

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto tecnológico de Conkal



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL RAMÓN (*Brosimum alicastrum*) EN LOS ESTADOS DE YUCATÁN Y CAMPECHE

TESIS

Que presenta:

ERNESTO ALFONSO CANTO RAMÍREZ

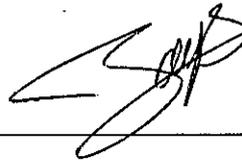
Como requisito parcial para obtener el título de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Conkal, Yucatán, México
2015

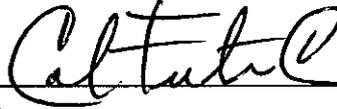
La presente Tesis fue realizada por Ernesto Alfonso Canto Ramírez, pasante de la carrera de Licenciatura en Biología, con especialidad en Agroecología y con número de control 09800305, dirigida y revisada por el jurado que fue asignado en su oportunidad, y cuyos integrantes firman su consentimiento para que este trabajo sea presentado como requisito parcial para la Titulación de acuerdo con la opción I del Manual de Procedimientos de Titulación y con las bases normativas vigentes.

PRESIDENTE



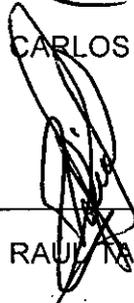
DR. ROBERTO ZAMORA BUSTILLOS

SECRETARIO



DR. CARLOS FRANCISCO DE JESÚS FUENTES CERDA

VOCAL



DR. RAUL TAPIA TUSSELL

Conkal, Yuc. Octubre 2015

DEDICATORIA

Hay mucha gente a la que tengo que agradecer por este trabajo pero más que nada a mis padres porque son un ejemplo de vida, me enseñaron a valorar lo que es importante, me alentaron a cumplir mis metas, me dieron una educación, cariño, apoyo y su confianza; por eso les dedico a ellos este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico de Conkal por sus años de formación y apoyo durante todo este tiempo, en el cual me vio crecer como estudiante y me formó como un profesionalista.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a toda la comunidad CICY por su ayuda y confianza durante mi estancia.

Agradezco a mi asesor el Dr. Raúl Tapia Tussell por todo su apoyo, ayuda y confianza que me brindó todo este tiempo. Gracias por su paciencia, consejos y por compartir su experiencia y conocimientos para mi formación. Gracias porque a pesar de todo no dejó de apoyarme y me hizo comprender que todas las experiencias nos ayudan a ser mejores, que de lo errores se aprende y que ningún logro es fácil de alcanzar.

A mi Co-asesor el IQI. Alberto Cortez Velázquez por compartir sus conocimientos, corregirme cuando era necesario y por su paciencia durante todo este tiempo. Gracias por su apoyo y dedicación porque me harán crecer como profesionalista.

Al Dr. Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerda por su amabilidad, amistad, gran apoyo y su tiempo empleado en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Roberto Zamora Bustillos por su amabilidad y tiempo en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra por la oportunidad brindada de efectuar el presente trabajo, por su amabilidad y el apoyo para obtener una beca.

A la Doctora Daisy Pérez Brito y todo el equipo de GeMBio por permitirme formar parte de ellos, por su apoyo y amabilidad durante mi servicio social, residencia y tesis de licenciatura.

A la L.A.E. Bertha Arely Ramírez González, por su apoyo en la estructuración electrónica de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, Rubí Chablé, Abril Díaz, Claudia Torres, Sandy Guardia, Jacqueline Rodríguez, Teresita Valencia, Tania Solís, Edgar Olguín, Alberto Cauich, Emy Huchin, Erick Aguilera y en especial al M.C. Anuar Magaña por sus consejos y su apoyo.

A mis amigos Adriana Rivero, Jesús Avilés, Karla Zenteno, Wendy Solano, Josué Ley, Gerardo Lara, David Chan, José Luis Trejo, Hanzel Achach, René Galán, David Huchín, Luz María Contreras, Diana Contreras y en especial a Alberto Cauich Rejón por todo el apoyo que me dio durante mi estancia en el Centro de Investigación Científica de Yucatán.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Origen y Distribución.....	4
2.2 Clasificación taxonómica.....	5
2.3 Descripción botánica.....	6
2.4 Usos del ramón.....	8
2.5 Definición de Diversidad Genética	10
2.6 Marcadores Moleculares.....	11
2.6.1. Extracción de ADN.....	11
2.6.2. Cuantificación del ADN	13
2.6.3. Integridad del ADN.....	14
2.6.4. Inhibidores de la PCR	14
2.6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
2.6.6. Huella genética	18
III. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
IV. HIPÓTESIS	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1 Colecta de material vegetal.....	23
5.2 Estandarización de un protocolo de extracción de ADN de hoja de ramón	24
5.3 Calidad e Integridad del ADN.....	26
5.4 Cuantificación del ADN	26
5.5 Huella genética (DAMD)	27
5.6 Análisis de la diversidad genética	28
VI. RESULTADOS Y RECOMENDACIONES	29
6.1 Colecta del material vegetal.....	29
6.2 Estandarización de un protocolo de extracción de ADN para <i>Brosimum</i> <i>alicastrum</i>	30
6.3 Huella genética de <i>Brosimum alicastrum</i> mediante marcadores moleculares DAMD31	

VII. CONCLUSIONES	38
VIII. FUENTES DE CONSULTA.....	39
IX. ANEXOS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del árbol de ramón en México (Pennington y Sarukhán, 2005).....	4
Figura 2. Hojas de <i>Brosimum alicastrum</i>	6
Figura 3. Flor de <i>Brosimum alicastrum</i>	7
Figura 4. Frutos y semillas de <i>Brosimum alicastrum</i>	8
Figura 5. Contenido de vitaminas de <i>Brosimum alicastrum</i> (Datos de Larqué Saavedra).....	9
Figura 6. Desnaturalización de la cadena de ADN.....	16
Figura 7. Alineamiento de los iniciadores.....	17
Figura 8. Polimerización.....	18
Figura 10. Colecta del material.....	23
Figura 9. Morfología de la hoja y tipo de crecimiento de las ramas de <i>Brosimum alicastrum</i>	24
Figura 11. Dendograma obtenido con UPGMA, basado en el análisis de los cinco iniciadores DAMD.....	35
Figura 12. Análisis de coordenadas principales.....	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para el análisis de la huella genética de <i>Brosimum alicastrum</i>	27
Cuadro 2. Colecta de muestras para el análisis de huella genética	29
Cuadro 3. Métodos utilizados para la extracción de ADN, concentración y pureza de <i>Brosimum alicastrum</i>	30
Cuadro 4. Muestras analizadas en el estudio de diversidad genética de <i>Brosimum alicastrum</i>	32
Cuadro 5. Iniciadores DAMD utilizado en el análisis de la diversidad de <i>Brosimum alicastrum</i>	33

RESUMEN

El ramón (*Brosimum alicastrum*), es uno de los árboles dominantes de las selvas de México y Centroamérica. Desde 1975, es considerado como una de las plantas tropicales subexplotadas con promisorio valor económico. Sin embargo, hasta el momento no se conoce ningún estudio relacionado con la variabilidad genética de esta especie, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar la diversidad genética de *Brosimum alicastrum* en la Península de Yucatán mediante marcadores moleculares. Se estandarizó un nuevo protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de hojas, obteniéndose valores de concentración promedio de 2381 ng μL^{-1} y pureza ($\text{DO}_{260/280}$) de 1.5. Se obtuvo la huella genética de *Brosimum alicastrum* con los marcadores moleculares DAMD. El análisis de coordenadas principales indica que esta especie se agrupa en dependencia de la zona geográfica y el tipo de crecimiento de las ramas. Estos resultados constituyen el primer trabajo de diversidad genética del *Brosimum alicastrum* en México.

