperada (barra verde) y porcentaje de loci polimórficos (barra amarilla).

El dendograma basado en el método N-J muestra que las 64 accesiones de jamaica fueron separadas en tres grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones (Figura 8).

Las relaciones genéticas entre las accesiones de jamaica se establecieron a partir de un dendograma, el cual ubicó a los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, en los extremos del dendograma (Figura 8). Los materiales de Guerrero tienden a estar en un solo grupo. Por otro lado, los materiales de Nayarit, se agrupan en diferentes sub-grupos principales, mientras que los materiales de Puebla y Colima no mostraron ningún patrón de agrupamiento. Esto coincide con lo reportado en la caracterización agromorfológica donde todos los genotipos fueron diferente en sus características fenotípicas y de rendimiento por lo tanto se determinó. Esto pudiera ser debido a que las poblaciones de Guerrero y Nayarit tienen progenitores en común

mientras Colima y Puebla solo son materiales de uso común los cuales no son mejorados en comparación con la mayoría de los materiales provenientes de Guerrero y Nayarit.

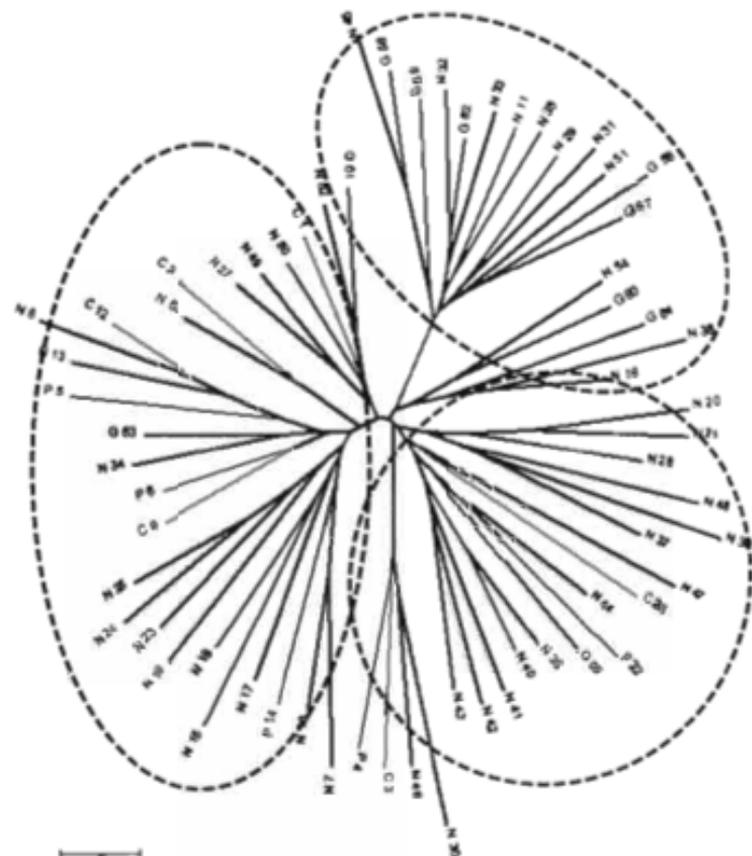


Figura 8. Dendrograma basado en N-J (Saitou y Nei, 1987) muestra que las cuatro poblaciones de Jamaica fueron separadas en tres principales cada uno con subgrupos y subdivisiones. Nayarit (Azul), Guerrero (rojo), Colima (verde) y Puebla (rosa).

3.5. CONCLUSIONES

El CYP450 es una alternativa para el análisis de la diversidad genética ya que se puede encontrar mayor número de polimorfismos debido a la abundancia de esta familia de genes en los organismos vivos.

Estos son los primeros resultados para *H. Sabdariffa* L. utilizando este tipo de marcadores.

El nivel de polimorfismo es elevado en comparación con otros estudios.

Los materiales genéticos de uso común en comparación de los materiales mejorados estos no tienen una tendencia en la agrupación mientras tanto los mejorados si la tienen.

3.6. LITERATURA CITADA

- Alcoces, N. (2009). Estudios citogenéticos de *H. sabdariffa* L. (Malveaceae). *UDO Agrícola*, 9 (3): 595-598.
- Caro-Velarde, F., Flores-Berrios, E. and Machuca-Sánchez, M. (2010). El Cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Nayarit. Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, México. 103.
- Domínguez, L., Sánchez, M., López, S. and Morales, R. (2007). Propiedades físicas de la semilla de Jamaica Criolla Mexicana (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de su contenido de humedad. *Ciencias Agrícolas Informa*, 16: 30-36.
- Gómez-Leyva, J. F., Acosta, L. M., Muraira, I. L., Espino, H. S., Ramirez-Cervantes, F. and Andrade-Gonzalez, I. (2008). Multiple shoot regeneration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system. *International Journal of Botany*, 4 (3): 326-302.
- Hidalgo-Villatoro, S. G., Cifuentes-Reyes, W. D. L., Ruano-Solis, H. H. and Cano-Castillo, L. E. (2009). Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala. *Agronomía mesoamericana*, 20 (1): 101-109.
- Hideyuki, I., Takuya, K., Yasunobu, O. and Hideo, O. (2000). Herbicide Metabolism and Cross-Tolerance in Transgenic Potato Plants Co-Expressing Human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 116-129.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (1993). MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, 24 (8): 1596-1599
- Maiti, R., Rodriguez, H. and Satya, P. (2010). Horizon of world plant fibers: an insight. *Pushpa Publishing House*, Kolkata.
- Martinez, M., Helguera, M. and Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. *Biotechnology y mejoramiento vegetal II* pp. 70-85.

- Peakall, R.O.D. and Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6 (1): 288-295.
- Ponciano-Samayoa, K.M. and Hidalgo-Villatoro, S.G. (2012). Diversidad Genética de Rosa de Jamaica en Guatemala Revelada por Marcadores AFLP. *Agronomía Mesoamericana*, 23 (1): 63-71.
- Qi-Xing, H., Xu-Chu, W., Hua, K., Yun-Ling, G. and An-Ping, G. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 12 (19): 2727-2732.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- Sanguinetti, C. J., Dias, N. E. and Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17 (5): 914-921.
- Solorzano, R. and Macario, T. (2002). Estudio de la factibilidad del cultivo, procesamiento y comercialización de la rosa de Jamaica. *ALTERTEC/SEPRAGO*, 16.
- Schalk, M., Nedelkina, S., Schoch, G., Batard, Y. and Werck-Reichhart, D. (1999). Role of unusual amino acid residues in the proximal and distal heme regions of a plant P450, CYP73A1. *Biochemistry*, 38 (19): 6093-6103.
- Shakeel, A.J., Akira, K., Dawood, A. and Kazuo, N. W. (2010). Characterization of the genetic structure of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) from Myanmar in farm and genebank collection by the neutral and functional genomic markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13 (6): 4-5
- Shinsuke, Y., Shakeel, A.J., San-San-Yi., Shankar, L. K., Tin-Hlut. and Kazuo N. W. (2011). Genetic diversity of Myanmar rice and their implementation on management methods. *African Journal of Biotechnology*, 10 (8): 1290-1298.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731-2739.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS MOLECULARES CON LOS MARCADORES AFLP (POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS)

4.1. RESUMEN

La técnica de AFLPs está basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión total del DNA genómico, generando así una huella genética del mismo. Estas características hacen que sea una técnica altamente reproducible y con alta cobertura del genoma. Gracias a estas ventajas, estos marcadores pueden ser empleados en especies que no han sido muy estudiadas, y la información generada puede servir de base para la construcción de mapas genéticos, estudios de genética de poblaciones, interacción genotipo-ambiente, lo cual puede ser de gran ayuda en los programas de mejoramiento. El objetivo de este estudio fue estimar la diversidad genética existente en 64 accesiones de jamaica divididas en cuatro poblaciones de acuerdo con su procedencia (Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla). El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido foliar liofilizado mediante el método de CTAB modificado. Se amplificaron cinco combinaciones de AFLPs las cuales fueron altamente informativas Eco RI + AAG/Mse I + CAC, Eco RI + ACG/Mse I + CAAG, Eco RI + AAG/Mse I + CAG, Eco RI + ACG/Mse I + CAGC y Eco RI + AAG/Mse I + CGC. Los fragmentos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida (8%). Los parámetros básicos de diversidad genética y el análisis de coordenadas principales (PCoA) fueron realizados con el software GenAICx 6.5. El fenograma se construyó con la matriz de distancias genéticas empleando la metodología de Neighbor-Joining (N-J), con el software Mega 5.2. Se observó un 86.57 % de polimorfismo, con un promedio de 32.4 loci polimórficos por combinación de marcadores, la diversidad genética de (Nei) fue de 0.310, valores similares a los reportados en otros estudios (0.305, también con marcadores AFLPs). Se estableció que no hay genotipos duplicados en la colección, sin embargo, existe un grado de parentesco elevado en los materiales de acuerdo a la dispersión del fenograma.

