

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y
MORFOLÓGICA DE TOMATE DE CÁSCARA**
(*Physalis ixocarpa*, Brot.)



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

P R E S E N T A

LOURDES MONTALVO HERNÁNDEZ



CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO

SEPTIEMBRE 1998

871701

C.1

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE TOMATE DE
CÁSCARA (*Physalis ixocarpa*, Brot.)**

Tesis realizada por **Lourdes Montalvo Hernández** bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Aureliano Peña Lomelí

ASESOR:



Dra. H. Susana Azpíroz Rivero

ASESOR:



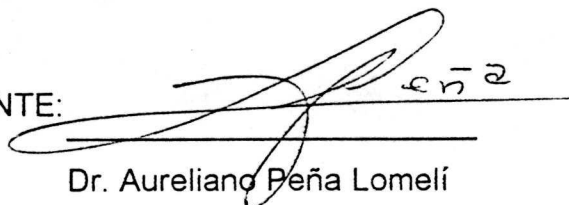
M.C. Alejandro Manzo González

33050

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE TOMATE DE
CÁSCARA (*Physalis ixocarpa*, Brot.)**

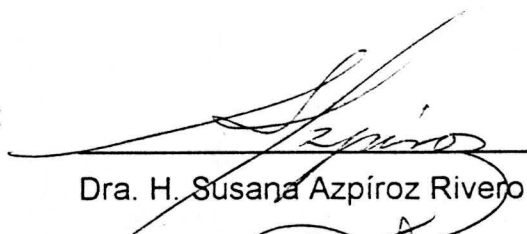
El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de **Lourdes Montalvo Hernández** autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura estuvo constituido por:

PRESIDENTE:



Dr. Aureliano Peña Lomelí

ASESOR:



Dra. H. Susana Azpíroz Rivero

ASESOR:



M.C. Alejandro Manzo González

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Camerina Hernández Villa

y

Eduardo Montalvo Martínez

Por su amor inmenso e incondicional apoyo

A MIS HERMANOS:

Domingo

Oscar

Raúl

Jesús

Eduardo

Oralia

Como un pequeño reconocimiento al cariño y respecto que siempre nos ha unido

A MIS CUÑADAS:

Cecilia

Rosalba

Eudelia

Renata

A MIS SOBRINOS:

Irais Xareni

Eduardo Luis

Isis

Jordy Raúl

Bianca

Y A TI JUAN. GRACIAS POR TODO.

AGRADECIMIENTOS

- Al CONACYT por haberme brindado el apoyo económico necesario para realizar mis estudios de Maestría
- A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme dado la oportunidad de realizar mi formación profesional
- A los integrantes del Comité Asesor:

Dr. Aureliano Peña Lomelí

Dra. H. Susana Azpíroz Rivero

M.C. Alejandro Manzo González

Por todas las sugerencias y apoyo proporcionado en la realización del presente trabajo de tesis

- Al Dr. Agustín López Herrera por su apoyo y preocuparse que todo marche de la mejor manera en la Maestría en Horticultura
- Al Biólogo Victor Montero Tavera y M.C. Onécimo Grimaldo Juárez por las sugerencias y apoyo en el análisis estadístico del presente trabajo
- Al M.C. Domingo Montalvo Hernández por los consejos y apoyo económico recibido en la presentación del trabajo de tesis
- Al Ing. Juan Medina Cristales, por el apoyo económico proporcionado
- A compañeros y amigos: Victor, Carmen, Martín, Gerardo. Y los que apoyaron de alguna forma la realización del trabajo de tesis y por espacio no son citados.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora es originaria del estado de Veracruz; ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en el año de 1988 y concluyó la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia en 1995, con promedio general de 9.0. El trabajo de tesis de licenciatura fue realizado en aspectos de manejo agronómico en tomate de cáscara, por lo cual fue otorgada mención honorífica en el examen de grado. Obtuvo varios reconocimientos por la destacada labor académica como estudiante: cinco cuadros de honor, tres estímulos económicos y diplomas. En 6o año fue elegida para asistir a un Programa de Intercambio Académico con España, a la Universidad Politécnica de Madrid particularmente en el Departamento de Fitotecnia, en el área de Cultivos herbáceos.

En Enero de 1996 ingresó a la Maestría en Ciencias en Horticultura del Departamento de Fitotecnia en la UACH, concluyendo en Diciembre de 1997 con la realización del trabajo de tesis en aspectos Biotecnológicos en tomate de cáscara.

RESUMEN

“Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.)”

Lourdes Montalvo H. Maestría en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo.

(Bajo la dirección del Dr. A. Peña L.).

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada UACH-INIFAP ubicado en el Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX). Se estudiaron diez variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.), con el fin de monitorear la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, y esclarecer las relaciones genéticas entre las mismas, utilizando una técnica molecular (RAPD) y caracteres morfológicos.

El patrón de bandas de ADN fue obtenido a través de la amplificación por la PCR de los fragmentos de ADN de cada genotipo de las variedades de tomate de cáscara estudiadas. Se emplearon cinco iniciadores (OPAE-19, OPB-06, OPD-11, OPI-09 y OPV-06) de Operon Technologies y la técnica RAPD. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.4%, éstos se tiñeron con bromuro de etidio para ser visualizados con luz UV se documentaron en fotografías.

La metodología de análisis empleada permitió obtener una matriz de valores de las distancias genéticas entre pares de poblaciones, y de ésta se

construyó el dendograma de agrupamiento correspondiente, el cual mostró una división de cuatro grupos generales: 1) Mejorados, 2) Manzano, 3) Milpero y 4) Silvestres; el primero se organizó en cinco subgrupos con seis variedades. El tipo Silvestre autofértil se mantuvo alejado de las demás poblaciones, exhibiendo las distancias genéticas más amplias con diferentes variedades (0.460 a 0.878).

El agrupamiento de las mismas poblaciones con base en caracteres morfológicos originó un dendograma que agrupó a las variedades de tomate de cáscara de manera similar con los datos moleculares, obteniéndose tres grandes grupos: 1) Mejorados, 2) Milpero-Arandas-Tamazula, y 3) Silvestres. Ambos agrupamientos coinciden con otros propuestos en investigaciones anteriores, realizadas en base al estado evolutivo y de domesticación de las poblaciones.

El índice de variabilidad genética (IVG) calculado en cada variedad permitió conocer la alta diversidad genética existente dentro de estas poblaciones. Los valores de IVG fluctuaron de 0.2864 para la población menos variable (Tamazula), a 0.3896 para la población más heterogénea (Salamanca). En general las variedades que mostraron los mayores IVG fueron en orden: Salamanca, Rendidora, Manzano, Silvestre autoincompatible y Puebla; las de variabilidad intermedia fueron: Milpero, CHF1-Chapingo y Arandas; y las de menor variabilidad fueron: Silvestre autofértil y Tamazula.

PALABRAS CLAVE: RAPD's, variabilidad genética, *Physalis ixocarpa*, tomate de cáscara, marcadores moleculares

ABSTRACT

L. Montalvo H.

**"Molecular and morphological characterization of husk tomato
(*Physalis ixocarpa*, Brot.)"**

September, 1998.

(Under the direction of A. Peña L.).

This investigation was carried out in the Laboratory of Biotechnology UACH-INIFAP located in "Campo Experimental del Valle de México" (CEVAMEX). Ten varieties of husk tomato (*Physalis ixocarpa*, Brot.) were studied, in order to monitor the genetic variability within and among populations, and clarify the genetic relationships between them, utilizing molecular techniques (RAPD's) and morphological characters.

The pattern of DNA bands was obtained through the amplification for PCR of DNA fragment of each genotype of the varieties of husk tomato studied. It was employed five primers (OPAE-19, OPB-06, OPD-11, OPI-09 and OPV-06), from Operon Technologies, and RAPD's technique. The amplified products were separated in gels of agarose at 1.4%, they were tinted with EtBr to be viewed with UV light and they were documented in photographs.

The analysis allowed to get a matrix of genetic distances between the pairs of populations and the dendrogram of cluster showed a division of four general groups: 1) Improved, 2) Manzano, 3) Milpero and 4) Wilds, the first was organized in five subgroups with six varieties. The type Wild self-fertile was distant from the others populations, exhibiting the widest genetic distances with other varieties studied (0.460 to 0.878).

The clustering of populations in base of morphological characters originated a dendrogram that assembled the varieties of husk tomato that was comparable with the molecular datas; dividing in three big groups: 1) Improven, 2) Milpero-Arandas-Tamazula, and 3) Wild. Both husk tomato clustering coincide with other investigations carried out in base to the state evolutive and domesticacion of varieties.

The index of genetic variability (IGV) calculated in each varieties allowed to know the high genetic variability existent within these populations. Values of IGV fluctuated of 0.2864 for the fewer variable populations (Tamazula) to 0.3896 for more heterogeneous population (Salamanca). In general, the varieties with greatest IGV were in order: Salamanca, Rendidora, Manzano, Wild self-incompatible and Puebla; with intermediate variability were: Milpero, CHF1-Chapingo and Arandas; and the less index was obtained with: Wild self-fertile and Tamazula.