Palabras Clave: *Brosimum alicastrum*, huella genética, diversidad genética, marcadores moleculares, DAMD.

ABSTRACT

Ramón (*Brosimum alicastrum*) one of the dominant trees of the forests of Mexico and Central America. Since 1975, it is regarded as one of the underexploited tropical plants with promising economic value. However, so far there are no reports related to the genetic variability of this species is known by or that the objective of this study was to analyze the genetic diversity of *Brosimum alicastrum*, in the Peninsula of Yucatan by molecular markers. A new protocol were for genomic DNA extraction from leaves became standard, obtaining values of average concentration of 2381 ng μL^{-1} and ($\text{DO}_{260/280}$) purity of 1.5. *Brosimum alicastrum* genetic fingerprint was obtained with molecular markers DAMD. Principal coordinates analysis indicates that this species is grouped depending on the geographical area and type of growth of its branches. These results constitute the first genetic diversity work in Mexico of the *Brosimum alicastrum*.

Key Words: *Brosimum alicastrum*, genetic finger printing, genetic diversity, molecular markers. DAMD.

I. INTRODUCCIÓN

La familia *Moraceae* tiene importancia económica, ya que incluye especies como *Broussonetia papyrifera*, utilizada para la elaboración de papel, *Castilla elástica* que produce caucho y *Artocarpus altilis* y *Ficus carica* que tienen un alto valor nutrimental (Carvajal, 2007). En México se encuentran once géneros de esta familia, que comprenden unas 43 especies (González-Castañeda e Ibarra-Manríquez, 2012), entre ellas podemos señalar a *Brosimum alicastrum* Swartz, un árbol perennifolio de hasta 40 m de altura, de copa densa y piramidal, y que es señalado como una especie dominante de las selvas mexicanas y de Centroamérica (Pennington y Sarukhan, 1998).

El *Brosimum alicastrum* Swartz, toma su nombre científico del griego *brosimos*, que significa comestible. En México y Guatemala se le conoce comúnmente como “Ramón”. Este nombre, que proviene del verbo ramonear, hace referencia a que el ganado vacuno y otros animales domésticos consumen sus semillas, plántulas y hojas (Meiners *et al.*, 2009). En 1975, la Academia de Ciencias de Estados Unidos incluyó al ramón en la lista de “plantas tropicales subexplotadas con promisorio valor económico”, pues a cada una de sus partes se le puede dar un uso práctico (National Academy of Sciences 1975).

En México, este árbol ha recibido diferentes nombres, hasta más de 50 diferentes, relacionados con la diversidad cultural de cada estado, por ejemplo: A-agl (Durango), Ash-Ahx o Yashalash (Chiapas), Gueltzé o Lan-fe-lá (Oaxaca), Juskapu o Moj-cuji (Veracruz), Oox (Yucatán y Q. Roo) (Pennington y Sarukhán, 2005; Ortíz, 2009).

Las poblaciones locales de ramón despliegan una notable variación en altura, diámetro del tronco, apariencia de la corteza, fecha de floración y tamaño de las semillas en dependencia de ubicación geográfica (Meiners *et al.*, 2009).

Los marcadores moleculares detectan variaciones a nivel del ADN y tienen ventajas tales como ser abundantes y universales, carecer de efectos pleiotrópicos y no están influidos por el ambiente, ni por el estado de desarrollo del organismo bajo estudio. Las propiedades mencionadas los hacen extremadamente útiles, comparados con cualquier otro tipo de marcadores (Cardone *et al.*, 2004). Dentro de estos métodos podemos encontrar los DAMD (directed amplification of minisatellite DNA) (Heath *et al.*, 1993) y los ISSR (inter-simple sequence repeats) (Prevost & Wilkinson, 1999).

La técnica DAMD utiliza los cebadores a partir de secuencias de núcleo minisatélites, los cuales son regiones de un genoma que contiene los sitios hipervariables (HVR) o número variable de repeticiones en tándem (VNTR). Estos motivos de secuencias se encuentran repetidos en tándem de 10-60 pb en el ADN genómico. Estas secuencias pueden ser eficientes como iniciadores de PCR para una amplia gama de organismos (Verma y Rana 2013; 2009; 2011).

Teniendo en cuenta todas estas diferencias morfo-fisiológicas y la falta de información científica sobre la diversidad genética del Ramón, es necesario revelar la diversidad que existe a nivel genotípico a fin de complementar la información existente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y Distribución

El árbol de ramón es originario de América Tropical (Tejada, 1980); se extiende por Centroamérica hasta Colombia, Perú y Venezuela abarcando también varias islas del Caribe como Trinidad y Tobago, Cuba y Jamaica. Es un árbol predominante en las selvas de México, se tiene rastro de él desde el sur de Tamaulipas hasta Quintana Roo y desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas (Larqués-Saavedra, 2013) (Figura 1).



Figura 1. Distribución del árbol de ramón en México (Pennington y Sarukhán, 2005)

2.2 Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rosales*

Familia: *Moraceae*

Género: *Brosimum*

Especie: *Brosimum alicastrum* Swartz

(Muñoz, 2011).

2.3 Descripción botánica

Es un árbol que alcanza alturas de hasta 45 m (Tejeda, 1980), con diámetros a la altura del pecho de hasta 1.5 m (Ortiz, 2009). La corteza externa es lisa, parda grisácea, presenta lenticelas; la interna de color crema amarillenta con abundante exudado lechoso, su grosor es de 7 a 8 mm (Ortiz, 2009).

Las hojas son alternas simples de color verde oscuro y brillante en el haz y verde grisáceas en el envés, ovado-lanceoladas a ovadas o elípticas (2-7.5 cm de ancho por 4-18 cm de longitud), ápice agudo o notablemente acuminado en las hojas jóvenes. Margen entero. (Figura 2) (Ortiz, 2009).



Figura 2. Hojas de Brosimum alicastrum.

Las flores son de color verde o amarillas con cabezuelas globulares de alrededor de 1 cm de diámetro; se ha reportado que posee flores unisexuales (Ortiz, 2009), pero estudios recientes (Huchin, 2013) han identificado la existencia de flores hermafroditas (Figura 3).



Figura 3. Flor de Brosimum alicastrum

El fruto es una drupa de 2 a 3 cm de diámetro con pericarpio carnoso cuyo color varía de verde a naranja de acuerdo con su grado de maduración de sabor y olor dulce, y contiene de 1 a 2 semillas por fruto (Berg, 1972). Las semillas son de forma semiesférica sus dimensiones son de 3-9 x 16-20 mm cubiertas por una testa papirácea color café claro; la semillas fresca contiene de 45% a 50% de humedad (Ortiz, 2009) (Figura 4).



Figura 4. Frutos y semillas de *Brosimum alicastrum*

2.4 Usos del ramón

El empleo que se da al ramón es variado, ya que se aprovechan casi todas las partes del árbol. Tiene usos artesanales, comestibles, de construcción, forrajeros, maderables, medicinales y recientemente industriales (Gillespie, 2004).