4.2. INTRODUCCIÓN

La caracterización agromorfológica en *Hibiscus sabdariffa* L. tiene el inconveniente de la estacionalidad y los parámetros bióticos específicos requeridos para su desarrollo (Benitez-Dominguez *et al.*, 2011). Además, la jamaica presenta diferencias muy sutiles, lo que puede dificultar su caracterización morfológica ya que se debe considerar que todas las características son susceptibles a la plasticidad fenotípica (Gianoli, 2004). Si bien, los caracteres morfológicos son la base para la identificación de variedades, estos pueden ser influenciados por factores ambientales que requieren, por lo cual una alternativa viable es el uso de marcadores moleculares. El desarrollo de los marcadores moleculares en las últimas décadas ha ayudado a superar los problemas asociados con la clasificación basada en caracteres morfológicos.

En la actualidad, la jamaica se considera un cultivo subutilizado, de potencial económico importante pero que se tiene relegado a siembras temporales en suelos marginales con poca fertilidad, además de que existe una restringida información sobre la diversidad genética en esta especie (Hidalgo *et al.*, 2009). Por lo que es necesario realizar un análisis de diversidad genética, el cual se puede llevar utilizando marcadores basados en secuencias de DNA (codificantes o no), capaces de detectar polimorfismos (Azofeifa-Delgado, 2006; Demey *et al.*, 2003). Un polimorfismo puede definirse como una modificación de las secuencias de nucleótidos entre diferentes individuos, estas diferencias incluyen inserciones, deleciones, translocaciones, duplicaciones y mutaciones puntuales. Contrariamente a la caracterización morfológica, no tienen influencia ambiental, ni a los efectos pleiotropicos o epistáticos, además permanecen estables y detectables sin importar el estado de desarrollo vegetal, diferenciación o estado de defensa de la célula del tejido del que se empezó a realizar el estudio (Abadie y Berretta, 2001; Hedrick, 2004; Freeland, 2005). Por estas ventajas, son ideales para el empleo los estudios de diversidad genética (Eguiarte, 2007).

El mejoramiento genético tradicional es un proceso complejo, por estar condicionado al contenido de la poza genética en una especie y por la gran inversión del tiempo y recursos para realizar cruces, con el fin de fijar la característica de interés (Benitez-Dominguez *et al.*, 2011 y Joshi *et al.*, 2011). En muchos casos, estas limitantes han sido superadas por el empleo de marcadores moleculares durante el proceso de selección de los individuos que poseen las características deseables, como en los estudios de selección asistida por marcadores moleculares.

Los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados son considerados marcadores de alta eficacia, ya que permiten el análisis de un elevado número de loci por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia además de ser altamente reproducibles, aunque de naturaleza dominante (Martinez *et al.*, 2010). La técnica de AFLPs permite generar una huella de DNA, esto dentro de un sistema ideal de marcadores que ayudará a revelar la diversidad genética que pudiera estar presente entre individuos, poblaciones y especies. La principal ventaja de los marcadores AFLPs, es que puedan emplearse en especies que no han sido muy estudiadas y/o no tienen marcadores moleculares específicos (por ejemplo, microsatélites), y que esta información puede servir en la generación de mapas genéticos, estudios de genética de poblaciones y de interacción de genotipo-ambiente, entre otros (Tang *et al.*, 2003).

En el caso particular de los estudios realizados de especies del género *Hibiscus* los más cercanos son el hecho por Tang *et al.*, (2003) el cual utilizó los marcadores de AFLPs para revelar los niveles de diversidad genética presentes en nueve poblaciones de la costa sur de China para un mayor conocimiento de la especie (*H. tiliaceus*). Por otra parte, Cheng *et al.*, (2004) analizó las relaciones genéticas e identificó las especies existentes en China, de kenaf (*H. cannabinus* L.) también empleando AFLPs. Ponciano e Hidalgo, (2012) mediante marcadores AFLPs realizaron un estudio de caracterización y diversidad genética en la especie de jamaica (*H. sabdariffa* L.) en una colección de 17 genotipos cultivados en Guatemala.

A pesar de la importancia de *H. sabdariffa*, poco se conoce de su estructura genética. Por los resultados observados en campo, se sospecha que existe una amplia diversidad genética, como resultado de la gran variación morfológica y adaptación en sitios de introducción (Ponciano e Hidalgo, 2012). Pocos autores han reportado sus esfuerzos en materia de análisis de diversidad genética empleando diferentes marcadores tales como RAPDs en países como Egipto (Husseini *et al.*, 2010), Estados Unidos (Jendreck *et al.*, 1997) y México (Gómez *et al.*, 2008). Finalmente, existen otros estudios sobre diversidad genética en *H. sabdariffa*, aunque menos frecuentes, empleando marcadores como los microsatélites y AFLPs (Torres *et al.*, 2011).

Aunque existen estos reportes a nivel mundial, en México los análisis de diversidad genética en jamaica son incipientes, por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad genética de las variedades cultivadas de jamaica en México mediante marcadores AFLPs.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAHÍA DE LAGUNAS



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Material vegetal

Se emplearon 64 accesiones de germoplasma de jamaica, la cuales fueron recolectadas en cuatro estados productores de México: Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla anteriormente descritos.

4.3.2. Extracción de DNA

El método empleado fue el basado en CTAB con modificaciones de acuerdo a Huang *et al.*, (2013), el cual se describe a detalle en el Capítulo II: Extracción de DNA.

4.3.3. Amplificación de los marcadores AFLPs

La técnica de AFLP, se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Vos *et al.*, (1995) con modificaciones. Para la digestión de las muestras de ADN, se formaron bulks por cada accesión. Se realizó una doble digestión de 1 µg de DNA genómico por cada bulk, con las enzimas Eco RI y Mse I (New England Biolabs, Ipswich MA, USA). Las reacciones de digestión se realizaron a un volumen final de 50 µl, conteniendo, 1X de amortiguador Mse I, 10 U por µg de DNA de la enzima Eco RI y 2.5 U por µg de DNA de la enzima Mse I, 100 mM de NaCl y agua bidestilada. Las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 6 h, seguido de una incubación a 70°C durante 15 min para la inactivación de la actividad enzimática. Para la verificación de la eficiencia de la digestión, los productos digeridos fueron separados electroforéticamente, en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con GelRed™ staining (Biotium, Hayward, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los fragmentos de DNA digeridos fueron ligados con los adaptadores Eco RI (5' CTC GTA GAC TGC GTA CC 3') y Mse I (5' GAC GAT GAG TCC TGA G 3') con T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Ipswich MA, USA). La ligación se realizó en un volumen final de 60 µl por muestra. Cada reacción de ligación contenía 50 µl del producto de la doble digestión, 5 µM del adaptador Eco RI, 50 µM del adaptador Mse I, 1 U de T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Ipswich MA, USA) y agua bidestilada. La reacción

de ligación fue incubada a 37°C por 4 h, para generar el DNA molde, el cual fue utilizado en el siguiente paso de pre-amplificación.

La pre-amplificación consistió en amplificar el DNA molde con marcadores complementarios a los adaptadores y al sitio de restricción. Esta fue realizada en un volumen final de 25 µl, con 4 µl del producto de ligación, 1 X RedTaq ReadyMix™ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 0.5 µM de primer Mse I más un nucleótido selectivo (5' GAT GAG TCC TGA CTA A C 3'), 0.5 µM de Eco RI más un nucleótido selectivo (5' GAC TGG GTA CCA ATT C A 3') y agua bidestilada.

El programa de pre-amplificación consistió en 25 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos (s), seguido de un paso de alineamiento a 56°C por 60 s y una elongación a 72°C por 60 s. Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador Prime G Thermal Cycler (Techne Inc., Burlington, N.J., USA). Los productos de la pre-amplificación fueron separados electroforéticamente, en geles de agarosa al 1% y teñidos con GelRed™ staining (Biotium, Hayward, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Acto seguido, los productos de pre-amplificación fueron diluidos con agua bidestilada esterilizada en una proporción 1:4 para ser empleados como molécula molde para el paso de la amplificación selectiva.

En este paso se utilizaron cinco combinaciones (Cuadro 7) con primers de Eco RI y Mse I, más tres o cuatro nucleótidos selectivos adicionales a cada uno. Las reacciones de amplificación selectiva se realizaron en un volumen final de 10 µl, con 3 µl del producto de amplificación preselectiva, 1 X RedTaq ReadyMix,™ (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 0.5 µM de cada adaptador (Mse I y Eco RI) y agua bidestilada. Las muestras de DNA fueron amplificadas en un termociclador Prime G Thermal Cycler (Techne Inc., Burlington, N.J., USA). El programa de amplificación selectiva tuvo un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 60 s para la desnaturalización, un paso de alineamiento a 52 °C durante 60 s y una elongación a 72 °C durante 90 y un paso de extensión final a 72 °C por 10 min.