INDEX WORDS: RAPD's, genetic variability, *Physalis ixocarpa*, husk tomato, molecular markers

CONTENIDO

	PÁG.
RESUMEN	
ABSTRACT	
LISTA DE CUADROS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
CONTENIDO DEL ANEXO	xvi
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xviii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1. Importancia, origen y distribución del tomate de cáscara	4
2.2. Diversidad genética de <i>Physalis</i>	5
2.3. Importancia de la diversidad vegetal	9
2.4. Técnicas utilizadas en la clasificación varietal	11
2.4.1. Marcadores morfológicos	12
2.4.2. Marcadores moleculares	13
2.4.2.1. Bioquímicos	
A. Isoenzimas	13
B. Proteínas	15
2.4.2.2. Marcadores genéticos	16

2.4.2.3. Aplicación de los marcadores genéticos en plantas	18
2.5. El material genético: ADN	
2.5.1. Propiedades básicas del ADN	19
2.5.2. Desarrollo de su estudio	22
2.5.3. La Biología Molecular y la Biotecnología	23
2.6. Técnicas para generar marcadores genéticos	24
2.6.1. RFLP	25
2.6.2. VNTR	27
2.6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	28
2.6.3.1. Componentes de la PCR	31
2.6.3.2. Condiciones de termociclado	34
2.6.4. Técnicas basadas en la PCR	35
2.6.4.1. Micro, mini y macrosatélites	35
2.6.4.2. RAMPO	38
2.6.4.3. AFLP	39
2.6.4.4. RAPD	40
- Procedimiento	41
- Comparación de los RAPD con otros métodos basados en el ADN	42
- Limitantes de la técnica	43

- Trabajos realizados con los RAPD	44
--	----

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del área de trabajo	48
3.2. Material vegetal	48
3.3. Fase de campo	
3.3.1. Siembra y cuidado del material vegetal	49
3.3.2. Colecta del material vegetal	50
3.4. Fase de laboratorio	50
3.4.1. Congelado del material vegetal	51
3.4.2. Liofilizado	51
3.4.3. Molienda	51
3.4.4. Extracción y aislamiento del ADN genómico.....	52
3.4.5. Cuantificación de la concentración y pureza del ADN	52
3.4.6. Estandarización de las condiciones de PCR	53
3.4.7. Mezcla o cocktail de reacción	56
3.4.8. Análisis de los productos amplificados	
A. Electroforesis	57
B. Tinción	57
C. Fotografía	58
3.5. Análisis estadísticos	

3.5.1. Datos moleculares	59
3.5.2. Datos morfológicos	60
3.5.3. Cálculo del índice de variabilidad genética en las variedades	60
 IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados moleculares	
4.1.1. Estandarización de las condiciones de amplificación	62
4.1.2. Resultados moleculares y análisis	65
4.2. Resultados morfológicos	72
4.3. Índice de Variabilidad Genética (IVG)	76
4.4. Análisis general	79
 V. CONCLUSIONES	82
VI. LITERATURA CITADA	84
VII. ANEXO	96

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características descriptivas de las variedades de tomate de cáscara (<i>Physalis</i> spp.)	8
Cuadro 2. Programas probados en el termociclador para la amplificación de los fragmentos de ADN por la PC	55
Cuadro 3. Condiciones probadas para la toma de fotografías	58
Cuadro 4. Cantidad y concentración óptima de cada componente en la mezcla de reacción para la PCR	63
Cuadro 5. Prueba de amplificación con tres marcas de enzima concentración de ADN nativo en tomate de cáscara y frijol	64
Cuadro 6. Matriz de valores de las distancias genéticas entre las poblaciones de tomate de cáscara obtenida de los datos moleculares con cinco iniciadores	67
Cuadro 7. Promedio de valores de los caracteres morfológicos evaluados en las poblaciones de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> , Brot.) estudiadas	75
Cuadro 8. Índice de Variabilidad Genética (IVG) en las variedades de tomate de cáscara estudiadas	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia de pasos realizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	30
Figura 2. Dendograma de agrupamiento de las diez variedades de tomate de cáscara obtenido a partir de los datos moleculares con los cinco iniciadores	69
Figura 3. Patrón de bandas obtenidas con el iniciador OPV-06 en todos las poblaciones de tomate de cáscara (<i>Physalis ixocarpa</i> Brot.)	71
Figura 4. Dendograma obtenido con los datos morfológicos en las diez variedades de tomate de cáscara	74

CONTENIDO DEL ANEXO

PROTOCOLOS:

1A. Protocolo de extracción y aislamiento del ADN genómico.....	97
2A. Preparación de reactivos y soluciones concentradas utilizadas en el proceso de extracción del ADN	99
3A. Protocolo de la técnica de los RAPD's	101
4A. Protocolo de la electroforesis	104

CUADROS:

5A. Características de los iniciadores utilizados	105
6A. Equipo de laboratorio utilizado	106

FIGURAS:

5A. Dendograma de agrupamiento de las poblaciones de tomate de cáscara a partir de datos moleculares obtenidos con el iniciador OPV-06	108
6A. Patrón de bandas obtenidas con el iniciador OPAE-19 en la variedad CHF1-Chapingo y Salamanca	109
7A. Patrón de bandas obtenidas con el iniciador OPV-06 en las razas Silvestre autoincompatible y Tamazula	110
8A. Patrón de bandas obtenidas con el iniciador OPD-11 en las razas Rendidora y Puebla	111

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNasa	desoxirribonucleasa
AFLP	polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ARNr	ARN ribosomal
ARNasa	ribonucleasa
bp	pares de bases
BrEt	bromuro de etidio
C	citocina
ddH₂O	agua bidestilada
dATP	trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	trifosfato de desoxicitosina
dGTP	trifosfato de desoxiguanosina
dNTP's	desoxirribonucleótidos
dTTP	trifosfato de desoxitimidina
dUTP	trifosfato de desoxiuridina
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EtOH	etanol
G	guanina
5'	átomo 5 del carbono de la desoxirribosa
kb	kilobase

ISSR	secuencias inter-simples repetidas
IVG	índice de variabilidad genética
μm	micrometro
μg	microgramo
μl	microlitro
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
ng	nanogramo
P³²	fósforo radioactivo
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
RAPD	polimorfismo del ADN amplificado al azar
RFLP	polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN
rpm	revoluciones por minuto
SDS	deodecil sulfato de sodio
SSR	secuencias simples repetidas
STS	secuencias de sitios marcados
T	timina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	amortiguador Tris-EDTA
3'	átomo 3' del carbono de la desoxirribosa
U	uracilo
U μl⁻¹	unidades de enzima <i>Taq</i> por microlitro
UV	ultravioleta
VNTR	número variable de secuencias repetidas

I. INTRODUCCIÓN

El tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) es una especie hortícola de importancia en México por su amplio consumo en la alimentación de la población, con amplias perspectivas de mejorar dicha importancia al incrementarse el rendimiento y el consumo *per capita*, lo que por consecuencia aumentaría los ingresos económicos al mejorarse la productividad, industrialización y exportación. Se cultivándose en 26 de los 32 estados de la República Mexicana y ocupa el quinto lugar en superficie sembrada con especies olerícolas (SARH, 1993; SAGAR, 1996).

Por ser considerado como centro de origen, distribución y domesticación; México es poseedor de una amplia diversidad genética de tomate de cáscara, misma que ha sido agrupada en ocho razas: Silvestre, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, Salamanca y Puebla (Peña *et al.*, 1992). Parte de esta diversidad se atribuye a que la especie presenta autoincompatibilidad gametofítica, lo que ocasiona que sea alógama obligada, originando poblaciones heterogéneas y heterocigóticas; las cuales presentan dificultad en su clasificación debido a esta heterogeneidad, así como a la presencia de poblaciones intermedias y con diferente estado evolutivo (silvestres, toleradas, fomentadas, cultivadas y domesticadas). Esta diversidad,

aunque de manera limitada se ha aprovechado en los programas de mejoramiento genético de la especie, existiendo a la fecha sólo dos variedades mejoradas: Rendidora y CHF1-Chapingo, ésta última producto del programa regional de mejoramiento genético llevado a cabo en la Universidad Autónoma Chapingo (Peña, 1998a).

El mejoramiento genético es un proceso a largo plazo, sobre todo con el uso de las metodologías tradicionales, por lo que es necesario recurrir al apoyo de las nuevas técnicas desarrolladas en Biología Molecular y Biotecnología basadas en el uso del material genético o ADN. Incursionando en esta área de la investigación y con la intención de apoyar el proceso anterior, se utilizó una de las herramientas más prometedoras de la Biotecnología: los marcadores genéticos moleculares, mismos que son desarrollados por gran número de metodologías, como: RFLP, VNTR, tecnología de la PCR, AFLP, etc.

Por la amplia diversidad genética que compone al género *Physalis*, es importante contar con una herramienta de identificación y caracterización varietal rápida y eficiente. Los marcadores genéticos moleculares, a diferencia de los morfológicos, presentan la ventaja de no estar influenciados por factores externos o ambientales, por lo que han demostrado ser buena herramienta para los fines anteriores. A la vez, también aportan la posibilidad de conocer el índice de variabilidad genética (IVG) existente a nivel intra-poblacional en las diferentes poblaciones en estudio, en este caso en las variedades de tomate de cáscara, lo que significa un valioso conocimiento que puede apoyar la

organización y utilización objetiva y clara de estas poblaciones, como fuente de germoplasma en los programas de mejoramiento genético de la especie.

Investigaciones realizadas con base en caracteres morfo-fisiológicos y evolutivos, han agrupado las diversas poblaciones de tomate de cáscara en ocho razas ya mencionadas, proponiendo este orden de acuerdo al grado evolutivo presentado (Peña, 1998b).

De acuerdo con las consideraciones expuestas, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- a) Realizar la caracterización molecular y morfológica de diez variedades importantes de tomate de cáscara utilizando la técnica de los RAPD's y caracteres morfológicos; así como, la comparación global de dichos resultados obtenidos con ambas metodologías.
- b) Calcular el índice de variabilidad genética con el fin de monitorear la diversidad genética existente dentro de las poblaciones estudiadas de tomate de cáscara.
- c) Establecer las condiciones adecuadas de obtención de los marcadores RAPD's.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia, origen y distribución del tomate de cáscara

En la actualidad, el tomate de cáscara se ubica entre las primeras cinco especies olerícolas cultivadas en México. La superficie dedicada a este cultivo junto con el rendimiento por hectárea han sufrido grandes cambios, en los últimos 35 años se reporta un incremento del 1030 y 400%, respectivamente (Montalvo, 1995). La superficie cultivada reportada para 1993 fue de 35 000 ha aproximadamente y el rendimiento de 11.5 ton ha⁻¹ (SARH, 1993), para 1996 fue de 33 000 ha y 12.2 ton ha⁻¹ el rendimiento (SAGAR, 1996), al respecto diversas investigaciones reportan un potencial productivo de 40 ton ha⁻¹ (Peña, 1998a).

El consumo *per capita* también ha sufrido importantes cambios, actualmente el promedio nacional es de 3.5 kg, registrándose el más elevado en la zona Centro del país, con un consumo promedio de 18 kg para la región de Texcoco, Edo. de México (Gómez, 1991).