En Yucatán se emplean las hojas como forraje, ya que son un excelente alimento para el ganado principalmente en la época de sequía; y las semillas son usadas en menor proporción para producir harina comestible, la cual posee altos contenidos en triptófano (aminoácido esencial deficiente en dietas a base de maíz) (Ortiz, 2009). Es uno de los árboles tropicales del cual se puede utilizar todas sus partes y tiene un amplio potencial como alimento (frutos y semillas), forraje (hojas, frutos y semillas), medicina, productos maderables (Burgos, 1982), bebidas

ornamentales, como sombra (para cafetales y cacao), para reducir el impacto de vientos fuertes y para la conservación de suelo, etc. (CONABIO, 2009; Peters y Pardo-Tejeda, 1982; Pardo-Tejeda *et al.*, 1976).

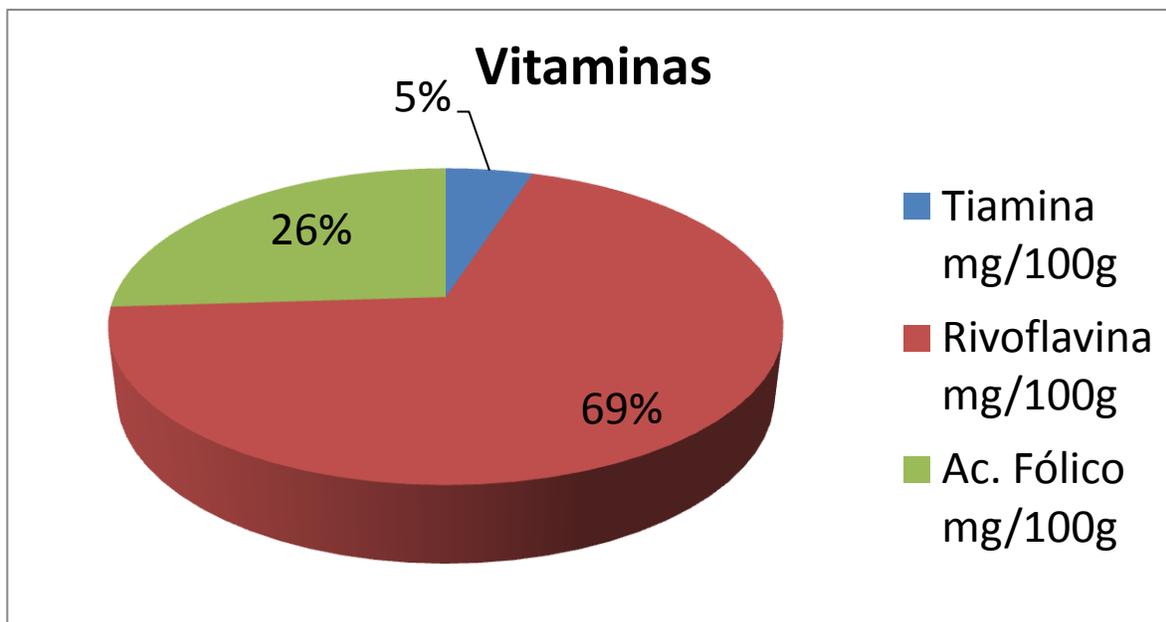


Figura 5. Contenido de vitaminas de *Brosimum alicastrum* (Datos de Larqué Saavedra).

Brosimum alicastrum llega a producir en una sola hectárea alrededor de 20 toneladas de semillas al año las cuales pueden ser una alternativa de alimentación reduciendo con ello el consumo de maíz (Larqué-Saavedra, 2013).

También tiene una relevante importancia ecológica ya que es un árbol con potencial para realizar reforestaciones en zonas degradadas, pues además de

favorecer la regeneración de otras especies, contribuye a la conservación del suelo, al control de la erosión y contrarresta el efecto de vientos fuertes (Berg, 1972).

Actualmente varias propiedades del árbol son estudiadas para brindarle mayores aplicaciones y dar un valor agregado a su cultivo (Jaimes, 2013).

2.5 Definición de Diversidad Genética

La diversidad genética es la base de la capacidad de los organismos para adaptarse a los cambios en su medio ambiente a través de la selección natural. La incapacidad de adaptarse a las condiciones cambiantes aumenta mucho el riesgo de extinción. La ordenación de la conservación genética orientada a salvar la diversidad genética adaptable debe basarse en el conocimiento de la base genética de adaptación (Larios, 2005).

La diversidad genética se podría definir como la cantidad de variabilidad genotípica en una población (Larios, 2005).

El término de diversidad genética se usa para abarcar la diversidad dentro de una especie, mientras que diversidad específica es la expresión para la diversidad entre las especies. La diversidad genética incluye la totalidad de la variabilidad heredable vegetal y animal de todo el mundo, ya sea con valor demostrado, de valor desconocido, o de organismos perjudiciales conocidos, como las plagas y enfermedades (Larios, 2005).

2.6 Marcadores Moleculares

2.6.1. Extracción de ADN

La obtención de los ácidos nucleicos constituye un factor crucial para el empleo de técnicas moleculares. A pesar de la gran variedad de métodos disponibles y aplicables para el aislamiento del ADN, existen ciertos principios básicos que todo método incluye (Tapia-Tussell *et al.*, 2009) y se especifican a continuación:

Lisis celular. Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así

como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN (Sambrook *et al.*, 1989).

Separación de proteínas y lípidos. En esta etapa se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos (Sambrook *et al.*, 1989). La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ADN. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico (Stulnig y Amberger, 1994).

Precipitación del ADN. Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el ADN. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Un paso de centrifugación permite que el ADN permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación.

Resuspensión del ADN. Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es resuspender el ADN para mantenerlo en solución. En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la resuspensión completa del ADN y evitar una hidrólisis ácida (Cornejo *et al.*, 2014). Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10 mM y EDTA a 0.1 M a un pH de 8.0 para almacenar el material (Cornejo *et al.*, 2014).

2.6.2. Cuantificación del ADN

La cuantificación de los ácidos nucleicos es un paso muy importante, ya que se necesita conocer la cantidad de ADN que se va a utilizar en las diferentes técnicas moleculares, para la detección de fitoplasmas (Linacero *et al.*, 2001).

Para cuantificar el ADN, la lectura debe hacerse a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, lo cual permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. La relación entre las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm ($DO_{260/280}$) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones puras del ADN tienen valores que van desde 1.8 a 2.0 (Valadez-Moctezuma y Günter Kahl, 2000).

2.6.3. Integridad del ADN

La integridad del ADN puede ser estimada mediante electroforesis en geles de calidad al 0.8% (p/v).

Sometidos a un campo eléctrico, la carga neta negativa del ADN y el ARN hará que éstos se muevan en dirección al ánodo. Si se fuerza a los ácidos nucleicos a moverse a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como la agarosa, la fricción hará que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud, mientras las de menor tamaño avanzan más en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño (Cornejo *et al.*, 2014).

2.6.4. Inhibidores de la PCR

Son contaminantes orgánicos e inorgánicos incluidos en la muestra de ADN, que interfieren atenuando o inhibiendo completamente la reacción de amplificación por PCR. Se ha reportado una amplia variedad y son particularmente abundantes en muestras complejas como fluidos de animales, alimentos, suelos orgánicos y muestras con altas concentraciones de bacterias (Watson y Blackwell, 2000).

Debido a que muchos de ellos exhiben una solubilidad similar al ADN, no son removidos eficientemente durante el proceso de extracción con cloroformo. Los inhibidores pueden actuar directamente inhibiendo la acción de la *Taq* polimerasa, o como en el caso de las proteínas y carbohidratos, pueden unirse a los iones de magnesio no dejándolos disponibles para la polimerasa (Kontanis y Reed, 2006).

2.6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN (Querci, 2007).