Cuadro 7. Combinaciones para amplificación selectiva.

No.	Combinaciones de AFLP	Secuencias
1	E + AAG / M + CAC	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A AAG 3'
		5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAC 3'
2	E + ACG / M + CAAG	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A ACG 3'
		5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAAG 3'
3	E + ACG / M + CAGC	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A ACG 3'
		5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAGC 3'
4	E + AAG / M + CAG	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A AAG 3'
		5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAG 3'
5	E + AAG / M + CGC	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A AAG 3'
		5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CGC 3'

Los productos de amplificación selectiva, fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% y teñidos con nitrato de plata de acuerdo a la metodología descrita por Sanguinetti *et al.*, (1994).

4.3.4. Análisis de datos

Se elaboró de manera manual, una matriz de datos binarios a partir de la presencia y ausencia de bandas en los geles de poliacrilamida. Los parámetros básicos de diversidad genética calculados fueron: el número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (H), heterocigosidad esperada (H_e) y porcentaje de polimorfismo (% P), los cuales se determinaron con el programa GenAIEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Las relaciones entre las diferentes accesiones de jamaica fueron establecidas empleando la metodología de Neighbor-Joining (N-J) (Saitou y Nei, 1987) con el programa Mega 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), además se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando el programa GenAIEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Digestión, Ilgación y Pre-amplificación

La digestión del DNA genómico de las 64 accesiones de jamaica en estudio fue completa (Figura 9), esto demostró que las muestras de DNA empleadas estaban libres de inhibidores enzimáticos. Los productos de digestión fueron ligados para obtener un DNA molde que se utilizó en el paso de la pre-amplificación, aunque la ligación fue incompleta ya que se observó debajo de cada muestra, una banda sólida de bajo peso molecular (los adaptadores) (Figura 10). Se procedió a realizar el paso de la pre-amplificación con los primers complementarios a los adaptadores y al sitio de restricción Eco RI y Mse I, más un nucleótido para cada una de ellos (Figura 11).

La eficiencia de la amplificación fue verificada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (8%) (Figura 12). Una vez confirmados los resultados de la pre-amplificación, se procedió a realizar la amplificación selectiva con las diferentes combinaciones de primers que previamente fueron identificadas como las más polimórficas.

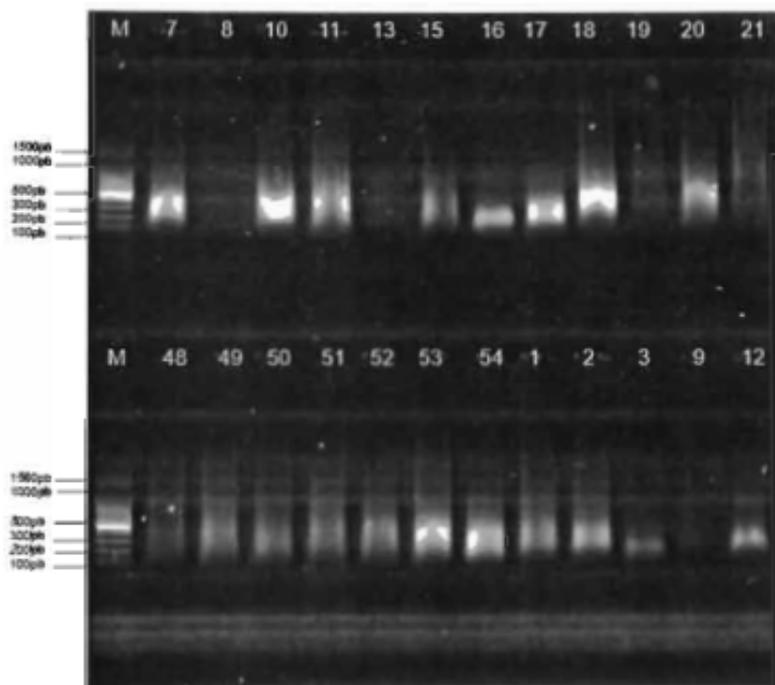


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de los productos de digestión (1 μ g de DNA). Los resultados obtenidos sugieren que la digestión de las muestras de DNA fue efectiva. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA digerido corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.

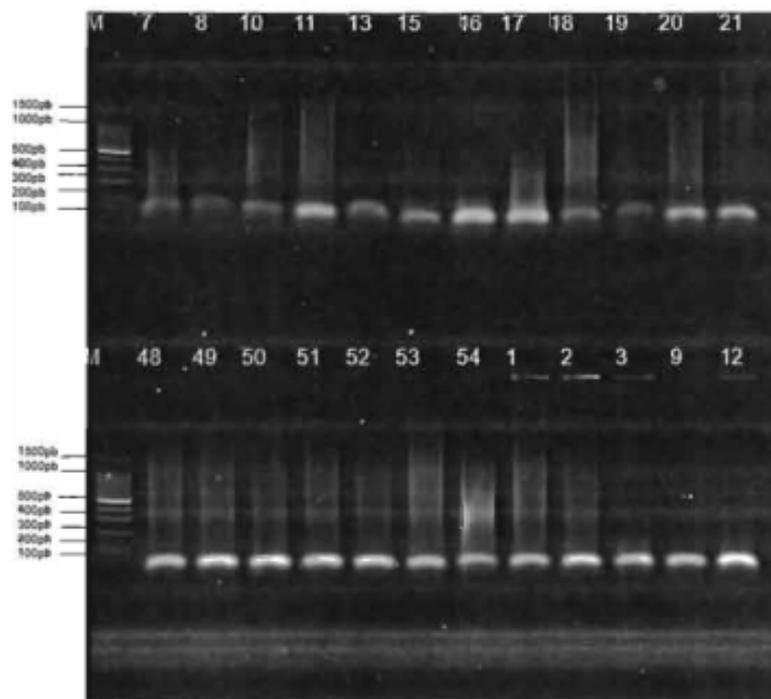


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de ligación. Los resultados obtenidos sugieren que la ligación de las muestras de DNA fue parcial. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA digerido corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.

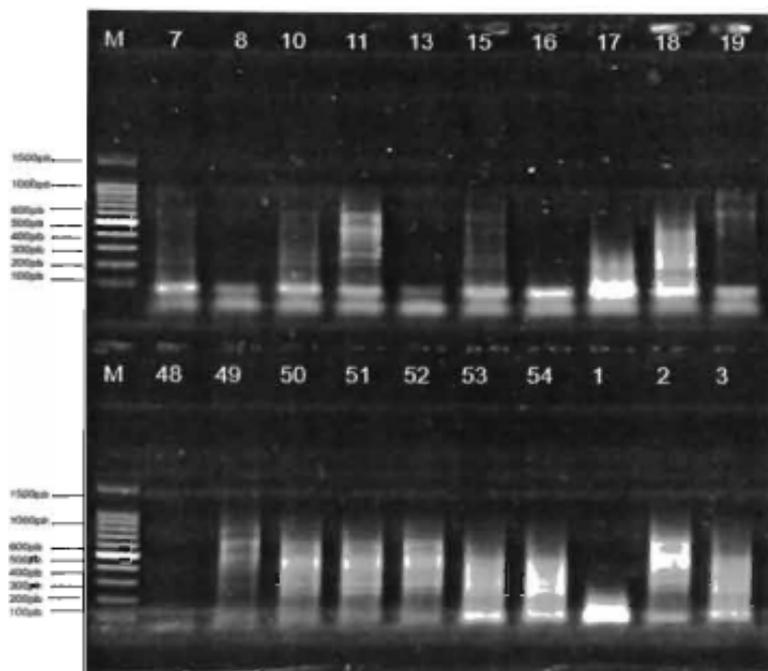


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de pre-amplificación. Los resultados obtenidos sugieren que la pre-amplificación de las muestras de DNA fue efectiva con fragmentos que van de 100 a 1000 pb. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA digerido corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.

4.4.2. Amplificación de los marcadores de AFLPs

Se detectaron un total de 162 loci (Cuadro 8), donde la combinación Eco RI + AAG/Mse I +CAC reveló el número mayor de bandas polimórficas, con un total de 45 (Figura 4), mientras que las combinaciones que detectaron la menor cantidad de polimorfismos fueron Eco RI + ACG/Mse I+CAGC y Eco RI + AAG/Mse I + CGC, detectando 24 bandas cada combinación. En total, las cinco combinaciones revelaron un 86.57% de polimorfismo.

Cuadro 8. Amplificaciones de AFLPs utilizadas y número de polimorfismos amplificados.