El tomate de cáscara es una especie nativa del territorio mexicano, conocida y utilizada por los Aztecas y Mayas desde épocas Precolombinas. En la actualidad se encuentra en forma silvestre o cultivada a lo largo del país, bajo diversas condiciones naturales, en altitudes que van desde los 8 hasta los

3350 msnm, asociadas a cuatro tipos climáticos [Ac, Am y Aw; BS; Cb, y A(C), (A)Ca, y (A)Cb], sobresaliendo el BS con un 33%. Las formas silvestres se distribuyen en una franja de la Vertiente del Pacífico que va desde Guatemala hasta California. De hecho, Guatemala y México son considerados los centros de diversidad, aunque es en este último donde se encuentra el mayor porcentaje de dicha diversidad (Santiaguillo y López, 1991). Las evidencias arqueológicas y la variabilidad genética de la especie, sugieren que el centro de origen más probable es el territorio mexicano (Santiaguillo *et al.*, 1997)

Gran parte de las especies de tomate de cáscara se localizan en las zonas tropicales y templadas de América, y sólo algunas en el Este de Asia, India, Australia, Europa y Africa tropical (Menzel, 1951, citado por Santiaguillo *et al.*, 1994).

2.2. Diversidad genética de *Physalis*

Se ha estimado que dentro de este género existen alrededor de 100 especies de amplia distribución, y es en México donde se encuentra más del 70% en forma cultivada o en poblaciones con diferente estado evolutivo (silvestres, toleradas, fomentadas, cultivadas y domesticadas), distribuidos en 26 entidades del país, aunque no se conoce con precisión su variabilidad y disponibilidad (López *et al.*, 1994). Parte importante de esta diversidad genética se atribuye a la condición de la especie, ya que presenta

autoincompatibilidad gametofítica, lo cual ocasiona que sea alógama obligada, dando origen a poblaciones heterogéneas y heterocigóticas.

El género *Physalis* presenta amplia variabilidad genética. Al respecto se han realizado varios estudios con el propósito de caracterizar dicha diversidad, a continuación se citan algunos de estos trabajos:

En 1992, Ayala *et al.* mediante métodos numéricos y análisis cluster, efectuaron la caracterización de germoplasma de tomate de cáscara colectado en diez estados de la República Mexicana, y evaluaron 64 colectas con el propósito de seleccionar material sobresaliente para su uso en el mejoramiento genético. El método de taxonomía numérica empleado permitió agrupar éstas colectas en siete grupos definidos. Los materiales del grupo cinco presentaron la mayor expresión en tamaño de fruto, por lo que fueron considerados como promisorios para ser incluidos en el programa de mejoramiento genético de la especie. Otro trabajo similar fue realizado por Santiaguillo y López en 1991.

Peña (1998b) ha realizado varias publicaciones al respecto y actualmente se encuentra en revisión para su publicación un trabajo sobre la variabilidad genética en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.), en donde hace referencia a varios aspectos que han generado controversia sobre el tema.

Santiaguillo y otros autores publicaron en 1997 el artículo "Importancia de los recursos fitogenéticos del tomate de cáscara (*P. ixocarpa*) en México", donde destacan la importancia de conocer, coleccionar y preservar la mayor variabilidad existente de la especie, así como la intensificación de trabajos

tanto básicos como tecnológicos tendientes a la colecta, conservación, caracterización y evaluación de dichos recursos genéticos. Los mismos autores en ese año publicaron otro estudio, titulado "El tomate milpero (*Physalis ixocarpa*, Brot.) como recurso fitogenético", los objetivos fueron profundizar en el conocimiento del tomate milpero como recurso vegetal de origen mexicano, plantear las bases de su utilización en un programa de fitomejoramiento y reunir la mayor diversidad genética posible en este tipo de tomate (Santiaguillo *et al.*, 1997).

Santiaguillo y Peña (1997) describen las razas más importantes de tomate de cáscara en base a sus caracteres morfológicos y fisiológicos, resumidas en el Cuadro 1. La diversidad genética referida ha sido abordada en el área de recursos genéticos de la línea de investigación de tomate de cáscara del Programa Nacional de Investigación en Olericultura de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Los estudios efectuados a la fecha en relación a los recursos genéticos, han constatado la existencia de múltiples variantes genéticas en la especie. Intentos por sistematizar la riqueza genética colectada condujeron a la diferenciación de algunas razas, logrado en base a caracterizaciones de las colectas recurriendo al agrupamiento de materiales con características fisiológicas y morfológicas similares. De forma esperada, los grupos formados correspondieron con las poblaciones (razas) diferenciadas en la práctica como Rendidora, Salamanca, Tamazula, Puebla, Manzano, Arandas, Milpero cultivado, Milpero no cultivado y las variedades mejoradas. Las tres primeras son las más importantes y estudiadas, sobre todo Rendidora.

Entre las características que diferencian una raza de otra están el hábito de crecimiento, ciclo reproductivo, rendimiento; color, tamaño, forma y firmeza de fruto, rasgos de cáliz y número de semilla por fruto (Santiaguillo y Peña, 1997).

Otras investigaciones relacionadas con el tema han incluido estudios a nivel cromosómico (García, 1977 y Rao *et al.*, 1987; citados por Peña, 1998b; y más recientemente Grimaldo, 1997), reportando resultados interesantes.

Cuadro 1. Características descriptivas de las variedades de tomate de cáscara (*Physalis* spp.).

Variedad	Características					
	Hábito de crecim.	Ciclo	Potencial de rend.	Tamaño de fruto	Color de fruto	Color de cáliz
Rendidora	rastrero	precoz	muy rend.	Mediano	verde limón	verde
Salamanca	erecto	tardío	rendidora	grande	verde intenso	verde claro
Tamazula	erecto	precoz	rendidora	mediano	morado	verde a morado
Puebla	rastrero a semierecto	precoz	rendidora	grande	verde intenso	verde con nervaduras moradas
Manzano	rastrero a semierecto	tardío	rendidora	grande	amarillo-a-naranjado	verde
Arandas	erecto	precoz	poco rend.	Mediano	verde a morado	morado a verde
Milpero cultivado	rastrero a erecto	tardío	muy poco rendidora	pequeño	verde a morado	verde a morado
Milpero no cultivado	rastrero a erecto	tardío	muy poco rendidora	muy pequeño	verde - amarillo	verde
CHF1-Chapingo	rastrero a semierecto	muy precoz	mucho muy rendidora	mediano	verde limón	verde

Fuente: Santiaguillo y Peña (1997) con modificaciones realizadas por el autor.

Grimaldo (1997) estudió la relación entre el grado de domesticación y las características citológicas y morfológicas de flores y frutos de 10 razas de tomate de cáscara (*Physalis* spp.). Las diferencias encontradas en los cromosomas y comportamiento citológico entre poblaciones, fueron independientes al grado de domesticación o mejoramiento genético que tenían éstas y a la variación del tamaño de flores y frutos.

2.3. Importancia de la diversidad vegetal

La biodiversidad es la totalidad de genes, especies y ecosistemas de una región; también la han llamado como la variación de genes dentro de especies producto de millones de años de evolución o domesticación; siendo la mutación, selección, migración y la hibridación las principales fuentes de variación (Montes, 1989).

La variabilidad genética vegetal es la materia prima y la base para el mejoramiento genético de las plantas, que sustenta la producción agrícola del mundo, en la actualidad dicha variabilidad se ha visto seriamente amenazada por un sin número de circunstancias naturales y la intervención del hombre, acelerándose el avance del proceso de erosión genética; razón por la cual se considera que la investigación al respecto no debe posponerse.

La forma principal de aprovechar el patrimonio de una especie vegetal es mediante la generación de variedades mejoradas, para lo cual se debe

contar con el mayor acervo de conocimientos acerca de la especie y de los métodos de mejoramiento genético.

En parte, el fitomejoramiento tiende a eliminar variabilidad al tratar de hacer a los cultivos más manejables para el hombre; sin embargo, en ocasiones esa uniformidad se convierte en desventaja, por ejemplo cuando el material es susceptible a algún patógeno.

De acuerdo con Smith y Smith (1992) la diversidad puede dar la oportunidad de evitar poner en peligro la base genética con respecto a dificultades impuestas anualmente con el manejo, medio ambiente, plagas y enfermedades. Desafortunadamente sólo la percepción permite determinar que tipo o nivel de diversidad genética es suficiente.

Un estudio integral de los recursos fitogenéticos implica la aplicación y desarrollo de una serie de disciplinas del conocimiento básico como la botánica, hasta la caracterización con marcadores moleculares, incluyendo la genética, evolución, estadística, etc.; así, la aplicación de las técnicas de la biología molecular ubicadas en este contexto alcanzan el más alto impacto. A la fecha la técnica que parece ser más útil para el mejoramiento genético de los cultivos es el uso del polimorfismo de marcadores genéticos que pueden ser morfológicos, bioquímicos o moleculares (Castillo, 1993).

2.4. Técnicas utilizadas en la clasificación varietal

Realizar clasificaciones implica designar nombres descriptivos para ilustrar variedades de plantas, lo que llega a ser de suma importancia para identificar fuentes de semillas y plantas en campo, incluso los productores y consumidores finales también se interesan por conocer la identidad varietal.

En el mejoramiento de plantas se requiere describir las variedades cultivadas porque representan el producto final del proceso de mejoramiento; y el germoplasma por ser la base de éste.

Los patrones de diversidad genética se han estudiado utilizando una gran variedad de caracteres morfológicos, bioquímicos y moleculares (marcadores). Por ello, es necesario conocer la utilidad de los diferentes métodos para reconocer y esclarecer las relaciones de las especies. Esto implica conocer la distancia genética relativa entre individuos o poblaciones que son utilizados en los programas de mejoramiento y permiten la organización del germoplasma, proveen un muestreo más eficiente de genotipos y es factible conocer la similaridad genética entre éstos, facilitando la selección de los individuos por cruzar en las combinaciones híbridas para optimizar la expresión de la heterosis (Ahmad *et al.*, 1996).

Los marcadores son las características distintivas de un organismo o una población que se manifiestan de manera constante. En este aspecto se basa la selección de individuos deseables en el fitomejoramiento, dichos

marcadores pueden ser morfológicos y moleculares, incluyendo los bioquímicos y genéticos (Rivera *et al.*, 1991).