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación *in vivo* del ADN. Esta técnica consiste en ciclos repetitivos de: desnaturalización, alineamiento y extensión.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa consta de tres etapas que se repiten cíclicamente (25 a 40 ciclos):

- **Desnaturalización:** en ésta se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN objetivo. Se emplean temperaturas de 92-98°C durante 30 a 90 seg (Barrera Saldaña *et al.*, 1993, Valadez-Moctezuma y Günter Kahl, 2000; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004) (Figura 6).

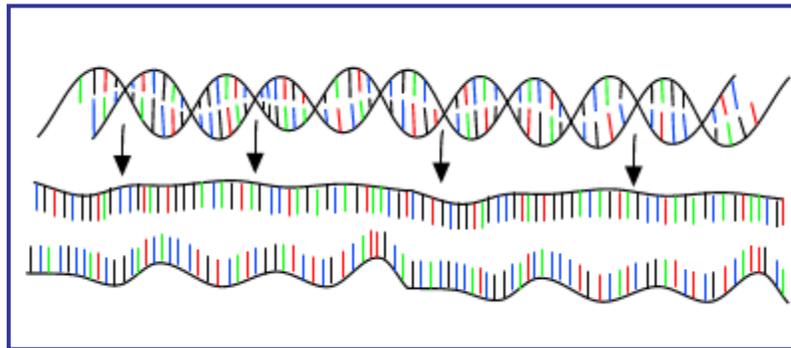


Figura 1. Desnaturalización de la cadena de ADN.

- **Alineamiento:** Se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN objetivo desnaturalizado (Barrera-Saldaña *et al.*, 1993) (Figura 7). La temperatura de alineamiento depende de la temperatura de fusión (T_m) de los iniciadores, la cual puede calcularse mediante la fórmula: $[(2 \times (A+T)) + (4 \times (G + C))]-5$ (2°C por cada A y T, 4°C por cada G y C, restándole 5°C al resultado total). Generalmente oscila entre

50 y 60°C y la duración de esta etapa es de 30-60 seg (Barrera-Saldaña *et al.*, 1993; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

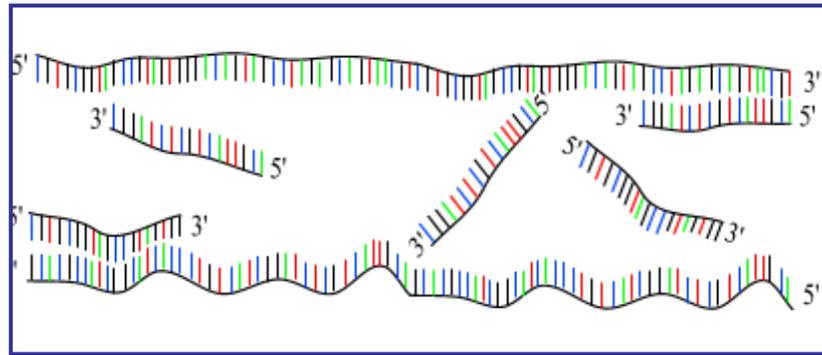


Figura 2. Alineamiento de los iniciadores.

- **Extensión:** En esta etapa la enzima ADN polimerasa “extiende” la longitud de los iniciadores apareados al ADN objetivo, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción. Se efectúa a 70-74°C de 30 a 90 seg. (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004) (Figura 8).

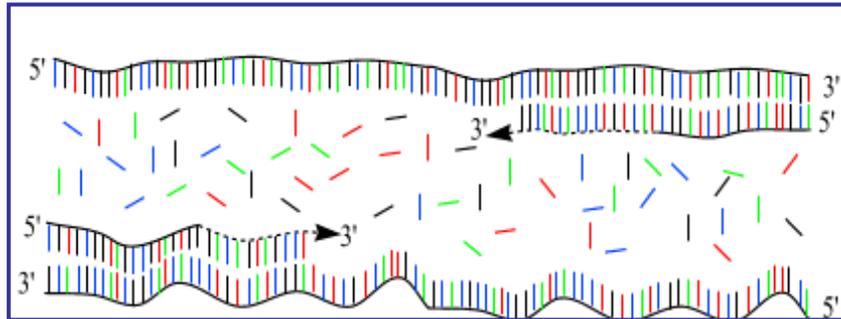


Figura 3. Polimerización

2.6.6. Huella genética

La huella genética fue descrita por primera vez en 1985 por Alec Jeffreys, que la describió como un patrón característico y específico de cada individuo debido al polimorfismo en el tamaño de zonas no codificantes del ADN. La huella genética de un individuo de una especie dada, puede obtenerse de acuerdo a diferentes técnicas moleculares como: RFLPs (Restriction Fragment Site Polymorphism) micro/minisatélites, AP-PCR (arbitrary primers), AFLPs (Amplified fragment length polymorphism), entre otras (Applied Molecular Genetics Laboratory, 1996; Van der Vossen *et al.*, 2003; Libkind, 2007).

2.6.6.1. DAMD (Directed Amplification of Minisatellites DNA)

DAMD es un método de obtención de huella genética de ADN basado en la amplificación de las regiones ricas en minisatélites con un relativo alto grado de astringencias utilizando secuencia de núcleo VNTR como cebadores previamente localizadas (Heat *et al.*, 1993.)

Los minisatélites también conocidos como número variable de repeticiones en tándem (VNTR) o repeticiones hipervariables (HVR). Son similares a los microsatélites (SSR), excepto que las secuencias de ADN de repetición en tándem (VNTR) son más largas y generalmente consisten de 10-60 pb. Las variaciones extremas en el número de repetición en tándem encontradas en los minisatélites son responsables del polimorfismo observado. Mediante el uso de la de las secuencias centrales VNTR como cebador en la amplificación dirigida de minisatélite-región de ADN (DAMD) con PCR es capaz de producir resultados-RAPD para la identificación de especies (Silva *et al.*, 2001). También se utilizan para generar sondas altamente variables para la obtención de la huella dactilar de ADN.

Recientemente, DAMD se ha aplicado con éxito para obtener el genotipo de especies cultivables como arroz y trigo (Zhou *et al.*, 1997). El método ha sido

utilizado para la autenticación de *Capsicum*, (Ince *et al.*, 2009), *Salvia*, (Karaca *et al.*, 2008) y *Morus* (Bhattachyara *et al.*, 2005).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Analizar la diversidad genética de *Brosimum alicastrum* en Yucatán y Campeche, mediante marcadores moleculares tipo DAMD.

3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de hojas de Ramón.
- Obtener la huella genética de *Brosimum alicastrum* mediante marcadores moleculares DAMD.
- Realizar el análisis de la diversidad genética de *Brosimum alicastrum*.

IV. HIPÓTESIS

El uso de los marcadores moleculares DAMD, permitirá establecer la variabilidad genética de *Brosimum alicastrum*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de material vegetal

Se colectaron hojas de *Brosimum alicastrum* en localidades de Yucatán y Campeche (Figura 9), tomando en cuenta sus características morfológicas (forma y tamaño de la hoja y el tipo de crecimiento de las ramas del árbol, Figura 10). Las muestras, fueron llevadas al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y procesadas en el laboratorio GeMBio.