No.	Combinación AFLP	No. de loci
1	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A AAG 3'	45
	5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAC 3'	
2	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A ACG 3'	40
	5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAAG 3'	
3	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A AAG 3'	29
	5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAG 3'	
4	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A ACG 3'	24
	5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CAGC 3'	
5	5' GAC TGC GTA CCA ATT C A AAG 3'	24
	5' GAT GAG TCC TGA GTA A C CGC 3'	

Los parámetros de diversidad genética por poblaciones mostraron valores de número promedio de alelos por locus de $N_a = 1.80$, número efectivo de alelos por locus $N_e = 1.53$, índice de Shannon $I = 0.46$, heterocigosidad esperada $H_e = 0.31$ y el porcentaje

de loci polimórficos % $P = 86.57\%$ (Cuadro 9). El PCoA logró explicar el 59.61% de la variación genética.

Cuadro 9. Parámetros básicos de diversidad genética por poblaciones.

Poblaciones	N	Na	Ne	I	He	%P	No. Bandas
Nayarit	43	1.93	1.55	0.49	0.33	95.06%	159
Guerrero	10	1.83	1.56	0.48	0.32	88.27%	154
Colima	6	1.74	1.52	0.45	0.30	83.95%	146
Puebla	5	1.69	1.50	0.43	0.29	79.01%	146
Promedio	16	1.80	1.53	0.46	0.31	86.57%	151.25

El valor de la He detectado en el presente estudio fue de 0.310, un valor muy similar reportado por otros autores, $He = 0.305$, donde emplearon marcadores AFLPs (Ponciano e Hidalgo, 2012). Los autores emplearon 12 combinaciones de primers para las amplificaciones selectivas y obtuvieron 199 loci. En el presente estudio, empleamos 5 combinaciones selectivas y se identificaron 162 loci y un valor promedio de % $P = 32.4$. Los marcadores AFLPs también se han sido utilizado en estudios de otras especies como (*H. tiliaceus*) (Tang *et al.*, 2003), donde la heterocigosidad media esperada a nivel de especie fue (0.243), la cual fue elevado en comparación con otras especies con rasgos similares (Hamrick y Godt, 1990).

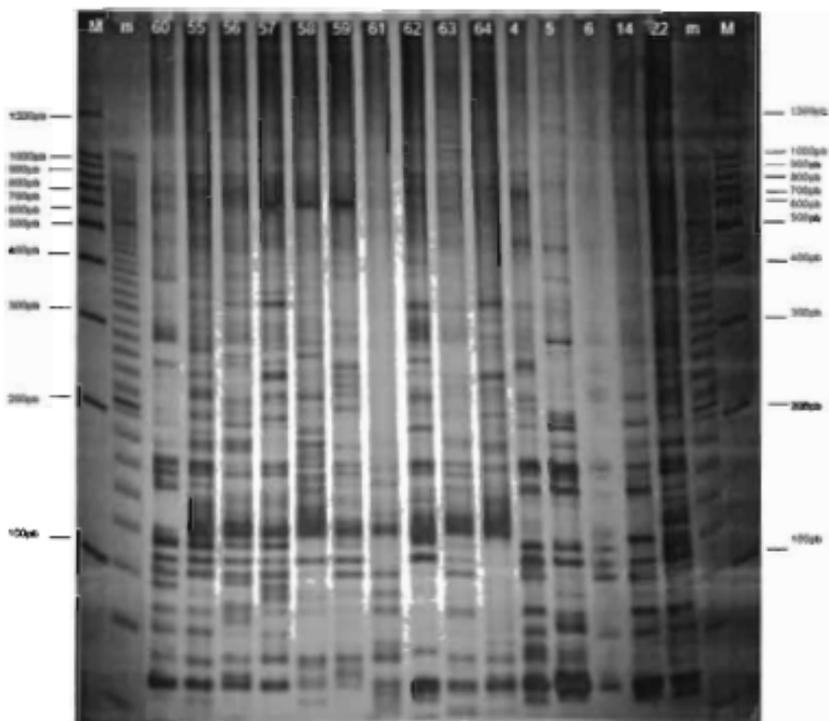


Figura 12. Productos de PCR amplificados con la combinación Eco RI + AAG/ Mse I + CAC de los marcadores AFLPs para diferentes accesiones de jamaica observándose mayor polimorfismo entre 100 y 300 pb. El número de muestra de DNA se indica en la parte superior del carril del DNA ligado corresponde a las muestras descritas en el Cuadro 1, Capítulo II.

El alto número de loci y niveles de polimorfismo, así como el valor de diversidad genética determinado, sugieren que en el presente estudio, las muestras analizadas son portadoras de niveles moderados a elevados de diversidad genética. Ya que las poblaciones tuvieron valores de heterocigosidad esperada muy similares entre sí, Nayarit con (0.33), Guerrero (0.32), Colima (0.30) y Puebla con (0.29) siendo esta población la que tuvo una menor diversidad genética. El porcentaje promedio de loci polimórficos en las cuatro poblaciones fue de 86.57%, siendo la población más polimórfica Nayarit, ya que se obtuvo un 95% de polimorfismo y Puebla fue la población que tuvo el polimorfismo más bajo 79%. Todas las poblaciones tuvieron en promedio el mismo número de alelos efectivos (1.5) los cuales serán transmitidos a la siguiente generación. Los datos mostrados en la (Figura 13) demostraron que los marcadores AFLPs son útiles en la estimación de parámetros de diversidad genética en jamaica.

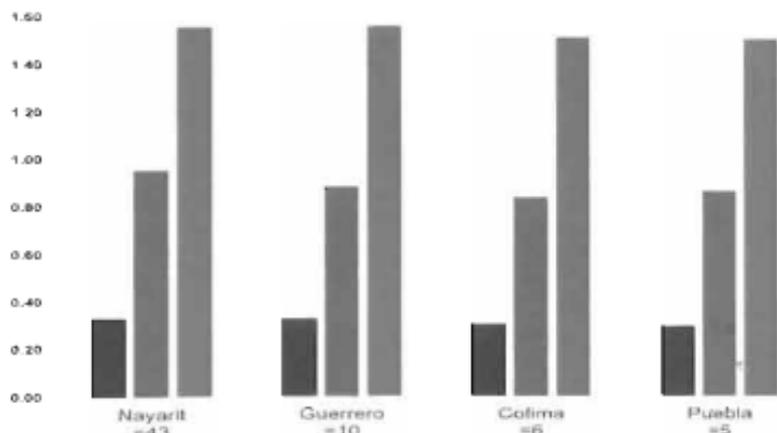


Figura 13. Promedio de parámetros de diversidad en poblaciones de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Número de accesiones por procedencia, Número efectivo de alelos por locus (barra verde), heterocigosidad esperada (barra azul) y porcentaje de loci polimórficos (barra amarilla).

Por otro lado, los mismos materiales fueron caracterizados agromorfológicamente, (características fenotípicas y de rendimiento) por Hernández *et al* (en proceso). Al igual

que en los resultados de caracterización genética, en el análisis agromorfológico se identificaron tres grupos principales y a su vez subgrupos que contenían sus subdivisiones, sin que hubiera alguna relación de agrupamiento por procedencias (Figura 13). Sin embargo, se observaron varias coincidencias entre los resultados de la caracterización agromorfológica y la molecular, pues se formaron algunas conglomeraciones de accesiones con características fenotípicas similares que las separan considerablemente de las demás y estas accesiones genotípicamente también se agruparon en la misma rama del dendograma, por ejemplo las accesiones (Mora x roja y Cruza negra) las cuales destacaron sobre las demás accesiones debido a sus características morfológicas.

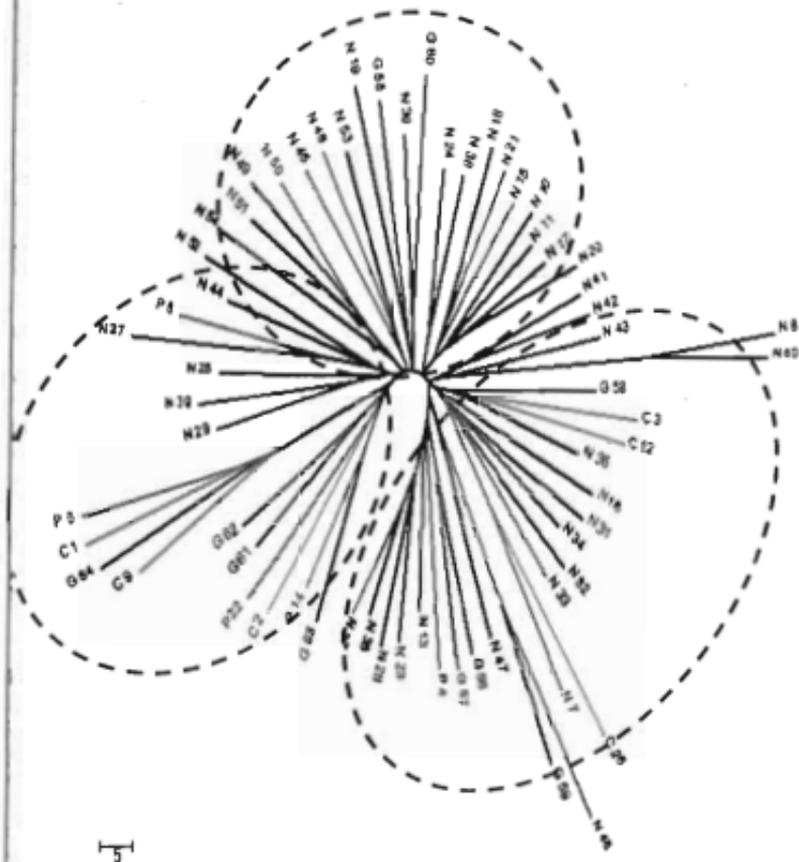


Figura 14. Dendrograma basado en N-J (Saitou y Nei, 1987) muestra que las cuatro poblaciones de jamaica fueron separadas en tres principales cada uno con subgrupos y subdivisiones. Nayarit (Azul), Guerrero (rojo), Colima (verde) y Puebla (rosa).