2.4.1. Marcadores morfológicos

Las características morfológicas de los organismos son el primer indicador visible para la identificación y diferenciación de genotipos. Los datos morfológicos para describir cultivares tienen mucha popularidad como descriptores; sin embargo, su validez para la identificación y caracterización de cultivares y usos relacionados es cuestionada, sobre todo porque en la actualidad se requiere calcular las distancias genéticas entre cultivares, lo que es imposible conocer con estos datos.

El alto número de plantas mejoradas cercanamente relacionadas, liberadas en la actualidad, hace difícil lograr una identificación única y válida. Este problema se acentúa en cultivos con niveles limitados de diversidad genética de materiales élite o cuando se practica selección de materiales muy similares. Lo mismo puede suceder en poblaciones de plantas con amplia diversidad genética.

La morfología refleja no sólo la constitución genética del cultivar, sino también la interacción del genotipo por el ambiente (GxA). Los descriptores basados en datos morfológicos son fundamentalmente defectuosos en la habilidad para proveer información real para el cálculo de la distancia genética o la validación de pedigríes, sobre todo en materiales colectados en diferentes

años y/o localidades. La variación morfológica tiene una medida inconsistente debido a los efectos de la interacción GxA y los pequeños efectos de numerosos genes cuantitativos. Existen otras consideraciones al respecto en el sentido de que un número considerable de variaciones morfológicas se han eliminado, con la consecuencia de que muchas variedades son aparentemente similares. Para gran cantidad de características morfológicas, el control genético es desconocido; se sabe también que genotipos diferentes pueden dar fenotipos aparentemente similares (Smith y Smith, 1992; Lee, 1995).

2.4.2. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se han utilizado ampliamente en los últimos 20 años, dentro de éstos existen varios tipos como: los bioquímicos (isoenzimas y proteínas) y genéticos (basados en fragmentos de ADN).

2.4.2.1. Bioquímicos

A. Isoenzimas

Las isoenzimas, también llamadas aloenzimas, fueron definidas originalmente por Markert y Moller en 1959 (citados por Soltis y Soltis, 1989), como diferentes variantes de una misma enzima o múltiples formas moleculares de enzimas, con funciones similares y presentes en el mismo individuo. Su función es regular la acción de los genes en el desarrollo y la

diferenciación en plantas y animales. Algunas de éstas se distinguen por su presencia en distintas partes de la misma planta, y a diferentes concentraciones.

El principio de su uso en estudios de poblaciones como marcadores moleculares parte de dos características: la proporción de loci enzimáticos, para lo cual cada población es polimórfica; y el principal número de loci, para el que los individuos son heterocigóticos. Un locus isoenzimático se define como el gene estructural para una enzima capaz de catalizar una reacción bioquímica específica. Las enzimas en su totalidad son proteínas y pueden reflejar directamente alteraciones en la secuencia del ADN.

Se han utilizado ampliamente en el mejoramiento genético para la evaluación y selección de genotipos deseables, en estudios de evolución en plantas cultivadas; localización, número y naturaleza de los genes que contribuyen a patrones de herencia cuantitativa (QTLs), medición de la variabilidad genética en poblaciones de plantas, entre otras.

Son enzimas que tienen un sustrato en común, pero difieren en la movilidad electroforética y son reveladas cuando los geles se sumergen en soluciones que contienen colorantes específicos a la enzima. Los datos obtenidos de los geles electroforéticos consisten del número y relativa movilidad de varios productos enzimáticos, los cuales con un apropiado análisis proveen un método ampliamente usado en la evaluación de las diferencias genéticas entre grupos de plantas. El patrón de bandas resultante es el fenotipo electroforético, que consiste de una o más bandas coloreadas (1

a 15) para cada individuo analizado, y varía en su complejidad dependiendo del tejido, enzima analizada, número de genes codificantes, su estado alélico (homo o heterocigosis) y estructura cuaternaria de los productos proteicos (Soltis y Soltis, 1989; Brown, 1990).

Un trabajo representativo con isoenzimas es el realizado por Montero (1996) al estudiar híbridos dobles de maíz H-28 y H-30 procedentes de INIFAP y PRONASE para conocer su diversidad genética y las distancias genéticas entre sí y sus progenitores, los cuales tienen un bajo nivel de endogamia.

B. Proteínas

Las proteínas son el producto de la transcripción primaria del ADN. El perfil de éstas en semillas se ha utilizado para identificar cultivares de diferentes especies, a través de la técnica llamada SDS-PAGE (del inglés Sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Aún cuando esta técnica no diferencia a cultivares cercanamente relacionados, provee evidencia para identificar algunos de ellos (Krishnan y Sleper, 1997).

Las proteínas son moléculas con carga eléctrica neta que es afectada por el pH, y pueden ser separadas por electroforesis con base en su carga eléctrica neta, peso molecular, punto isoeléctrico o combinaciones de estos criterios, así como por cromatografía.

Las proteínas se visualizan por diferentes técnicas de tinción, la más sensible incluye nitrato de plata y la incorporación de aminoácidos radioactivos dentro de las proteínas. Estas últimas son utilizadas como antígenos para

generar anticuerpos, la similitud entre variedades puede estimarse por la medida del grado de respuesta entre antígeno y aumento de anticuerpos por otros antígenos.

Es posible que los factores del ambiente afecten los niveles cualitativos y cuantitativos de proteína en semillas, los cuales también interactúan con otros compuestos de órganos como raíz, hojas y tubérculos, así como por el estado de desarrollo de la planta, etc. Es probable que esta interacción perturbe la reproducibilidad del perfil proteico, por ello, las semillas son la mejor fuente de proteínas (Smith y Smith, 1992).

Por éstas y otras razones, en la actualidad existen fuentes (marcadores genéticos) más confiables para realizar estudios de identificación y caracterización varietal.

2.4.2.2. Marcadores Genéticos

Un marcador genético es una banda de ADN que puede estar asociada con un carácter agronómico si se habla de plantas; o también, es cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico detectable fácilmente, por ejemplo un gene que ocasiona resistencia para alguna plaga o enfermedad, factor ambiental adverso, etc. (Valadéz y Kahl, 1997).

Los avances en bioquímica, genética y biología molecular, entre otras ciencias han proveído descriptores o marcadores basados en el ADN. La utilización de fragmentos del ADN cromosómico como marcadores genéticos

refleja diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Todo organismo diploide contiene dos copias de cada cromosoma, uno que proviene del padre y otro de la madre, las cuales son parecidas excepto por alguna diferencia pequeña que se encuentra en la secuencia del ADN de ambos progenitores, llamada polimorfismo del ADN. Estos polimorfismos son la base molecular que determina genéticamente las diferencias fenotípicas entre los individuos (Berumen, 1993), y son el producto de cambios o rearrreglos entre los pb (nucleótidos), que van desde simples cambios de un nucleótido en la secuencia de ADN, hasta traslocaciones, inversiones, o inserciones de segmentos de ADN.

Los marcadores genéticos moleculares consisten en la caracterización detallada del patrón de bandeo obtenido al finalizar cualquiera de las técnicas desarrollada para tales fines. Este perfil de bandas es también conocido como huellas genómicas (son bandas que identifican de forma similar que el código de barras de las mercancías en los supermercados), una traducción del inglés DNA fingerprinting.

La utilidad del diagnóstico basado en marcadores de ADN se fundamenta en una extensa tecnología utilizada para definir los polimorfismos del ADN (Tingey y Tufo, 1993). Dichas tecnologías están basadas en un sin número de principios y metodologías; tales como, corte del ADN con enzimas de restricción, clonación, hibridación, tinción, y últimamente la PCR (citada más adelante), entre otras.

2.4.2.3. Aplicación de los marcadores genéticos en plantas

Al inicio, la aplicación e investigación del ADN se enfocó a resolver problemas sobre la salud del hombre; sin embargo, en la actualidad es en la agricultura donde hay mayor desarrollo de estas técnicas (marcadores moleculares e ingeniería genética), particularmente en el fitomejoramiento, donde la principal aplicación está representada por la identificación varietal (Rafasli *et al.*, 1991; Iglesias y Rojas, 1992; Lee, 1995; Sahagún, 1997; Valadéz y Kahl, 1997) y otras como:

- Medida de la variabilidad genética
- Identificación de recursos genéticos como fuente de mejoramiento (evaluación de germoplasma)
- Estimación de la tasa de entrecruzamiento
- Análisis de paternidad o determinación de parentescos
- Cálculo de la heterogeneidad en líneas como fuente de germoplasma y desarrollo de líneas puras mejoradas
- Identificación de híbridos
- Determinación de la pureza genética de lotes de semilla
- Protección y patente de variedades
- Identificación de algunos patógenos, como virus
- Búsqueda eficiente de ciertos genes en las poblaciones mejoradas (selección indirecta de genes blanco)

- Identificación de individuos transformados después de someterlos a transformación genética
- Análisis filogenéticos
- Predicción de grados de heterosis mediante la medición de divergencia
- Construcción de mapas de ligamiento
- Mapeo de loci de caracteres cuantitativos o QTLs. Con esta técnica se tiene mayor grado de resolución en el estudio de caracteres cuantitativos, por lo que se emplea en monitorear que segmentos cromosómicos se conservan en cruza amplias, identificar y localizar genes de caracteres cuantitativos.
- Mapeo comparado para determinar homologías del genoma. Permite emplear sondas generadas de una especie particular para trabajar con otras diferentes, así como el acceso a sondas utilizables en aquellas especies cuya posición de mapa puede predecirse a partir del mapeo de otra.

2.5. El material genético: ADN

2.5.1. Propiedades básicas del ADN

El ADN es un polímero formado por dos cadenas complementarias de ácidos nucleicos, dispuestas una junto a la otra en forma de doble hélice. Cada una constituida de nucleótidos que son la unidad estructural de los ácidos nucleicos. Estos están conformados por dos bases púricas y dos pirimídicas (guanina, citocina, adenina y timina en el ADN, o uracilo en lugar de timina en

el ARN), un azúcar (2' desoxirribosa en el ADN o ribosa en el ARN) y un grupo fosfato. La unión continua de los ácidos nucleicos conforman el ADN o ácido desoxirribonucleico y ambas cadenas se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno entre los pares de bases. Siempre se pareja adenina (A) con timina (T) y guanina (G) con citosina (C) (Maldonado y Loren, 1989; Freeland, 1981).