Figura 4. Colecta del material

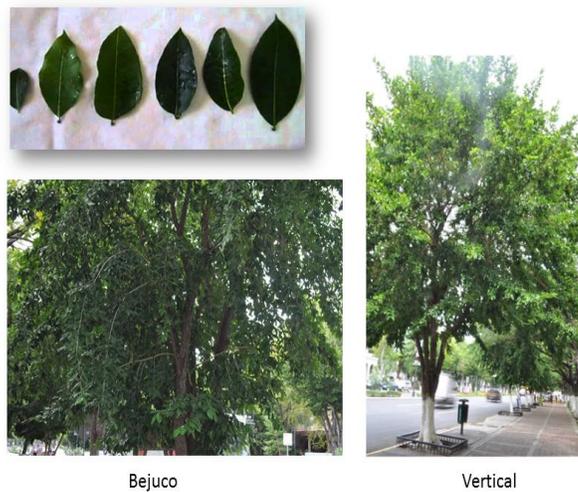


Figura 5. Morfología de la hoja y tipo de crecimiento de las ramas de *Brosimum alicastrum*

5.2 Estandarización de un protocolo de extracción de ADN de hoja de ramón

Para la estandarización del protocolo de extracción, se tomó como base el protocolo descrito por Tapia Tussell *et al.*, (2005)

Protocolo modificado

- Congelar las muestras a -80°C . Macerar de 30 a 40 mg de muestra en morteros previamente congelados a la misma temperatura. Transferir el macerado a micro tubos de 2 mL estériles.

- Agregar 800 μ L de amortiguador CTAB, previamente calentado a 65°C, 15 μ L de ARNasa y agitar en vórtex 30 seg.
- Incubar las muestras a 65°C durante 30 min con homogenización a intervalos de 10 min.
- Añadir 800 μ L de fenol saturado a la muestra y agitar nuevamente en vórtex.
- Centrifugar las muestras a 15,682 xg durante 10 min. Transferir la fase acuosa (sobrenadante) a un microtubo nuevo y estéril de 1.7 mL.
- Agregar 1 V de cloroformo-isoamilico (24:1) y homogenizar por inversión durante 10 min.
- Centrifugar las muestras a 15,682 xg durante 10 min. Transferir la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo nuevo y estéril de 1.7 mL.
- Agregar 0.1 V de acetato de sodio 3 M pH 8, 2.5 V de etanol absoluto a -20°C.
- Mezclar suavemente mediante inversión e incubar a -20°C por 15 min para precipitar el ADN (la incubación es sólo si la hebra de ADN no es visible al momento de la inversión, debido a que podría favorecer a la precipitación de otros compuestos que contaminarían la muestra).
- Centrifugar las muestras a 15,682 xg durante 5 min y decantar el sobrenadante y lavar el precipitado con 500 μ L de etanol al 70% (v/v).
- Dejar secar a temperatura ambiente y luego disolver el precipitado en 50 μ L de agua libre de endonucleasas.

5.3 Calidad e Integridad del ADN

La determinación de la calidad e integridad del ADN, se realizó a través de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (p/v), teñidos con bromuro de etidio, en amortiguador TBE 1X a 90 volt durante 30 min.

Los geles se visualizaron en un transiluminador UVP, las imágenes fueron digitalizadas y procesadas con el programa LabWorks 4.0.

5.4 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer), según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989). Este método se basa en la lectura que se obtiene a una longitud de onda de 260 nm, la cual permite el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos. Una densidad óptica (DO)=1 corresponde aproximadamente $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ADN de doble cadena.

La relación entre las lecturas de absorción a 260 y 280 nm ($\text{DO}_{260/280}$) aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos.

5.5 Huella genética (DAMD)

Para la obtención de la huella genética de las muestras en estudio, se utilizaron cinco marcadores moleculares DAMD, los cuales aparecen detallados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para el análisis de la huella genética de *Brosimum alicastrum*.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'
HBV	GGTGTAGAGAGGGGT
HVA	AGGATGGAAAGGAGGC
33.6	AGGGCTGGAGG
HVR	CCTCCTCCCTCCT
M13	GAGGGTGGCGGTTCT

Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo a Sushma Verma/ (2012), las cuales se describen a continuación:

El volumen final de cada reacción fue de 25 μ L conteniendo 60 ng de ADN genómico, amortiguador de PCR 1X (Invitrogen), 2 mM de $MgCl_2$, 0.25 mM de dNTPs, 0.2 μ M de iniciador y 1U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un termociclador Applied Biosystem

Modelo GeneAmp 9700 utilizando un programa de reacción. El programa que se utilizó para la amplificación del ADN consistió de 40 ciclos (desnaturalización a 92°C durante 1 min, alineamiento a 55°C durante 2 min. y extensión a 72°C durante 2 min). Los productos de PCR obtenidos fueron observados en gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con bromuro de etidio usando amortiguador TBE 1X. Los resultados fueron observados en el fotodocumentador y digitalizados con el programa LabWorks 4.0.

5.6 Análisis de la diversidad genética

Para cada individuo se registraron las bandas obtenidas y se clasificaron en base a los tamaños de los fragmentos observados. Las bandas obtenidas por la técnica DAMD fueron registradas como presencia (1) o ausencia (0)

Los datos de las matrices de cada iniciador se combinaron y fueron procesados usando el método UPGMA para generar un dendrograma basado en Coeficiente de similitud de Jaccard (Jaccard, 1908) en la aglomeración secuencial (SAHN) módulo de agrupación jerárquica y anidada del software PC NTSYS. El análisis principal de coordenadas PCoA (por sus siglas en inglés: Principal Coordinate Analysis), fue utilizada para probar la correlación de los datos obtenidos de los marcadores moleculares usados en la presente estudio utilizando la versión de software NTSYS-pc 2.02e (Rohlf, 2009).

VI. RESULTADOS Y RECOMENDACIONES

6.1 Colecta del material vegetal

Se colectaron un total de 66 muestras de hojas de *Brosimum alicastrum* de cuatro localidades diferentes (Mérida, Sacalum, Izamal, Hopelchén) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Colecta de muestras para el análisis de huella genética

Clave	Localidad / Estado
R1-10	Mérida/ Yucatán
R11-25	Mérida/ Yucatán
R26-37	Mérida/ Yucatán
R38-47	Izamal /Yucatán
R48-60	Hopelchén/ Campeche
R61-64	Sacalum /Yucatán

6.2 Estandarización de un protocolo de extracción de ADN para *Brosimum*

alicastrum

En el Cuadro 3 se pueden apreciar los resultados obtenidos en las extracciones de ADN utilizando los protocolos 1 (Tapia-Tussell *et al.*, 2005) y 2 (Tapia-Tussell *et al.*, modificado)

Cuadro 3. Métodos utilizados para la extracción de ADN, concentración y pureza de *Brosimum alicastrum*.

Cuantificación de ADN				
Muestras	Protocolo 1 (Tapia-Tussell <i>et al.</i> , 2005)		Protocolo 2 (Tapia-Tussell <i>et al.</i> , 2005 modificado)	
	Concentración (ng μL^{-1})	Pureza ($A_{260/280}$)	Concentración (ng μL^{-1})	Pureza ($A_{260/280}$)
R2	556.6	1.26	4033.9	1.34
R3	511.6	1.30	2704.3	1.41
R6	402.3	1.16	2604.0	1.34
R9	245.2	1.27	2232.2	1.37
R12	195.4	1.15	3524.0	1.35
R15	137.6	0.96	1332.0	1.51
R16	210.1	1.19	1879.9	1.55
R18	159.9	1.11	743.9	1.70

Los resultados obtenidos en las concentraciones reflejan que la media de la concentración de ADN alcanzada para el protocolo 2 fue de 2381 ng μL^{-1} , lo cual representa 7.8 veces más que la media de la concentración obtenida por el protocolo 1 (302 ng μL^{-1}). De igual forma la pureza obtenida con el protocolo 2 fue superior a la del protocolo 1. Este aumento en la concentración y pureza del ADN obtenido está asociado a la adición de un paso más de extracción con fenol en el proceso y a la precipitación con acetato de sodio/etanol absoluto.