4.5. CONCLUSIONES

Los marcadores AFLPs son un sistema ideal para revelar la diversidad genética presente entre individuos, poblaciones y sus especies ya que permite detectar un alto número de polimorfismos además de ser una técnica altamente reproducible, con alta cobertura del genoma y sin requerir del conocimiento de una secuencia previa.

Este estudio en México es el primero en utilizar la colección más grande del mundo de accesiones de *H. Sabdariffa*, con un total de 64.

El nivel de polimorfismo es similar con otros estudios en comparación con otros estudios reportados en género y especie.

4.6. LITERATURA CITADA

Abadie, T. and Berretta, A. (2010). Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos pp. 86-96 En: Berretta A. Estrategias en los recursos fitogenéticos para los países del cono sur. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Montevideo, Uruguay. 170 pp.

Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17 (2): 221-242.

Benítez-Domínguez, L., Gómez-Merino, F., Trejo-Téllez, L. and Robledo-Paz, A. (2011). Anatomía y contenido de ácido abscísico y nutrimentos y germinación de semillas de heliconia. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34 (3): 189-196.

Cheng, Z., Lu, B. R., Sameshima, K., Fu, D. X. and Chen, J. K. (2004). Identification and genetic relationships of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm revealed by AFLP analysis. *Genetic Resources and crop evolution*, 51 (4), 393-401.

Demey, J., Zambrano, A., Fuenmayor, F. and Segovia, V. (2003). Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. *Interciencia*, 28 (12): 684-689.

Eguiarte, L., Souza, V. and Aguirre, X. (2007). Ecología Molecular. *Instituto Nacional de Ecología. México, D.F.*

Freeland, J. (2005). Molecular ecology *John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, England*, 373 pp.

Gianoli, E. (2004). Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. *Fisiología Ecológica en Plantas*. 13-25.

Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W. (1990). Allozyme diversity in plant species. In: brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Wiers BS. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, 43-63.

Hedrick, P. (2004). *Genetics of populations*. Jones & Bartlett Learning. Sudbury, Massachussets, USA. 732 pp.

Hernández-Villarreal, A.E., Navarrete-Valencia, A.L., Machuca-sanchez, M.L., Caro-Velarde, F.J., Luna-Esquivel, G. and Nuñez-Colin, C. (Proceso). Identificación de Variedades Agromorfológicas relevantes para la distinción de variedades de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Universidad autonoma de nayarit*.

Hidalgo-Villatoro, S. G., Cifuentes-Reyes, W. D. L., Ruano-Solis, H. H. and Cano-Castillo, L. E. (2009). Caracterización de trece genotipos de rosa de jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala. *Agronomía mesoamericana*, 20 (1): 101-109 g

Hussein, R., Shahein, Y., Hakim, A. and Awad, H. (2010). Biochemical and molecular characterization of three colored types of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of American Science*, 6 (11):726-733.

Jendereck, M., Shierenbeck, K. and Olney, A. (1997). Development of randomly amplified polymorphisms DNA markers characteristic of *H. rosa sinensis* and *H. syriacus*. *California Agricultural Technology Institute*, Number 970902. 7 p.

Joshi, R., Mohanty, S., Kar, B. and Nayak, S. (2012). Assessment of genetic diversity in zingiberaceae trough nucleotide binding site-based motif-directed profiling. *Biochemical Genetics*, 50 (7-8): 642-656.

Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (1993). MEGA: *molecular evolutionary genetics analysis*, 24 (8): 1596-1599.

Martinez, M., Helguera, M. and Carrera, A. (2010). Marcadores Moleculares. *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*, pp. 70-85. Revisando

Peakall, R.O.D. and Smouse, P.E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6 (1): 288.-295.

Ponciano-Samayoa, K M. and Hidalgo-Villatoro, S.G. (2012). Diversidad Genética de Rosa de Jamaica en Guatemala Revelada por Marcadores AFLP. *Agronomía Mesoamericana*, 23 (1): 63-71.

Qi-Xing, H., Xu-Chu, W., Hua, K., Yun-Ling, G. and An-Ping, G. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. *African Journal of Biotechnology*, 12 (19): 2727-2732.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4,406-425.

Sanguinetti, C. J., Dias, N. E. and Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*; 17 (5): 914-921.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28 (10): 2731-2739.

Tang, T., Zhong, Y., Jian, S. and Shi, S. (2003). Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) in China assessed using AFLP markers. *Annals of Botany*, 92 (3): 409-414.

Torres-Morán, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Ron-Parra, J., Parra-Tovar, G., Mena-Munguía, S., Rodríguez-García, A. and Rodríguez-Sahagún, A. (2011). Relationships among twelve genotypes of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) cultivated in western Mexico. *Industrial Crops and Products*, 34 (1):1079-1083.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407-4414.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1. Conclusiones Generales

Las modificaciones realizadas al método del CTAB para la extracción de DNA en *H. sabdariffa* L. permitieron obtener DNA de buena calidad y elevada cantidad. Por lo que se recomienda emplear el método modificado por Huang *et al.*, (2013) por los altos rendimientos y calidad del DNA obtenido, pudiendo este ser empleado en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

El CYP450 es una alternativa para el análisis de la diversidad genética ya que se puede encontrar mayor número de polimorfismos debido a la abundancia de esta familia de genes en los organismos vivos. Estos son los primeros resultados para *H. Sabdariffa* utilizando este tipo de marcadores. Además de que el nivel polimorfismo fue elevado en comparación con otros estudios y técnicamente, son menos demandantes.

Los marcadores AFLPs son un sistema ideal para revelar la diversidad genética presente entre individuos, poblaciones y sus especies ya que permite detectar un alto número de polimorfismos además de ser una técnica altamente reproducible, con alta cobertura del genoma y sin requerir del conocimiento de una secuencia previa. El presente estudio reveló niveles de diversidad genética similares a los reportados por otros autores, a pesar de haber empleado un menor número de combinaciones de primers durante la amplificación selectiva.

Este es el primer reporte en México en donde se emplean 64 accesiones de *H. Sabdariffa*.

5.2. Perspectivas Generales

Los protocolos de extracción y purificación de ácidos nucleicos son esenciales para la mayoría de las aplicaciones en biología molecular ya que son un punto de partida muy importante. En plantas, el éxito de las aplicaciones biotecnológicas donde se ve involucrado el uso del DNA dependerá en una gran medida de la pureza y el rendimiento que se logra obtener después de una extracción. Debido a que las plantas secretan metabolitos secundarios los cuales son muy variados entre especies y en (especial la jamaica, la cual contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, proantocianidinas, flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavononas y antocianinas, no es posible aplicar un solo método de extracción universal y deben ser modificados caso por caso.

Nuestros resultados sugieren que para futuras investigaciones en las cuales sea necesario extraer DNA de jamaica, se utilice el método de Huang *et al.*, (2013) con las modificaciones aquí señaladas.

Por otro lado, la información primaria sobre la diversidad genética de las plantas es fundamental para su conservación, y todo programa de mejoramiento genético. Este estudio reporta por primera vez la aplicabilidad del marcador Citocromo P450, revelando niveles de polimorfismo iguales o superiores a otros sistemas de marcadores similares (AFLPs), con la gran ventaja de ser técnicamente menos laboriosos. Adicionalmente, pueden ser extremadamente útiles en la evaluación de materiales que no cuenten con marcadores moleculares específicos, como los SSRs.

Finalmente, el uso de los marcadores AFLPs verificó los niveles de diversidad genética obtenidos con el sistema de CYP450. El empleo de los AFLPs también permitió la comparación de los resultados del presente trabajo con otros trabajos reportados a nivel internacional, donde los materiales evaluados en el presente estudio conservan niveles similares de diversidad genética a los reportados a nivel mundial.