La característica distintiva de los sistemas biológicos de generar una descendencia con características similares a las de sus progenitores es un fenómeno llamado herencia y tiene su localización en los cromosomas o ADN, constituidos por los ácidos nucleicos, en cuya secuencia de bases está contenida la información genética. Es necesario que esta información sea copiada y transmitida de padres a hijos, a fin de preservar las características de cada especie. A este proceso de síntesis de ADN se le conoce como *replicación*. Un gene, en su secuencia de nucleótidos, tiene la información para que en los ribosomas se lleve a cabo la síntesis de proteínas específicas de cada organismo; sin embargo, para que esto ocurra se requiere previamente que la secuencia del gen sea copiada en la forma de ARN, el cual es por lo menos de tres tipos: ribosomal, de transferencia y mensajero. Los tres participan en la síntesis de proteínas pero, es este último el que lleva la secuencia de codones que servirán para dirigir la incorporación secuencial de aminoácidos en la síntesis de proteínas. A este proceso de síntesis de ARN se le conoce como transcripción (Davis *et al.*, 1986).

Los procesos descritos son universales y esenciales en todos los sistemas biológicos, mismos que se dividen en dos grandes grupos: sistemas

biológicos de tipo procariote (bacterias, bacteriófagos, virus y plásmidos) y sistemas de tipo eucariote (células y organismos superiores). Ambos grupos se diferencian entre sí por la organización de su genoma. En los cromosomas de eucariotes los genes están separados unos de otros por secuencias de ADN no codificante llamado ADN espaciador, el cual tiene una longitud varias veces mayor que los genes que se encuentran dispersos en él. Si bien este hecho no está totalmente comprendido, se piensa que refleja mayor potencial de recombinación génica que en los sistemas procariotes. No obstante que no se ha definido la función de este ADN espaciador, también debe replicarse junto con los genes, durante la fase de su síntesis en las células. Otras características del ADN relacionadas con las anteriores son las siguientes:

Complementariedad. La complementariedad de las dos cadenas del ADN, debida a la unión específica entre los pares de bases G-C y A-T es sumamente importante para la duplicación del material genético.

Antiparalelismo. Las dos cadenas polinucleotídicas de la doble hélice del ADN son antiparalelas; es decir, el extremo 3'-OH de una de las hebras es adyacente al extremo 5'-P (5'-fosfato) de la otra, siendo esta característica a la que se atribuye la alta estabilidad de la molécula.

Desnaturalización y renaturalización. Por su estructura, el ADN permite con cierta facilidad que las dos cadenas se separen para formar dos cadenas sencillas, mismas que se reasocian al someterlas a condiciones particulares de temperatura o compuestos. A temperatura alta (mayor a 50°C) los puentes de hidrógeno (H) existentes entre las bases pareadas se rompen.

Ésto depende del contenido de pares de bases A-T en las regiones de las hebras, pues aquí existen sólo dos enlaces de H y en las uniones G-C son triples. Un ADN de cadenas sencillas se reconstruye a una temperatura alrededor de 25°C (Watson, 1983).

2.5.2. Desarrollo de su estudio

Existen dos principios fundamentales que rigen el caminar de muchas ciencias biológicas y son la base de los conocimientos que actualmente se tienen sobre el ADN y su empleo en los marcadores genéticos moleculares: 1) La aceptación de la teoría Darwiniana de la evolución, la cual sugiere que en todas las formas vivientes existen los mismos principios básicos de la vida; y 2) La teoría celular de Schleiden y Schwann, la que originalmente propone que todas las plantas y animales están formados por unidades fundamentales llamadas células. Sin embargo, existe un nivel más básico que trasciende las estructuras celulares, y que fue estudiado por el microbiólogo norteamericano Avery y sus colaboradores MacLeod y McCarty del Instituto Rockefeller en 1944, quienes demostraron que las propiedades patogénicas de los pneumococos podían modificarse mediante la adición de ADN de alto peso molecular, sugiriendo que esta macromolécula podría ser la responsable de transmitir caracteres hereditarios. A raíz de estas investigaciones, el interés por el estudio de los ácidos nucleicos cobró un auge excepcional que alcanzó uno de sus puntos máximos con los descubrimientos claves de Watson y Crick en

1953, quienes dilucidaron la estructura del ADN y propusieron un mecanismo coherente para explicar una de las características fundamentales del material genético que había mantenido confundidos a los genetistas por muchos años: la autoduplicación del gen (Freeland, 1981; Rivera *et al.*, 1991).

¿Cómo estaba codificada la información en la molécula de ADN? ¿Qué papel juega el ARN?. Éstas y muchas otras interrogantes llevaron a biólogos, químicos y físicos a interesarse por los fenómenos moleculares que se llevan a cabo dentro de la célula. Así se inició lo que actualmente conocemos como Biología Molecular, herramienta básica en el desarrollo de la técnica de los marcadores genéticos moleculares y otras áreas (Ingeniería genética, Cultivo de tejidos, etc.) que conforman la Biotecnología moderna (Galindo, 1988).

2.5.3. La Biología Molecular y la Biotecnología

Las investigaciones en estas áreas, conducidas por Watson y Crick durante el periodo de 1940-1970, estuvieron dirigidas fundamentalmente a esclarecer los mecanismos mediante los cuales se podía replicar el ADN (y por lo tanto el gene). Se estudió el funcionamiento de la transcripción y la naturaleza detallada de la clave genética; así como las bases estructurales y bioquímicas mediante las que un ARNm da origen a un polipéptido, y se describió los sistemas de reparación del ADN en las células (Berumen, 1993).

A pesar de los avances significativos de la Biología Molecular, fue hasta inicios de los 70's cuando algunos investigadores se dieron cuenta de una

nueva posibilidad que cambiaría la dirección y concepción de esta disciplina y que además, tenía un potencial enorme de influir en la sociedad; las herramientas de la Biología Molecular no sólo permitían el estudio fino del genoma de los organismos vivos sino, incluso, la manipulación a voluntad de este genoma y la transferencia de caracteres genéticos trascendiendo las barreras naturales de las especies (Rivera *et al.*, 1991).

Los avances en bioquímica, genética, biología molecular y biotecnología han proveído descriptores basados en proteínas (incluyendo isoenzimas) y ADN, estas moléculas son universales en el reino animal y vegetal, y ahora son utilizadas como herramientas en diversos estudios de estas disciplinas (Smith y Smith, 1992).

2.6. Técnicas para generar marcadores genéticos

La elección de la técnica para generar alguna clase de marcador genético para un proyecto en particular depende de muchos factores, primero considerar los objetivos y/o alcances del trabajo, incluyendo el tipo de población a evaluar; cantidad de material biológico disponible; genética del carácter y del organismo a ser estudiado; el costo o recursos económicos disponibles y equipo; incluso, considerar la complejidad de cada técnica, con el fin de seleccionar la más adecuada para el cumplimiento de los objetivos de la investigación.

2.6.1. RFLP

Los RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polimorphisms) son polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción. Fueron utilizados por vez primera por Grodzicker *et al.* en 1974 como un instrumento para el análisis genético de un mutante de adenovirus sensible a la temperatura. Posteriormente Botstein *et al.* en 1980 (citados por Iglesias y Rojas, 1992) descubrieron la base teórica de este método para el mapeo de genes asociados con diversas enfermedades en el hombre, iniciándose así la mayoría de los trabajos con marcadores, siendo hasta 1983 cuando Burr, *et al.* descubrieron la posibilidad de emplear esta metodología en plantas, principalmente enfocada a su mejoramiento.

El primer paso en la obtención de los RFLP, así como gran parte de los marcadores, implica la extracción y purificación del ADN de los individuos en estudio y la posterior digestión de éste con enzimas de restricción, obteniéndose una mezcla de fragmentos de restricción, que difieren en longitud de acuerdo con una distribución especial de sitios de corte a lo largo de la molécula de ADN. Ya que las variaciones a nivel de ADN entre los individuos son monitoreadas como cambios en la longitud de fragmentos definidos de ADN, se le ha dado el nombre al polimorfismo o diferencias así reveladas (Iglesias y Rojas, 1992).

Los fragmentos de ADN de individuos procariotes pueden ser separados según su tamaño o peso molecular por la técnica de electroforesis en gel de

agarosa, en el que migran dichas moléculas, las de menor peso molecular se moverán con más facilidad que las de mayor peso.

Posteriormente, es posible visualizar los fragmentos de ADN sometidos a electroforesis mediante sustancias fluorescentes irradiadas con luz UV, como el bromuro de etidio (BrEt). Para ello, los geles se sumergen directamente en una solución de este compuesto, el cual se intercalará entre las dos hélices del ADN, y así las bandas de ADN se observarán de color blanco-naranja al irradiar el gel con luz UV.

En organismos eucariotes no es posible diferenciar los patrones de distribución de los fragmentos de longitud de ADN genómico directamente, debido al gran número de fragmentos que producen sólo una serie de manchas continuas cuando son separadas en el gel; por esto, los fragmentos se transfieren del gel a un medio de soporte como la membrana de nylon o filtro de nitrocelulosa, según la técnica descrita por Southern (1975) citada por Smith y Smith (1991).

Posteriormente, los fragmentos transferidos son visualizados por hibridación empleando sondas de ADN marcadas apropiadamente de forma radioactiva con α - ^{32}P / dATP, o de forma no radioactiva diseñada más recientemente para suprimir el problema de manejar la radioactividad. Esta técnica se basa en reacciones enzimáticas, dos de ellas son la colorigénica y la luminogénica (Bronstein *et al.*, 1989).

Después de que los fragmentos de ADN hibridizan (ADN-ADN) con dichas sondas, pueden ser visualizados por autoradiografía, apareciendo las

bandas sobre el film (Salinas *et al.*, 1996; Rivera *et al.*, 1991; Smith y Smith, 1991).

Los RFLP son marcadores codominantes y bastante confiables en análisis de ligamiento y mejoramiento. Además es posible determinar si el carácter ligado está presente en estado heterocigote u homocigote en un individuo, lo cual es importante conocer en caracteres recesivos (Winter y Kahl, 1995).