Considerando que las hojas del ramón presentan un alto contenido de carbohidratos (37.9%), fibra cruda (20%) y proteínas (14.4%) (Información personal Larqué-Saavedra) y que estos compuestos son considerados entre los inhibidores de PCR, las modificaciones realizadas al protocolo de extracción permiten la obtención de ADN genómico libre de estos compuestos (Kontanis y Reed, 2006).

6.3 Huella genética de *Brosimum alicastrum* mediante marcadores moleculares DAMD

Con el objetivo de realizar la caracterización molecular de *Brosimum alicastrum* se realizó un muestreo en localidades de Yucatán (Mérida, Sacalum) y Campeche (Hopelchén) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Muestras analizadas en el estudio de diversidad genética de *Brosimum alicastrum*.

Muestra	Localidad	Crecimiento	Muestra	Localidad	Crecimiento
R2	Mérida	Vertical	R32	Mérida	Bejuco
R3	Mérida	Bejuco	R33	Mérida	Vertical
R6	Mérida	Vertical	R48	Campeche	Bejuco
R9	Mérida	Vertical	R51	Campeche	Bejuco
R12	Mérida	Bejuco	R54	Campeche	Bejuco
R15	Mérida	Vertical	R59	Campeche	Bejuco
R16	Mérida	Vertical	R60	Campeche	Bejuco
R18	Mérida	Vertical	R62	Sacalum	Bejuco
R29	Mérida	Bejuco	R64	Sacalum	Vertical

Para continuar con el estudio de la huella genética del ramón, se utilizaron cinco iniciadores DAMD (Directed Amplification of Minisatellite DNA). A diferencia de los marcadores ISSR (pruebas preliminares), todos los marcadores DAMD mostraron alto grado de polimorfismo en las muestras analizadas, siendo éstos más efectivos en los estudios de la diversidad genética de ramón. Estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores en estudios de diversidad genética a nivel de especie, e incluso entre individuos silvestres y cultivados. (Verma y Rana 2013; Kumar *et al.*, 2013; 2011)

Como se puede apreciar en el Cuadro 5, todos los iniciadores DAMD mostraron un alto grado de polimorfismo, con un rango de bandas entre 330 a 4000 pb, con un total de 109 bandas polimórficas y un contenido de información polimórfica (PIC) promedio de 0.721. Siendo el iniciador HVR el de mayor PIC (0.829) y con un 100% de loci polimórficos, lo cual le confiere un buen soporte para el estudio de la diversidad genética del ramón. Esto coincide con lo reportado por Kumar *et al.*, (2011) en el estudio de la diversidad genética de *Jatropha curcas* L. en la India.

Cuadro 5. Iniciadores DAMD utilizado en el análisis de la diversidad de *Brosimum alicastrum*.

Iniciador	Rango de tamaño de banda (bp)	Loci de Amplificados	Loci Monomórficos	Loci Polimórficos	PIC*
33.6	500 – 2100	17	1	15	0.560
HBV	330 - 2000	22	0	22	0.723
HVA	550 - 2500	25	1	23	0.691
HVR	470 - 3000	22	0	22	0.829
M13	540 - 4000	28	1	27	0.768
Total	330 - 4000	114	3	109	0.721

*Índice de Contenido Polimórfico

Los datos de distancia genética fueron utilizados para la construcción del dendograma UPGMA (Figura 11), donde se pueden apreciar dos clados bien

definidos, las muestras de Yucatán (*I*) y las de Campeche (*II*) con un coeficiente de distancia genética de 0.6 entre ellos. Este parámetro indica que existe una marcada diversidad genética de acuerdo a la zona geográfica de crecimiento de los árboles. Este tipo de agrupamiento obtenido con los marcadores DAMD en base a la localidad coincide con resultados reportados por Kumar *et al.* (2011), en el estudio de la diversidad genética de *Jatropha curcas* en la India.

Las muestras de Yucatán se subdividen en dos grupos de acuerdo a la morfología del crecimiento de las ramas (vertical y bejuco) (Figura 11). En el grupo de crecimiento vertical se encuentran los coeficientes de similitud más altos (0.79 y 0.83) lo cual indica una estrecha relación genética entre ellas. A diferencia de los árboles con morfología de crecimiento de ramas en forma de bejuco, donde los valores de similitud van de 0.63 a 0.75 indicando una mayor diversidad genética entre estas accesiones.

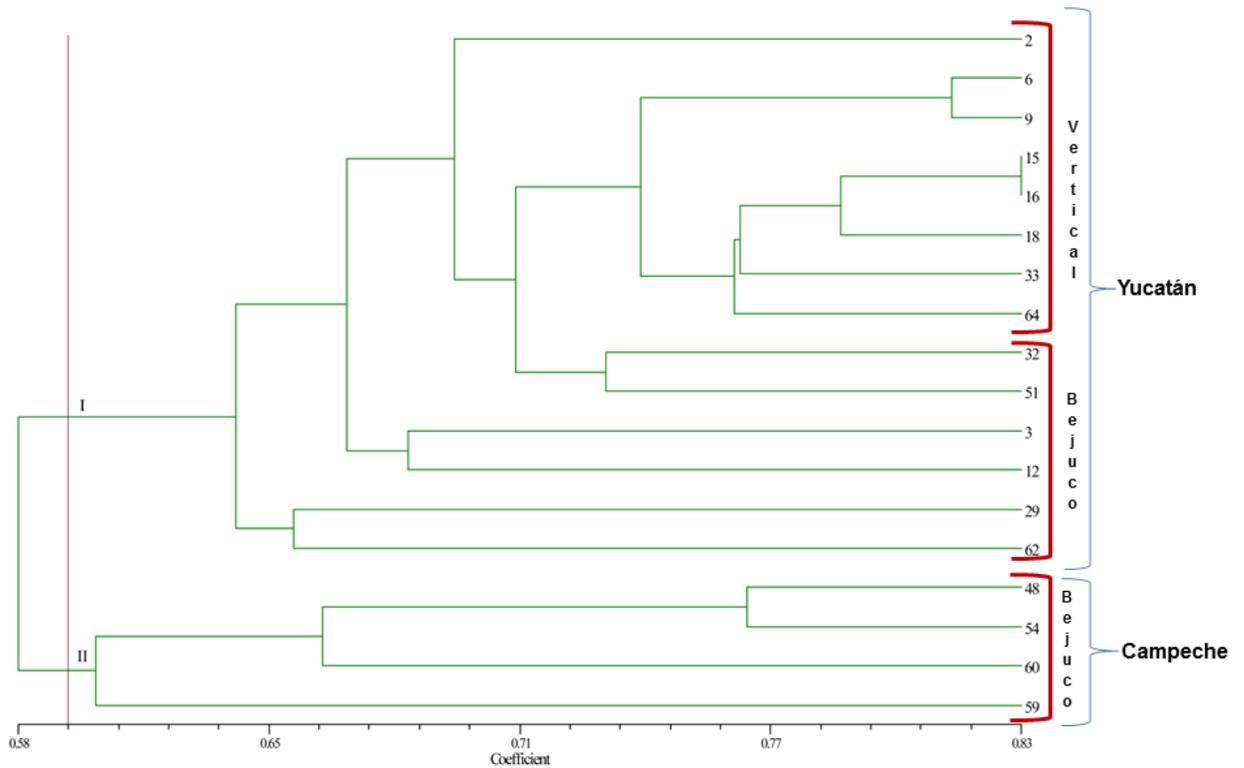


Figura 6. Dendrograma obtenido con UPGMA, basado en el análisis de los cinco iniciadores DAMD.