Para futuros trabajos sobre diversidad genética, se recomienda emplear un mayor número de combinaciones de primers durante la amplificación selectiva, además de

las combinaciones empleadas aquí, para poder tener una mejor medición de los niveles de diversidad genética dentro de los materiales de jamaica mexicanos.

A pesar de la variabilidad natural existente, generar una mayor diversidad por medio de un programa de cruza o inducción de mutaciones puede ser de utilidad para mejorar algunas características de interés como resistencia a enfermedades y mayor contenido de ácidos u otros componentes medicinales.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para la extracción de DNA en plantas (Haque et al., 2008)

El procedimiento de extracción se describe a continuación: a 50 mg de tejido liofilizado se agregaron 1000 μ l del buffer de extracción (previamente calentado a 65 °C) realizándose al menos 10 inversiones manuales suaves de cada tubo, para lograr una mezcla homogénea del buffer y la muestra de tejido. Posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 65 °C, en agitación constante, durante 90 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se retiraron del horno y se dejaron enfriar durante 5 minutos aproximadamente a temperatura ambiente (TA). Se adicionaron 500 μ l de cloroformo/isoamil alcohol (24:1) mezclando suavemente los tubos por inversión durante 10 min a TA. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 4500 x g. La fase superior fue decantada en un tubo nuevo de 2 mL y se repitió el mismo procedimiento. Después de la segunda centrifugación, la fase superior fue transferida a un tubo nuevo de 2 mL que contenía 5 μ l de RNasa (10 mg/mL) por medio de una pipeta, teniendo especial cuidado de no absorber la interfase, nuevamente las muestras se mezclaron por inversión cuatro veces y se dejaron incubar por 30 minutos a TA o 37 °C.

El DNA se precipito adicionando 600 μ l de isopropanol frio a cada muestra (en este paso se observó la formación de la hebra de DNA), para después centrifugar los tubos a 4500 x g durante 10 minutos. El isopropanol fue decantado, se tuvo especial cuidado de no desprender la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Se realizaron dos lavados con etanol al 75 y 95% durante cinco minutos, centrifugando después de cada lavado a 4500 x g durante 10 minutos.

Finalmente, la pastilla de DNA se dejó secar durante toda la noche en oscuridad, para eliminar todo el residuo de alcohol. Al día siguiente la pastilla de DNA fue resuspendida en 300 μ l de buffer TE (1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.0).

Anexo 1. Protocolo para la extracción de DNA en plantas (Doyle-Doyle *et al.*, 1987)

El procedimiento de extracción se describe a continuación: a 50 mg de tejido liofilizado se agregaron 1000 μ l del buffer de extracción (previamente calentado a 65 °C) realizándose al menos 10 inversiones manuales suaves de cada tubo, para lograr una mezcla homogénea del buffer y la muestra de tejido. Posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 65 °C, en agitación constante, durante 90 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se retiraron del horno y se dejaron enfriar durante 5 minutos aproximadamente a temperatura ambiente (TA). Se adicionaron 500 μ l de cloroformo/isoamil alcohol (24:1) mezclando suavemente los tubos por inversión durante 10 min a TA. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 4000 rpm. La fase superior fue decantada en un tubo nuevo de 2 mL y se repitió el mismo procedimiento.

Después de la segunda centrifugación, la fase superior fue transferida a un tubo nuevo de 2 mL que contenía 5 μ l de RNasa (10 mg/mL) por medio de una pipeta, poniendo especial cuidado de no absorber la interfase, nuevamente las muestras se mezclaron por inversión cuatro veces y se dejaron incubar por 30 minutos a TA o 37 °C.

El DNA fue precipitado adicionando 70 μ l de 5M NaCl y 1 mL de etanol absoluto (en este paso se observó la formación de la hebra de DNA) y se refrigeró por media hora a -20 °C, después centrifugo a los tubos a 4000 rpm durante 10 minutos. El etanol absoluto y restos de sales del NaCl fueron decantados, se tuvo especial cuidado de no desprender la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Se realizaron dos lavados con wash2 y etanol al 75% durante cinco minutos, centrifugando después de cada lavado a 4000 rpm durante 10 minutos.

Finalmente, la pastilla de DNA se dejó secar durante toda la noche en oscuridad, para eliminar todo el residuo de alcohol. Al día siguiente la pastilla de DNA fue resuspendida en 300 μ l de buffer TE (1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.0).

Anexo 3. Protocolo para la extracción de DNA en plantas (Huang *et al.*, 2013)

El procedimiento de extracción se describe a continuación: a 50 mg de tejido liofilizado se agregaron 1000 μ l del buffer de extracción previamente calentado a 65 °C) realizándose al menos 10 inversiones manuales suaves de cada tubo, para lograr una mezcla homogénea del buffer y la muestra de tejido. Posteriormente, las muestras se colocaron en un horno a 65 °C, en agitación constante, durante 45 minutos.

Una vez que transcurrió ese tiempo, las muestras se retiraron del horno y se dejaron enfriar durante 5 minutos aproximadamente a temperatura ambiente (TA). Se adicionaron 700 μ l de diclorometano y se mezcló con el vortex hasta que se logró una mezcla homogénea. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 14000 x g. La fase superior fue decantada en un tubo nuevo de 2 mL y se repitió el mismo procedimiento.

Después de la segunda centrifugación, la fase superior fue transferida a un tubo nuevo de 2 mL que contenía 5 μ l de RNasa (10 mg/mL) por medio de una pipeta, teniendo un especial cuidado de no absorber la interfase, posteriormente las muestras se mezclaron por inversión cuatro veces y se dejaron incubar por 30 minutos a TA o 37 °C.

El DNA fue precipitado adicionando 800 μ l de isopropanol frío a cada muestra (en este paso se observó la formación de la hebra de DNA) y se refrigeró por media hora a -20 °C para después centrifugar los tubos a 14000 x g durante 10 minutos. El isopropanol fue decantado, teniendo especial cuidado de no desprender la pastilla de DNA en el fondo del tubo. Se realizaron dos lavados con etanol al 75 y 95% durante cinco minutos, centrifugando después de cada lavado a 14000 x g durante 10 minutos.

Finalmente, la pastilla de DNA se dejó secar durante toda la noche en oscuridad, para eliminar todo el residuo de alcohol. Al día siguiente la pastilla de DNA fue resuspendida en 300 μ l de buffer TE (1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.0).

Anexo 2. Preparación de reactivos

Buffer 10X TBE

	1 L
Tris (PM 121.10)	108 g
0.5 M EDTA pH 8.0	40 mL
Ac. Bórico (PM 61.38)	55 g
ddH ₂ O	Aforar a 1000 mL.

Buffer 5X TBE

	1 L
TBE 5X	500 mL
ddH ₂ O	Aforar a 1000 mL.

Buffer 1X TBE

	1 L
Buffer 10X TBE	100 mL
ddH ₂ O	Aforar a 1000 mL.

Solución de fijación

Solución concentrada	200 mL
Etanol Absoluto	20 mL.
Ácido Acético	1 mL.
ddH ₂ O	Aforar a 200 mL.

Solución de Tinción

Reactivo	500 mL
----------	--------

Nitrato de plata (AgNO ₃)	1 g
---------------------------------------	-----

ddH ₂ O	Aforar a 500 mL
--------------------	-----------------

Solución de Revelado

Reactivo	200 mL
----------	--------

Hidruído de Sodio (NaOH)	6 g
--------------------------	-----

Formaldehído	1 mL
--------------	------

DdH ₂ O	Aforar a 200 mL
--------------------	-----------------

Solución de Stop

Reactivo	500 mL
----------	--------

1.5% Na ₂ EDTA ₂ H ₂ O	7.5 g
---	-------

ddH ₂ O	Aforar a 500 mL
--------------------	-----------------

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS IN VARIETIES OF ROSELLE (*Hibiscus sabdariffa* L.) BY CYP-50 MARKERS

(Análisis de Diversidad Genética de Variedades de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) Mediante Marcadores CYP450)

Alejandro Rubio Melgarejo^{1*}, Moisés Cortés-Cruz², María Luisa Mathuca Sánchez³, Leticia Mónica Sánchez Herrera³, Yolotzin Apatzingan Palomino Hermosillo³

¹ Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP/ Boulevard de la Biodiversidad No. 400, Tepatitlán de Morelos C.P. 47600, Jalisco

² Universidad Autónoma de Nayarit, programa de Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias (CBAP) / Ciudad de la Cultura "Amado Nervo". Tepic, Nayarit, México. C.P. 63155 Tel. (311) 211 8800.

*Autor que presentó el trabajo.

+Autor para correspondencia: cortes.moises@inifap.gob.mx

Área del Conocimiento: Agrobiotecnología.