2.6.2. VNTR

Los VNTR (Número Variable de Secuencias Repetidas en Serie, del inglés Variable Numerical Tandem Repeat) es otra técnica basada en el uso de las enzimas de restricción y el método de hibridación tipo *Southern Blot*. Una desventaja de esta y otras técnicas es que requieren alta cantidad de ADN (cuando menos 60 ng) de alto peso molecular, por lo que no se puede utilizar en muestras con escaso ADN o degradado. Para establecer los patrones de identidad tipo VNTR se emplea la técnica de hibridación mencionada, con la que se detectan los fragmentos de ADN de un locus específico producidos por las enzimas de restricción, las cuales cortan el ADN de doble cadena en secuencias específicas de 4 a 6 nucleótidos, estos fragmentos son separados mediante la electroforesis en gel de agarosa. Estos pasos son comunes a todos los marcadores genéticos. Así que, para distinguir las bandas que contienen los marcadores polimórficos que se buscan para identificar a cada

individuo, es necesario transferir el ADN a un filtro de nylon y realizar la hibridación del ADN, mediante sondas radiactivas del marcador genético en cuestión (Berumen, 1993). Una modalidad de esta técnica es la citada por Zhou *et al.* (1997) a la cual llamó DAMD (del inglés Direct amplification of minisatellite-region DNA), amplificación directa de regiones de minisatélites en el ADN.

2.6.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction) fue descrita por Kary B. Mullis en los 80's como un proceso que permite sintetizar un número ilimitado de copias de cualquier gene. Desde entonces varios campos de la investigación han tomado las ventajas de esta técnica y reemplazado, en gran parte, a la clásica y laboriosa clonación del ADN, que consiste en clonar o introducir una pequeña secuencia de ADN de interés en ADN de un plásmido, las bacterias al reproducirse clonarán dicho plásmido (Coperías, 1995).

La PCR consiste en la amplificación de secuencias específicas de ADN a partir de una mezcla compleja de secuencias como es el ADN genómico. Se usan primers (iniciadores) sintéticos para iniciar la síntesis de una cadena complementaria del ADN con ayuda de una enzima polimerasa termoestable (*Taq* I polimerasa) obtenida de una bacteria termofílica (*Thermus aquaticus*).

Los productos de las secuencias amplificadas son aislados, caracterizados y utilizados directamente como marcadores moleculares (Clegg y Durbin, 1990).

La PCR es un procedimiento que se realiza en tres pasos (Figura 1): el primero es una **desnaturalización** que sirve para separar la cadena doble de ADN en dos sencillas mediante alta temperatura (94°C); en el segundo, la temperatura se reduce para permitir el **alineamiento** de las moléculas iniciadoras o "primers" a la secuencia blanco o secuencia original del ADN; en el tercer paso se lleva a cabo la **elongación** o extensión (polimerización) de la molécula iniciadora, momento donde interviene la enzima *Taq* polimerasa que anexa a esta molécula los desoxirribonucleótidos necesarios para formar la nueva cadena de ADN; esta enzima tolera activa hasta 72°C de temperatura. Al término de dichos pasos se realiza un ciclo de amplificación y estos se repiten en un aparato llamado termociclador, el cual es un incubador pre-programado que cicla automáticamente. Las secuencias de ADN son amplificadas exponencialmente *in vitro* y pueden visualizarse por técnicas de tinción convencionales. En cada ciclo la cadena se duplica con respecto al ciclo previo; así, la concentración de moléculas de ADN de doble cadena colocadas inicialmente en el aparato serán 2^n moléculas, donde n = al número de ciclos realizados (Llaca, 1992).

En general, el procedimiento de trabajo en el laboratorio se debe efectuar con estricta precaución, sobre todo al preparar la mezcla de reacción, trabajar en un lugar limpio y de preferencia en la campana de flujo laminar para no contaminar la reacción con algún ADN extraño debido a la capacidad de

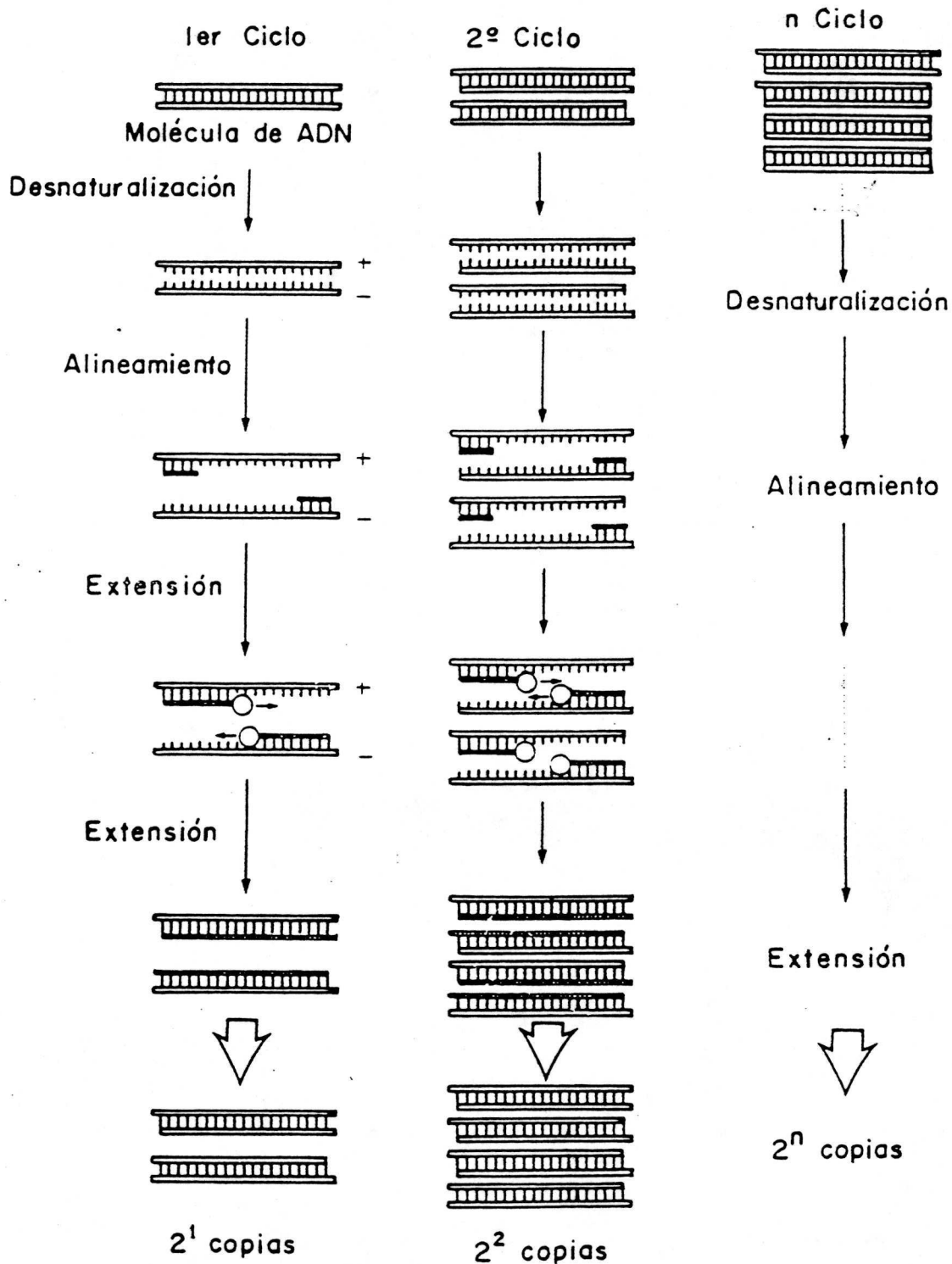


Figura 1. Secuencia de pasos realizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Fuente: Valadéz y Kalh, 1997

esta técnica de sintetizar millones de copias, lo que ocasionaría un problema claro. Probablemente la mayor virtud de la PCR es la sensibilidad para amplificar concentraciones bajas de ADN (nanogramos) en la reacción, e incrementar estos niveles a concentraciones altas a las cuales trabajan efectivamente las metodologías de los marcadores. Esta sensibilidad permite no sólo el uso de cantidades pequeñas de ADN, sino también de ADN degradado o impuro. Un ejemplo sería la detección de virus en millones de células en un tejido, o estudios con ADN de muestras fósiles o viejas.

Otras ventajas de la PCR son que es más económica y rápida que otras técnicas (RFLP, AFLP, etc.) y no incluye el uso de radioactividad, porque las moléculas marcadas con fósforo (^{32}P) presentan dificultades de manejo y síntesis, ya que tienen una vida media corta (14.3 días) y gran energía en su radiación β , altos costos de producción (Ureña y Dávila, 1983); tampoco requiere de hibridación, clonación molecular, etc.

2.6.3.1. Componentes de la PCR

Primer o molécula iniciadora: son secuencias cortas de ADN (oligonucleótidos) de una sola cadena, con pares de bases complementarias a una región pequeña del genoma, capaces de imitar *in vivo* e *in vitro* el comportamiento del ADN natural, y cuyo extremo final de la cadena tiene un enlace 3'-OH libre requerido por la ADN polimerasa para adicionar nucleótidos e iniciar la formación de la nueva cadena. Los iniciadores pueden generarse

artificialmente utilizando un sintetizador de ADN y son de tamaño pequeño (alrededor de diez pares de bases de longitud); aunque se sintetizan de cualquier tamaño, de 6 a 150 nucleótidos de longitud, se diseñan de acuerdo con la necesidad de cada trabajo. En ocasiones llevan nucleótidos con bases modificadas y generalmente van sin el grupo fosfato 5' terminal, lo que es importante porque con procedimientos sencillos pueden acoplarse a este extremo sustancias fluorescentes o radioactivas (Maldonado y Loren, 1989). La concentración a utilizar varía entre 0.05 y 1.0 μM para 100 μl de reacción, para 25 μl de reacción la concentración óptima está en 0.2 μM . El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos.