En el análisis de coordenadas principales (Figura 12), se forman tres grupos que están separados en dependencia de la zona geográfica y el tipo de crecimiento de las ramas. En el grupo I se encuentran las muestras de Yucatán con crecimiento vertical, en el grupo II las muestras de Yucatán con crecimiento tipo bejuco y en el grupo III todas las muestras de Campeche.

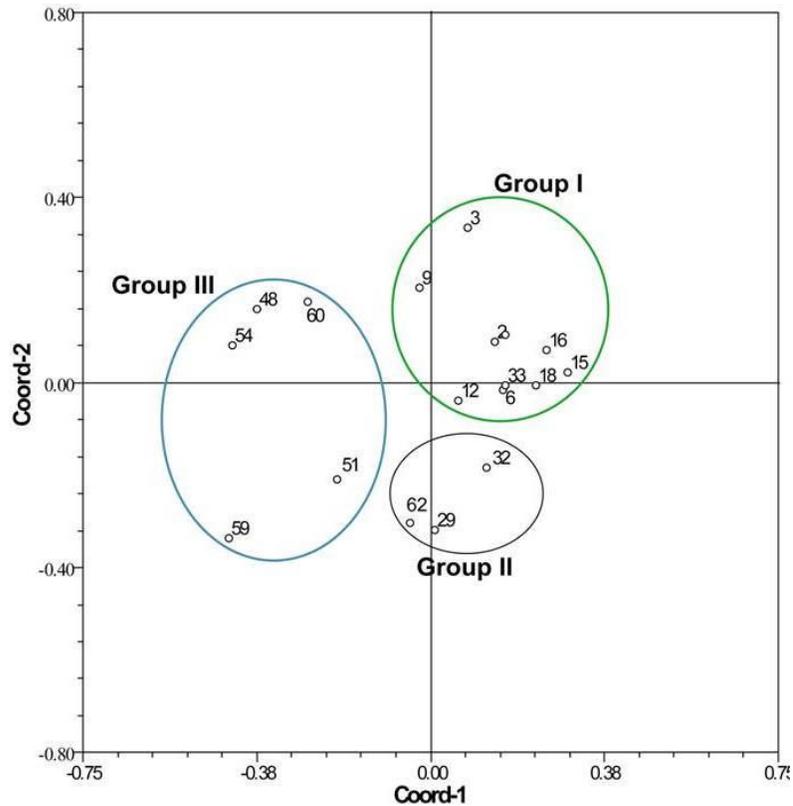


Figura 7. Análisis de coordenadas principales.

La diversidad genética encontrada entre las accesiones de *Brosimum alicastrum* obtenida en este estudio mediante los marcadores moleculares DAMD coincide con lo reportado para especies de *Ficus*, que también pertenecen a la familia *Moraceae* (Ciarmiello *et al.*, 2015).

Este trabajo constituye el primer estudio de la diversidad genética de *Brosimum alicastrum* en la Península de Yucatán, por lo que es importante realizar

un muestreo más amplio abarcando las principales áreas de establecimiento de este árbol y a la vez utilizar otros marcadores moleculares del grupo de los SCAR (Sequence Characterised Amplified Regions) para complementar dicho estudio.

VII. CONCLUSIONES

Se estandarizó un nuevo protocolo para la extracción de ADN genómico a partir de hoja de *Brosimum alicastrum*, obteniéndose valores de concentración promedio de 2381 ng μL^{-1} y pureza de 1.5.

Se obtuvo la huella genética de *Brosimum alicastrum* con los marcadores moleculares DAMD, siendo éste el primer trabajo de diversidad genética del ramón en México.

El análisis de coordenadas principales indica que el *Brosimum alicastrum* se agrupa en dependencia de la zona geográfica y el tipo de crecimiento de las ramas.

VIII. FUENTES DE CONSULTA

Applied Molecular Genetics Laboratory, CIMMYT, int. 1996. Molecular marker applications to plant breeding. Workshop, 14 October-1 November, 1996. CIMMYT Headquarters, El Batán, México, pp. 6-7.

Berg, C. C. G. 1972. *Brosimum alicastrum* Sw. CONABIO, 1972, consultado el: 7 de octubre de 2014 del sitio web www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/47-morac1m.pdf.

Barrera Saldaña H.A.R. Ortiz López, A. Rojas Martínez y D. Resendez Pérez. 1993., Reacción en cadena de la polimerasa. Una época dorada para la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*. XVIII (108).

Bhattacharya D. Rajinder G. 2005. Nanotechnology and potential of microorganisms.

Crit Rev Biotechnol.

Burgos Cruz G.A., 1982. *Brosimum alicastrum* Swartz posibilidades de utilización en alimentación. Tesis de Licenciatura. Escuela de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yuc.

Cardone S., Olmos S. Echenique V. 2004. Variación somaclonal. In: Echenique V, Rubinstein C., y Mroginski L. (eds.). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA. III (1):83-96.

Carvajal S. 2007. *Moraceae*. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, Universidad de Guadalajara Instituto de Botánica, Zapopan Jalisco ,1-57 pp.

Ciarmiello L.F., Piccirillo P., Carillo P., De Luca A., Woodrow P. 2005. Determination of the genetic relatedness of fig (*Ficus carica* L.) accessions using RAPD fingerprint and their agro-morphological characterization. *South African Journal of Botany* Volume 97, March 2015, Pages 40–47.

CONABIO, 2009, Paquetes Tecnológicos., *Brosimum alicastrum* Swartz.

Cornejo A. Serrato A. Rendon B. Rocha M.G. 2014. Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa pag. 10-11.

González-Castañeda N., Ibarra-Manríquez G.,2012, Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Morelia, Michoacán. México.

Gillespie A.R.; Bocanegra-Ferguson D.M.; Jiménez-Osornio J.J., 2004., The propagation of Ramon (*Brosimum alicastrum* Sw.; Moraceae) in Mayan homegardens of the Yucatan peninsula of Mexico, *New Forests*. pag. 24-38.

Heat D.D., Iwama G.K. and Devlin R.H., 1993, PCR primed with VNTR core sequence yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acid Res.*

Huchin Poot R.I. 2013. Estudio preliminar de la floración, la formación del fruto y la germinación de *Brosimum alicastrum*, Tesis profesional que como requisito parcial para obtener el título de Licenciado en Biología., Instituto Tecnológico de Conkal., Yucatán México.

Ince A.G. Karaca M. Onus A.N. 2009. Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genet Resour Crop Evol.*

Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.*, 44: 223-270.

Jaimes E.R., El árbol de ramón una alternativa alimentaria. *El Economista* 23 de octubre del 2013, Consultado el 7 de octubre de 2014 del sitio web <http://eleconomista.com.mx/entretenimiento/2013/10/23/arbol-ramon-alternativa-alimentaria>.

Karaca M. Ince A.G. A. y S.T. Turgut K., Onus A.N. 2008. PCR-RFLP and DAMD-PCR genotyping for *Salvia* species. *J. Sci. Food Agric.*

Kontanis E.J. Reed F.A. 2006. Evaluation of Real-Time PCR Amplification Efficiencies to Detect PCR Inhibitors., American Academy of Forensic Sciences, Vol. 51, No. 4.