ABSTRACT

Roselle crop (*Hibiscus sabdariffa* L.) is originary from Africa, belongs to the Malvaceae family and is cultivated in 15 states of Mexico. Current studies of roselle varieties show that its genetic diversity is the result of natural crosses and selection. However, in Mexico, there is a lack of information regarding varietal identification, population diversity and genetic structure. Although there are some studies about roselle, they only included few samples or different *Hibiscus* species. Considering this, the main objective of the present work is to estimate and characterize the genetic diversity of varieties of roselle cultivated in Mexico using molecular markers derived from cytochrome P450 (CYP450). Genomic DNA was obtained using a modified CTAB method from lyophilized leaf tissue from 63 different accessions from Nayarit, Guerrero, Colima and Puebla. The respective molecular analysis was performed using two different primer combinations, CYP1A1F/CYP2B6R and CYP2B6F/CYP1A1R by PCR. PCR products were resolved by vertical electrophoresis on 6% polyacrylamide gel, and stained with silver nitrate. The basic genetic diversity parameters and principal coordinate analysis (PCoA) were performed with GenAlEx 6.5 software. Phylogenetic relationships were calculated using Neighbor-Joining (N-J) with MEGA 5.2 software. Results showed 100 % of polymorphism, and 0.420 Nei's Diversity Index. This value suggest moderate to high genetic diversity, in comparison with other previous studies (0.305, using AFLP's markers). The PCoA identified four main groups (first three coordinates explain 74.76 % of variation). The N-J grouped two different main clusters, each one with two subgroups. These clusters allow the identification of the parental lines for the Nayarit sub-group, by placing them on the opposite ends of the dendrogram, while the other materials showed no grouping trend to identify varieties Nayarit materials, placing them at opposite sides of dendrogram while the rest of the materials showed no grouping trend.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L.; cytochrome P450; genetic diversity; principal coordinates.

RESUMEN

El cultivo de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es originaria de África, pertenece a la familia Malvaceae. En nuestro país, es cultivada en 15 estados de la República. La diversidad genética presente en las

variedades actualmente utilizadas está dada principalmente por cruzamientos naturales y selección; no obstante existe un vacío en la identificación varietal, estudios sobre diversidad y estructura genética de las mismas. Aunque existen algunos estudios a nivel internacional, el número de muestras utilizado ha sido limitado o se han enfocado en otras especies de *Hibiscus*. Por tal motivo, es necesario estimar la diversidad genética de las variedades de Jamaica mediante marcadores moleculares. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la diversidad genética de las variedades de Jamaica cultivadas en México con marcadores derivados del citocromo P450 (CYP450). Se incluyeron 63 accesiones originarias de Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. El DNA genómico se obtuvo a partir de tejido foliar liofilizado mediante el método de CTAB modificado. Para el análisis molecular se utilizaron las combinaciones de primers CYP1A3F/CYP2B6R y CYP2B6F/CYP1A1R. Se realizó la amplificación de los fragmentos por PCR y se visualizaron en geles de poliacrilamida (6%). Los parámetros básicos de diversidad genética y el análisis de coordenadas principales (ACoP) fueron realizados con el software GenAlEx 6.5. Las relaciones filogenéticas se identificaron con base a la metodología de Neighbor-Joining (N-J) con el software Mega 5.2. En los resultados se observó un 100% de polimorfismo y 0.420 de heterocigosidad esperada, siendo esta última considera como moderada a alta, en comparación con otros resultados previos [0.305, empleando marcadores AFLP's]. A través del ACoP las accesiones se separaron en cuatro grupos principales (los tres primeros ejes explican el 74.76 % de la variación), mientras que en el dendrograma N-J las muestras de Jamaica fueron separadas en dos grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones. Este último análisis separó claramente los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, ubicándolos en los extremos opuestos del dendrograma mientras que el resto de los materiales no mostraron ninguna tendencia en la agrupación.

Palabras Clave: *Hibiscus sabdariffa* L.; Citocromo P450; diversidad genética; coordenadas principales.

INTRODUCCIÓN

La jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), también conocida como flor de jamaica, rosa de Jenicó y roselle, es una planta dicotiledónea de la familia Malvaceae, que tiene su centro de origen en África [1, 2]. Actualmente es cultivada en regiones tropicales y subtropicales de Asia, Oceanía y América [3]. Esta planta fue introducida en México en el siglo XVII, desde entonces se ha cultivado en 15 estados del país, siendo Guerrero, Oaxaca, Michoacán y Nayarit los principales productores [4]. En cuanto a sus características morfológicas, la jamaica es una planta anual con tallo semileñoso, raíz pivotante, hojas alternas de color verde con bordes aserrados, peciolo largos y erguidos. Es una especie autógama con flores axilares y solitarias, presentando un número cromosómico $2n = 4x = 72$ [5]. La corola es acampanada de color rosado o pálido. Esta se marchita y desaparece, dejando el cáliz libre. El fruto tiene una forma capsular que contienen un promedio de 20 semillas las cuales tienen un color negro [6]. De acuerdo a la variedad, el rendimiento del cáliz en toneladas oscila entre 0.5 a 2 toneladas por hectárea [3]. A pesar de la importancia de la jamaica, existe restringida información sobre la diversidad genética en esta especie. La mayoría de los estudios disponibles se han realizado con marcadores RAPD's y AFLP's donde el número de muestras utilizadas ha sido limitado o se han enfocado en otras especies del género *Hibiscus* [3]. Sin embargo, basados en las observaciones en campo, se sospecha que tiene una amplia diversidad genética, reflejado en su fenotipo, producto de la adaptación en los diferentes sitios de introducción. En la actualidad, los marcadores moleculares son herramientas que permiten cuantificar la diversidad genética, la elección del mismo dependerá del tipo de estudio. En plantas superiores, el citocromo P450 (CYP450) juega un papel importante en la síntesis de enzimas que intervienen el proceso de las biosíntesis de metabolitos y desintoxicación. Debido a su abundancia de esta familia de

genes en organismos vivos se ha explorado la posibilidad de emplearlos como marcadores universales en estudios genéticos [7]. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad genética de las variedades de jamaica cultivadas en México mediante el empleo de marcadores derivados del CYP450.

METODOLOGÍA

Se emplearon 63 accesiones de germoplasma de jamaica, las cuales fueron recolectadas en cuatro estados productores de México: Nayarit, Guerrero, Colima y Puebla. Estas accesiones son materiales mejorados y de uso común en estas regiones, obtenidos por la Universidad Autónoma de Nayarit y el Centro Experimental Iguala del INIFAP en el estado de Guerrero (Cuadro 1). Para la extracción de ADN, se emplearon hojas verdaderas de cada accesión después de 25 días de germinación. El método empleado fue el basado en CTAB con modificaciones [8].

Cuadro 1. Identificación de las accesiones de jamaica y procedencia.

No. Accesión	Variedad	Procedencia	No. Accesión	Variedad	Procedencia	
1	Tempranilla negra	Colima	33	UAN 17	Nayarit	
2	Tempranilla dor	Colima	34	UAN 20	Nayarit	
3	Colima	Colima	35	UAN 27	Nayarit	
4	Yerba acrofoliada	Puebla	36	UAN 28	Nayarit	
5	Crisola roja	Puebla	37	UAN 10 ₁	Nayarit	
6	Crisola roja violeta	Puebla	38	UAN 19 ₁	Nayarit	
7	Crisola Huelmore	Nayarit	39	UAN 15	Nayarit	
8	Negra UAN	Nayarit	40	UAN 24	Nayarit	
9	Crisola rosada	Colima	41	UAN 17	Nayarit	
10	UAN 5	Nayarit	42	UAN 20	Nayarit	
11	UAN 4	Nayarit	43	UAN 28	Nayarit	
12	Crisola super precoz	Colima	44	UAN 10 ₁	Nayarit	
13	Crisola puebla precoz	Nayarit	45	UAN 28	Nayarit	
14	Crisola precoz	Puebla	46	UAN 25 ₁	Nayarit	
15	Negra Quilapinta	Nayarit	47	UAN 19	Nayarit	
16	China	Nayarit	48	UAN 30	Nayarit	
17	UAN 6 Popa	Nayarit	49	UAN 9	Nayarit	
18	UAN 31	Nayarit	50	UAN 16	Nayarit	
19	UAN 6 ₁	Nayarit	51	UAN 19	Nayarit	
20	UAN 14 ₁	Nayarit	52	UAN 21 ₁	Nayarit	
21	UAN 6 Huelmore	Nayarit	53	UAN 10 ₂	Nayarit	
22	Morada x rosa	Puebla	54	UAN 16 ₁	Nayarit	
23	UAN 25	Nayarit	55	2 MQ ₂	Guerrero	
24	Bolnudo	Nayarit	56	20 ₁	Guerrero	
25	UAN 7	Nayarit	57	4 Q ₁	Guerrero	
26	Tempranilla roja	Colima	58	6 Q ₂	Guerrero	
27	UAN 23	Nayarit	59	7 Q ₁	Guerrero	
28	UAN 11	Nayarit	60	10 ₂	Guerrero	
29	UAN 24	Nayarit	61	8 rosas negras	Guerrero	
30	UAN 21	Nayarit	62	10	pl/rojo/rojo	Guerrero
31	UAN 8	Nayarit	63	11 rosas	Guerrero	
32	UAN 13	Nayarit				