ADN polimerasa: es una enzima que cataliza el ensamble de desoxirribonucleótidos (dNTP's) en forma de trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a las moléculas iniciadoras o primers. Las más comunes se obtienen de bacterias termoestables como *Thermus aquaticus* resistentes a altas temperaturas ($> 90^{\circ}\text{C}$) a las cuales trabaja el termociclador. Se utilizan, además en de procesos de amplificación en la PCR, en trabajos de secuenciación y marcaje de ADN. A la fecha se han identificado por lo menos tres polimerasas diferentes, por mucho tiempo se creyó que la ADN polimerasa I era la enzima principal encargada de la unión mutua de los dNTP's. Ahora se sabe que la ADN polimerasa III es un agente polimerizante importante (Watson, 1983). La concentración de enzima comúnmente usada en PCR es alrededor de 2.5 unidades por 100 μl de reacción, cantidades menores limitan los productos

amplificados y el exceso produce amplificaciones no específicas (Saiki, 1992 citado por Avendaño, 1997). Lo importante es probar la cantidad adecuada a emplear en cada trabajo.

ADN: es extraído de cada organismos en estudio por diferentes métodos y se coloca en la mezcla de reacción a una cantidad que varía entre 25 y 70 ng, incluso más, esto depende de la especie u organismo de trabajo y la pureza y calidad del mismo. Este ADN se conoce con nombres diferentes como ADN genómico, templado, molde o blanco. La cantidad requerida por la PCR está sujeta a factores como su naturaleza (repetitivo, ADNcp, ADNmt, ADNsc), tamaño del genoma, calidad y pureza (alto peso molecular y libre de contaminantes como proteínas, ARN, y compuestos utilizados durante la extracción), entre otros (Llaca, 1992; Freyre, 1994).

Mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP's): toda reacción de PCR requiere de los nucleótidos que la ADN polimerasa incorporará a la molécula iniciadora, estos son: dATP, dCTP, dGTP y dTTP; los cuales se manejan a una concentración que varía de 50 a 200 μM de cada uno. Es probable que concentraciones altas provoquen falsas incorporaciones por la polimerasa; la óptima de dNTP's depende de la concentración de MgCl_2 , iniciador, y número de ciclos de la PCR. Lo común es de 200 μM por reacción.

MgCl_2 : la enzima para funcionar requiere una concentración óptima de 1.5 mM de iones de magnesio en la PCR; aunque puede variar de 0.5 a 5 mM. Es importante realizar pruebas empíricas de diferente concentración en la

mezcla de reacción, a fin de determinar la óptima. Este compuesto a veces viene incluido en el buffer de la enzima polimerasa.

Amortiguador: el amortiguador estándar para la PCR contiene 1.5 mM de MgCl_2 (no siempre viene incluido), 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 100 mg ml^{-1} de gelatina y un pH de 8.4.

El pH de la reacción también es importante, ya que el óptimo al que trabajan las enzimas está entre 7 y 8.3.

2.6.3.2. Condiciones del termociclado

Cada paso o ciclo de termociclado requiere del tiempo y temperatura conveniente para llevarse a cabo la amplificación completa de los fragmentos del AND, así como una mezcla de reacción adecuada con los componentes y concentraciones mencionados. El número de ciclos aplicado al proceso de amplificación varía dependiendo de la especie en estudio, pero en la mayoría de los trabajos programan entre 35 y 50 ciclos en total. A continuación se mencionan las condiciones apropiadas para cada paso del proceso de PCR:

Desnaturalización

Durante este paso las dos cadenas del ADN se separan al romperse los puentes de H que las une, esto sucede a temperatura entre 90-95°C por un tiempo de 1 a 5 minutos, lo común es 4 minutos a 94°C en un termociclador automático.

Alineamiento

Con la temperatura adecuada que va entre 36 a 60°C los iniciadores se alinean a la cadena del ADN molde. La temperatura conveniente de alineado depende de la longitud y el contenido de GC en los iniciadores.

Extensión

La temperatura de extensión que generalmente se utiliza es 72°C. La duración de este período depende principalmente de la longitud y concentración de la secuencia que se amplificará (Saiki, 1988, citado por Avendaño, 1997). El tiempo utilizado generalmente es de 2 a 5 minutos.

2.6.4. Técnicas basadas en la PCR

A partir de la PCR se han diseñado un gran número de metodologías para detectar los marcadores del ADN, como los citados a continuación:

2.6.4.1. Micro, mini y macrosatélites

En 1985, Alec J. Jeffreys y otros investigadores del Departamento de Genética de la Universidad de Leicester en Gran Bretaña, descubrieron secuencias cortas de ADN de diferente tamaño (2 a no más de 100 pb) repetidas varias veces en el genoma de eucariotes, lo que confiere polimorfismo suficiente a los organismos (Berumen, 1993; Jeffreys *et al.*, 1985).

citados por Lu *et al.*, 1996), ya que la unidad básica de estas repeticiones seriadas consiste de una cantidad pequeña de bases, las cuales están conectadas entre sí y forman una cadena de unidades repetidas. El polimorfismo mencionado está dado por el número diferente de unidades básicas conectadas. A estas regiones del genoma se les llama satélites: microsátélites, minisátélites y macrosátélites. Estas pequeñas secuencias de bases se repiten n veces en forma aleatoria a lo largo de los cromosomas; los microsátélites no sobrepasan los cinco pares de bases, los minisátélites tienen entre 10 y 20 pb, y los macrosátélites poseen más de 20 pb. Los genetistas han conseguido reconocer varias de estas secuencias y sintetizar a partir de ellas sondas radioactivas que son capaces de identificar estas secuencias hipervariables en el ADN y obtener las huellas génicas de los individuos en estudio a través de diferentes métodos (Coperías, 1995).

Los marcadores moleculares provenientes de este tipo de secuencias se han denominado como: secuencias simples repetidas (SSR del inglés Simple Sequence Repeats), secuencias repetidas en serie (STR del inglés Sequence Tandem Repeats) o incluso como STMS (Sequence Tagged Microsatellite Sites). Se han reportado muchas técnicas para revelar estos polimorfismos; algunas guardan similitudes entre sí, aunque, dentro de las más relacionadas se tienen a los SSR-PCR, ISSR-PCR (Inter- SSR), MP-PCR (PCR iniciada por microsátélites) y STS-PCR.

La técnica MP-PCR utiliza secuencias de microsátélites para amplificar regiones genómicas entre dos sitios que tienen unidos dos iniciadores

complementarios a los microsatélites. Permite la amplificación de esta región de ADN localizada entre dos microsatélites. Los productos amplificados son separados por electroforesis, son patrones altamente estables y reproducibles, pero muestran menos polimorfismos con respecto a las huellas generadas cuando se amplifican microsatélites como sondas (Valadéz y Kahl, 1997).

Los ISSR-PCR y STS-PCR son modificaciones a la técnica anterior. Los ISSR es un método desarrollado por Zietkiewicz *et al.* (1994) en el cual la secuencia simple repetida es el iniciador para la PCR, un iniciador específico terminal se ancla a un SSR particular utilizado para amplificar el ADN entre dos SSRs opuestos, los polimorfismos ocurren cuando un genoma tiene ausente uno de los SSRs o tiene una inserción-delección que modifica la distancia entre repeticiones (Ramakrishna *et al.*, 1995 y Yang *et al.*, 1996). Es más recomendable para estudios de microevolución y no para clasificación varietal. Los STS fueron reportados y aplicados por Olson *et al.* (1989), Talbert *et al.* (1994) y Chen *et al.* (1994); igual consisten en desarrollar primers basados en secuencias de sitios marcados de la especie en estudio. Un STS es una secuencia corta y única, amplificada por la PCR que identifica una zona conocida en un cromosoma, frecuentemente consta de 20 nucleótidos, por lo que es más estable y menos afectada por las condiciones de reacción o amplificación.

Los SSR-PCR son microsatélites del genoma que se componen de un grupo repetido de 2 a 5 nucleótidos, como: (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n, etc., y son una fuente abundante de marcadores de ADN que son codominantes siguiendo

la herencia Mendeliana. Estos son amplificados por la PCR utilizando primers flanqueadores de esos microsatélites (Senior *et al.*, 1996). La variación en el número de series repetidas (n) es lo que da como resultado los productos de diferente tamaño o el polimorfismo buscado para identificar a los individuos. El uso de los SSR se ha incrementado sobre todo para proyectos de mapeo en plantas, porque son altamente polimórficos, son codominantes y abundantes en el genoma de plantas (Beckmann y Soller, 1990; Roder *et al.*, 1995).

Las desventajas de trabajar con marcadores basados en secuencias satélites son el requerimiento de librerías genómicas y clones secuenciados para diseñar dichas sondas que permitirán su amplificación en el genoma (Hartl y Seefelder, 1998). También se tiene problema cuando la cantidad de ADN disponible es escasa y poco puro; aunque con el uso de la amplificación enzimática del ADN o de la PCR, este aspecto puede solucionarse. En general estas metodologías requieren de secuenciar la(s) zona(s) que se desee amplificar para diseñar los iniciadores apropiados para cada especie u organismo de estudio.

2.6.4.2. RAMPO

La técnica RAMPO significa amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites, del inglés Random Amplified Microsatellite Polymorphisms, fue descrita por Morjane *et al.* (1994) y Richardson *et al.* (1995). Combina a los RAPD (técnica que utiliza moléculas iniciadoras aleatorias y sintéticas) con

hibridación de microsatélites como sondas, para producir varias huellas genéticas polimórficas e independientes en un único gel electroforético. La técnica inicia con la amplificación del ADN genómico con un iniciador aleatorio sintético (RAPD). Después se separan electroforéticamente y se tiñen los productos de la PCR, el gel se seca o se transfiere a una membrana de nylon, y una subsecuente hibridación con una sonda de oligonucleótidos complementario al microsatélite. La autoradiografía obtenida es una huella génica polimórfica y reproducible, la cual no corresponde a los patrones teñidos en el gel y puede ser diferente al usar sondas distintas.

Con esta prueba se generan patrones de bandas que revelan huellas génicas variables entre genotipos cercanamente relacionados.

2.6.4.3. AFLP

El procedimiento para generar los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) es un método que combina tres metodologías: la de PCR, RFLP y RAPD, y consiste en la amplificación de una subserie de fragmentos de restricción seleccionados del genoma total digestado y detectados por amplificación usando la PCR.