Kumar S. Kumaria S. Sharma S.K. Rao S.R. Tandon P. 2011. Genetic diversity assessment of *Jatropha curcas* L. germplasm from Northeast India. Biomassa and Bioenergy. 35: 3063-3070.

Kumar S. Kumaria S. Tandon P. 2013. SPAR methods coupled with seed-oil content revealed intra-specific natural variation in *Jatropha curcas* L. from Northeast India. Biomassa and Bioenergy. 54: 100-1006.

Larios Sarabia J. 2005. Comparación de técnicas de extracción de ADN en *Pinus teocote* Schiede ex Schlechtendal, Tesis profesional que como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero Forestal, Universidad Autónoma de Chapingo Comisión de Ciencias Forestales, Texcoco, México, pp 15-20.

Larqué-Saavedra F.A. 2013. El árbol de Ramón, opción viable de alimentación; complementa al maíz. La jornada México. D.F.

Larqué-Saavedra F.A. 2013. El árbol de Ramón, una alternativa alimentaria. El Economista México. D.F.

Libkind, D. 2007. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. Revista Argentina de Microbiología. 39: 133-137.

Linacero, R., Lopez-Bilbao, M. G., & Vazquez, A. M. (2001). Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). Protoplasma, 217(4), 199-204.

Meiners M. C. Sánchez Garduño y S. De Blois. 2009. El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. CONABIO. Biodiversitas. 87:7-10.

Muñoz H.J. Sáenz J.T. Rueda A., 2011. Especies promisorias de clima tropical para plantaciones forestales comerciales en Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Uruapan. Michoacán.

National Academy of Sciences. 1975. Under-exploited tropical plants with promising economical value. Washington D.C. pp. 114-118.

Ortiz E.R.M. Herrera L.G. 2009. Ramón (*Brosimum alicastrum*) Protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje, CONAFOR: México.

Pardo-Tejeda E. Gómez-Pompa A. y Sosa Ortega V. 1976. El Ramón. INIREB Informa: Comunicado No. 3 sobre recursos bióticos potenciales del País. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa, México.

Pennington T. D. & J. Sarukhán. 1998. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. 2a ed. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica. México D.F. Mexico. 521 pp.

Pennington T.D. y Sarukhán, J. 2005. Árboles tropicales de México. Fondo de Cultura económica, México, p. 138.

Peters C.M. and Pardo-Tejeda E. 1982. *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico., *Economic Botany.*, 36(2):166-175.

Prevost, A., & Wilkinson, M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.*98., 107-112.

Querci M. Jermini M. den Eede G.V. 2007. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos, Comunidades Europeas, Luxemburgo Sesión 4 y 6.

Rodriguez Sanchez I.P. Barrera Saldaña H.A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México vol. VII, número 003 pp. 323-335.

Rohlf, F. J. 2009. *NTSYSpc: numerical taxonomy system.* ver. 2.21c. Exeter Software: Setauket: New York.

Sambrook D.J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Silva L.M., Montes de Oca H., Diniz C.R. and Fortes-Dia C.L., 2001, Fingerprinting of cell lines by directed amplification of minisatellite-region DNA (DAMD), Brazilian Journal of Medical and Biological Research.

Stulnig T. M. y A. Amberger. 1994. Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. BioTechniques 16: 402-404.

Tapia R., Magaña J.A., Cortez Velázquez, Higuera I., Pérez D., 2009, Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Mérida Yucatán, Pág. 53-55.

Tejeda E.P. Muñoz C.S. 1980. *Brosimum alicastrum* (Ramón, Copomo, Ojite, Ojoche) Instituto nacional de Investigación de Recursos Bióticos, México , 1-31.

Valadez E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Van der Vossen, JMBM., Rahaoui, H., de Nijs, MWCV. y Hartog, B. J. 2003. PCR methods for tracing and detection of yeast in the food Chain. In: Yeast in Food. (Boekhout, T. and Robert, V. ed.) CRC Press LLC, Boca Ratón, FL, USA, pp 123-138.

Verma S. Rana T. S. & Ranade S. A. 2009. Genetic variation and clustering in *Murraya paniculata* complex as revealed by single primer amplification reaction methods. *Current Science*, 96, 1210–1216.

Verma S. & Rana T. S. 2011. Genetic diversity within and among the wild populations of *Murraya koenigii* L. Spreng., as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39, 139–144.

Verma S. & Rana, T. S. 2013. Genetic Relationships Among Wild and Cultivated Accessions of Curry Leaf Plant (*Murraya koenigii* (L.) Spreng.), as Revealed by DNA Fingerprinting Methods. *Mol Biotechnol*, 53:139–149.

Verma S. & Rana T. S., 2012. Genetic Relationships Among Wild and Cultivated Accessions of Curry Leaf Plant (*Murraya koenigii* (L.) Spreng.), as Revealed by DNA Fingerprinting Methods, Conservation Biology and Molecular Taxonomy Laborator, Springer Science+Business Media, India 1-2 pp.

Watson R.J. Blackwell B. 2000. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 46.

Zhou X.J. Nguyen T. Kimbrell D.A. 1997. Identification and characterization of the Cecropin antibacterial protein gene locus in *Drosophila virilis*. *J. Mol. Evol.* 44(3).

IX. ANEXOS.

Anexo 1. Colecta de hojas de *Brosimum alicastrum*.



Anexo 2. Tipos de hojas y flores de *Brosimum alicastrum*.



Anexo 3. Preparación de la muestra de *Brosimum alicastrum* para la amplificación de las regiones del ADN ricas en minisatélites.



Anexo 4. Reactivos para la preparación de una PCR.

Reactivos	Final	Cantidades por muestra (μL)
H ₂ O	-----	-----
Amortiguador PCR (10x)	1.00	2.5
MgCl ₂ (50mM)	2.00	1
dNTPmix (10mM)	0.25	0.63
Taq polimerasa 5 U/ μ	1.00	0.2
Primer 10 μM	0.20	0.5
ADN genómico 20 ng μL^{-1}	60ng	3

Anexo 5. Soluciones.

Bromuro de etidio (EtBr) 10

Disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 mL de H₂O dd. Envolver el recipiente con papel aluminio para evitar su exposición directa a la luz y almacenar a 4°C. Extremar precauciones al preparar esta solución ya que el EtBr es mutagénico. Para evitar pasos de manipulación de este compuesto, puede adquirirse el EtBr que viene en presentación de lentejuelas de 10 mg cada una.

RNAsa a 10 mg mL⁻¹

Disolver 100 mg de RNasa en 10 mL de Tris 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM. Calentar en agua a punto de ebullición durante 15 min y permitir que se enfríe a temperatura ambiente. Dispensar en alícuotas de 1 mL y almacenar a -20°C. La alícuota de trabajo puede ser mantenida a 4°C para evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

TBE 10X

Disolver 108 de Tris base y 55 g de ácido bórico en 900 mL de H₂O dd. Agregar 40 mL de EDTA 0.5 M, pH8 y ajustar la solución a un volumen final de 1000

mL. Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente. Soluciones viejas de TBE pueden formar un precipitado; en tal caso deben ser desechadas.

Buffer de extracción CTAB (200mL)

Disolver Tris-Cl 1 M, pH 7.5, 28 ml de NaCl 5 M y EDTA .5 M en 130 mL de H₂O dd. Incubar a 65°C durante 15 min, agregar 2 g de CTAB y disolver completamente. Agregar 2 mL de β-mercaptoetanol 14 M y ajustar la solución a un volumen final de 200 mL.