Análisis con marcadores derivados de CYP450. Para el análisis molecular fueron empleadas dos combinaciones de primers derivados del citocromo P450: CYP2B6F/CYP1A1R y CYP1A1F/CYP2B6R. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó en un volumen total de 15 μ L, conteniendo 50 ng de ADN, 0.66 μ M de cada primer, 3 mM de MgCl₂ y 0.6X de REDTaq[®] ReadyMix[™] PCR (SIGMA-ALDRICH). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 54°C, 90 s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 6 % y se tiñeron con nitrato de plata [9]. Se elaboró una matriz de datos binarios a partir de la presencia y ausencia de bandas en los geles de poliacrilamida. Los parámetros básicos de diversidad genética calculados fueron el número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad esperada (H_e) y porcentaje de polimorfismo [%P], los cuales se obtuvieron por medio del programa GENAIEX 6.5 [10]. Las relaciones filogenéticas entre las diferentes accesiones de jamaica fueron establecidas empleando la metodología de Neighbor-Joining [N-J] con el programa Mega 5.2 [11] además se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando el programa GENAIEX 6.5.

RESULTADOS

Se detectaron un total de 22 loci, donde la combinación CYP1A1F/CYP2B6R reveló el número mayor de bandas polimórficas con un total de 12, mientras que la segunda combinación, CYP2B6F/CYP1A1R, detectó 10. Ambas combinaciones revelaron un 100% de polimorfismo. La H_e fue de 0.420, el número de alelos diferentes encontrados fue de 2 y el número de alelos efectivos fue 1.7. El PCoA mostró que las tres primeras coordenadas lograron explicar el 74.76 % de la variación. La proyección de las accesiones en las dos primeras coordenadas principales permitió distinguir cuatro grupos (Figura 1). El dendrograma basado en el método N-J muestra que las 63 accesiones de jamaica fueron separadas en dos grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones (Figura 2), además, no se identificaron genotipos duplicados.



Figura 1. La PCoA en dos dimensiones muestra la relación entre las 63 accesiones de jamaica con base en los datos de obtenidos con dos combinaciones de marcadores derivados del CYP450. Nayarit (verde), Guerrero (rojo), Colima (negro) y Puebla (amarillo).

DISCUSIÓN

La H_e en el presente trabajo (0.420) se considera como moderada a alta, en comparación con otros estudios previos (0.305), en el cual emplearon marcadores AFLP's [12]. Además el CYP450 se ha utilizado en estudios de otras especies como (*Oryza sativa* L.) [13] y (*Curcuma amada* Roxb) [14], en los cuales han permitido tener niveles altos de diversidad genética. Esto demuestra que los marcadores derivados del CYP450 son útiles en la estimación de parámetros de diversidad genética. El análisis de correspondencia en dos dimensiones aplicado a las 63 accesiones de jamaica mediante las dos combinaciones (Figura 1), demostró que algunas accesiones tienen entre si una mayor relación genética ya que definió cuatro grupos principales aquellos que sus genotipos están genéticamente relacionados. [8]. Las relaciones genéticas entre las accesiones de jamaica se establecieron a partir de un dendrograma donde se determinó que no existen genotipos duplicados y ubicó a los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, en los extremos del dendrograma (Figura 2). Sin embargo, para el resto de los materiales, no se identificó ninguna tendencia en la agrupación. Al contrastar las PCoA con el dendrograma N-J se observa claramente como los materiales no se agrupan de acuerdo a su lugar de procedencia.

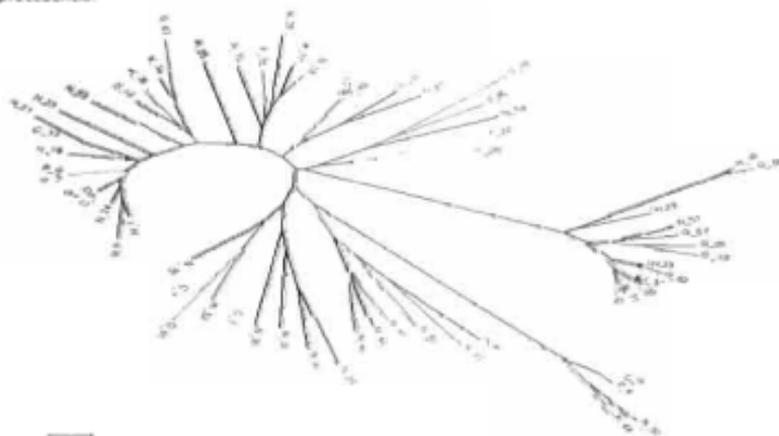


Figura 2. Dendrograma basado en N-J [15] muestra que las 63 accesiones de jamaica fueron separadas en dos grupos diferentes y cada uno con dos subgrupos y subdivisiones. Nayarit (Azul), Guerrero (rojo), Colima (verde) y Puebla (rosa).

CONCLUSIONES

La utilización de los marcadores del citocromo P450 en accesiones de *H. sordaniifolia* L. y su análisis separó claramente los progenitores que dieron origen a los materiales de Nayarit, ubicándolos en los extremos opuestos del dendrograma mientras que el resto de los materiales no mostraron ninguna tendencia en la agrupación.

En el presente estudio, empleando 63 accesiones de Jamaica, se identificaron altos niveles de diversidad comparado con otros resultados. Estos resultados indican que el CYP450 es una opción para el análisis de la diversidad genética ya que se puede encontrar mayor número de polimorfismos debido a la abundancia de esta familia de genes en los organismos vivos. Además, no se encontraron accesiones duplicadas.

REFERENCIAS

- [1] Maiti, R., Rodriguez, H., Satya, P. (2010), "Horizon of world plant fibres: an insight", Pushpa Publishing House, Kolkata
- [2] Solorzano, R., Macario, T. (2002), "Estudio de la factibilidad del cultivo, procesamiento y comercialización de la rosa de Jamaica ", ALTERTEC/SEPRAGO, Guatemala, 16 p.
- [3] Gómez, J., Martínez, L., López, I., Silos, H., Ramírez, F., Andrade, I. (2008), "Multiple shoot regeneration of Roselle (*H. sabdariffa* L.) from a shoot apex culture system", International journal of Botany, 4(3):326-302.
- [4] Domínguez, L., Sánchez, M., López, S., Morales, R. (2007), "Propiedades físicas de la semilla de Jamaica Criolla Mexicana (*Hibiscus sabdariffa* L.) en función de su contenido de humedad", Ciencias Agrícolas Informa, 16:30-36.
- [5] Alcoces, N. (2009), "Estudios citogenéticos de *H. sabdariffa* L. (Malveaceae)", UDO Agrícola, 9(3):595-598.
- [6] Hidalgo, S., De León, W., Ruano, H., Cano, L. (2009), "Caracterización de trece genotipos de rosa de Jamaica *Hibiscus sabdariffa* en Guatemala", Agronomía Mesoamericana, 20(1):101-109.
- [7] Inui, H., Kodama, T., Ohkawa, Y., Ohkawa, H. (2000), "Herbicide metabolism and cross-tolerance in transgenic potato plants co-expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19". Pesticide Biochemistry and Physiology, 66(1): 116-129.
- [8] Huang, Q., Wang, X., Kong, H., Guo, Y., Guo, A. (2013), "An efficient DNA isolation method for tropical plants", 12(19):2727-2732.
- [9] Sanguinetti, C., Días, E., Simpson, A. (1994), "Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels", BioTechniques, 17(5):914-921.
- [10] Peakall, R., Smouse, P. (2012), "GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update", Bioinformatics, 28:3537-3539.
- [11] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011), "MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods", Molecular biology and evolution, 28(10): 2731-2739.
- [12] Ponciano, K., Hidalgo, S. (2012), "Diversidad genética en rosas de Jamaica en Guatemala revelada por marcadores AFLP", Agronomía Mesoamericana, 23(1):16-21.

- [13] Yamanaka, S., Jatoi, S., San, S., Kothari, S., Htut, T., Watanabe, K. (2013), "Genetic diversity of Myanmar rice and their implementation on management methods", *African Journal of Biotechnology*, 10(8): 1290-1298.
- [14] Jatoi, S., Kikuchi, A., Ahmad, D., Watanabe, K. (2010), "Characterization of the genetic structure of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) from Myanmar in farm and genebank collection by the neutral and functional genomic markers", *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6): 4-5.
- [15] Saitou, N., Nei, M. (1987), "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.