El ADN se corta con la combinación de dos enzimas de restricción (una de corte preciso y la otra de corte discontinuo) y las terminaciones de estos fragmentos de ADN se ligan a adaptadores especiales o secuencias de bases específicas. De esta manera, la secuencia de los sitios de restricción ligados

sirve como sitio obligatorio para la subsecuente amplificación a los mismos fragmentos de restricción, utilizando iniciadores que son homólogos de estos adaptadores.

Para disminuir la cantidad de bandas reveladas (10 a 100 fragmentos dependiendo del contexto de la secuencia del nucleótido selectivo) y facilitar su interpretación, a los iniciadores se les adiciona de una a tres bases o nucleótidos selectivos en el extremo 3' y así se realizará una amplificación también selectiva (Caetano - Anolles *et al.*, 1991; Hartl y Seefelder, 1998).

Los AFLP son una técnica nueva de marcadores con gran potencial para detectar un alto nivel de polimorfismo, obtener mapas genómicos más rápido debido a que puede analizarse gran cantidad de marcadores en un tiempo corto, y el perfil de bandeo obtenido es reproducible. La mayoría de los autores la han utilizado para estudios de filogenie. Lu *et al.* (1996) citan otra variante a la que llaman AFLP-microsatélites, y la proponen para estudios de diversidad genética. Las desventajas más claras son el alto costo de la técnica y lo laborioso de la misma.

2.6.4.4. RAPD

Los trabajos iniciales basados en la PCR mostraron la limitante de requerir conocer al menos una mínima cantidad de datos de la secuencia genómica del loci de interés, que permita la síntesis de los iniciadores apropiados. Estas limitaciones fueron superadas con la nueva técnica de

amplificación aleatoria de ADN: RAPD (del inglés Random Amplified polymorphic DNA), que es una amplificación enzimática diferencial de fragmentos pequeños de ADN con iniciadores de oligonucleótidos de secuencia de pb arbitraria en la PCR.

En 1990, dos grupos independientes simultáneamente describieron la técnica de estudio de los polimorfismos de ADN. Un grupo de DuPont definió las aplicaciones del mapeo genético y llamó al método RAPD (Williams *et al.*, 1990). Otro grupo de California (Rafasli *et al.*, 1991) del Instituto de Investigaciones Biológicas enfocaron la investigación al estudio de las huellas genómicas y la denominaron técnica con primers arbitrarios PCR (AP-PCR). Ambos métodos se basan en los mismos principios y son más conocidos como RAPD. La técnica es rápida, fácil de realizar, comparativamente barata, y se aplica a diferentes organismos.

Procedimiento

El procedimiento de los RAPD es relativamente rápido y sencillo, sólo se emplean pequeñas cantidades de ADN sin que necesariamente sea puro (15-25 ng), no requiere de manejo de radioactividad, ni de la transferencia tipo Southern como los RFLP.

La técnica se basa en una secuencia simple y corta de oligonucleótidos sintéticos (iniciadores o primers) seleccionados al azar. Cuando se mezclan con el ADN genómico y la polimerasa termoestable, y son sometidos a la

reacción de PCR, se inicia la amplificación de varios de estos fragmentos. Los productos de la amplificación se separan en geles de agarosa estándar por electroforesis y visualizados con tinción de bromuro de etidio bajo luz UV.

La naturaleza de los fragmentos amplificados depende de la secuencia del iniciador y del ADN del genoma en estudio. Un iniciador generalmente amplifica varias bandas localizadas en diferente lugar del genoma. Los iniciadores utilizados para esta técnica son los que tienen 10 oligonucleótidos de longitud con un contenido promedio de 50% de bases G y C (Freyre *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1994).

Los RAPD suceden cuando dos o más muestras distintas tienen patrones diferentes. El polimorfismo obtenido es utilizado como un marcador molecular para diferentes propósitos.

La naturaleza molecular exacta de los polimorfismos detectados en la secuencia del ADN con RAPD no ha sido conocida, pero se cree que los cambios localizados en la secuencia del ADN (polimorfismos) se deben a inserciones o deleciones de pequeños segmentos de bases en el genoma.

Comparación de los RAPD con otras técnicas basadas en el ADN

En la mayoría de las técnicas como RFLP, AFLP, VNTR, etc. se practica el marcage radioactivo del ADN y la hibridación, lo cual requiere de varios miligramos de ADN digerido con endonucleasas de restricción; y el manejo de radioactividad como el ^{32}P , el cual presenta problemas en su almacenado, ya

que se debe realizar bajo condiciones especiales, de lo contrario se inactiva fácilmente, además de ser sumamente peligroso para el hombre.

A diferencia, los RAPD no requieren del uso de primers específicos, la cantidad de ADN genómico necesario es 100 veces menor que con AFLP. Las bandas amplificadas no son cortadas con una endonucleasa de restricción y se observan directamente en los geles de agarosa teñidos, con bromuro de etidio (el cual es cancerígeno pero más fácil de manejar y almacenar) y se archivan electrónicamente o con fotografía.

Limitantes de la técnica

Los marcadores RAPD requieren que una cantidad considerable de individuos y loci muestreados, comparados con marcadores codominantes tales como RFLP e isoenzimas; y además la baja homología entre fragmentos co-emigrantes de diferentes especies, es probable que limite su aplicación en estudios filogenéticos a nivel interespecífico (Chan y Sun, 1997).

Halldén *et al.* (1996) citan como limitantes las siguientes: La reproducibilidad de los patrones de bandas es baja, debido a que la técnica es sensible a la variación de las condiciones experimentales. Los marcadores generados son comúnmente dominantes. Tienen baja información comparados con marcadores codominantes en análisis de ligamiento de poblaciones F_2 .

Skroch y Nienhuis (1995) evaluaron el impacto del grado de error y reproducibilidad de los datos RAPD en las estimaciones de la distancia

genética, y reportaron un 2% de error, y una reproducibilidad del 76% (porcentaje de bandas RAPD manifestadas y replicadas en otras amplificaciones), este porcentaje lo atribuyeron a la fuerte dependencia de la uniformidad a las condiciones de amplificación entre experimentos. Para mejorar la reproducibilidad de los datos se debe seleccionar los iniciadores con base en la reproducción de la información que ellos generen.

Trabajos realizados con los RAPD

De Bustos *et al.* (1998) estudiaron la variación genética de 102 poblaciones de cebada silvestre nativas de España, incluyendo un material anual y uno perenne. Realizaron análisis con RAPD entre y dentro de poblaciones, especies y subespecies. Los iniciadores originaron un total de 250 productos amplificados. El nivel de polimorfismo detectado varió entre unidades taxonómicas dependiendo de los iniciadores incluidos y el sistema reproductivo de la planta. En general, la mayor variación fue entre especies alógamas. Los resultados demostraron diferencias en el grado de similaridad entre unidades taxonómicas. Las poblaciones se dividieron en tres grupos.

Martínez (1997) investigó las diferencias y semejanzas genéticas de seis materiales de maíz a nivel molecular, utilizando las huellas genómicas de cada material generadas por la técnica de los RAPD con cinco iniciadores. Encontró la formación clara de grupos separados de acuerdo al control de la polinización en los materiales.

Lerceteau *et al.* (1997) emplearon los marcadores RAPD y RFLP para evaluar las relaciones genéticas dentro de especies de *T. cacao* y valoraron la organización de esta diversidad genética. La variabilidad genética se estimó con 18 primers y 43 sondas para los RFLP en 155 árboles de cacao pertenecientes a grupos morfológicos y orígenes geográficos diferentes. La matriz de distancias genéticas, mostró estimaciones de acuerdo con las relaciones de parentesco entre genotipos.

Rusell *et al.* (1997) determinaron las relaciones genéticas entre 18 materiales de cebada cultivada, a través de los RFLP, AFLP, RAPD y SSR y compararon los resultados con las relaciones de pedigree. Las cuatro técnicas difirieron en la cantidad de polimorfismos detectados. Los 13 primers SSR fueron polimórficos, y cerca del 54% de los fragmentos generados mediante AFLP fueron monomórficos. La distancia genética mayor se observó con los AFLP (0.937) y las más bajas con RFLP (0.322).

Chan y Sun (1997) examinaron la diversidad y relaciones genéticas de 23 especies cultivadas y silvestres de amaranto con marcadores RAPD e isoenzimas. Detectaron un total de 30 loci con 15 enzimas y fueron polimórficos a nivel interespecífico. Los grados más altos de diversidad genética inter poblacional se encontraron dentro de especies. De los 600 fragmentos RAPD generados con 27 primers, 39.9% fueron polimórficos entre poblaciones dentro de cada especie cultivada.

Lakshmi *et al.* (1997) utilizaron los RAPD y RFLP para evaluar variación genética intra e inter específica en especies de mangle. Los 48 genotipos

estudiados representaron 8 poblaciones diferentes. Se detectó un bajo nivel de polimorfismo intra-poblacional con ambos marcadores. A nivel inter-poblacional, fueron polimórficos 25 de 73 loci RAPD (34%) detectados por 13 iniciadores, y 44 de 96 loci RFLP (45.8%) revelados con 15 combinaciones sonda-enzimas.

Golembiewski *et al.* (1997) evaluaron el potencial de los marcadores RAPD para la identificación de 13 cultivares sintéticos de pasto rastrero; ocho de los 50 iniciadores probados produjeron fragmentos polimórficos que identificaron 11 de los 13 cultivares de pasto y concluyeron que los RAPD son una herramienta importante para la identificación de cultivares sintéticos.

Tatineni *et al.* (1996) estudiaron la diversidad genética en germoplasma élite de algodón determinada por características morfológicas y RAPD, en 16 genotipos derivados de hibridación interespecífica y a nivel fenotípico definido por caracteres morfológicos estables y altamente heredables. La clasificación basada en los dos métodos originó resultados similares con una correlación de 0.63 entre distancias genéticas y taxonómicas.

Lee *et al.* (1996) detectaron la diversidad genética en 39 colectas de sandía usando RAPD y análisis de azúcares. Se originaron 4 grupos y cada uno fue diferenciado e identificado con caracteres morfológicos y genéticos. La concentración de azúcares se midió con HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución). Concluyeron que los RAPD proveen un marcador alternativo para identificar genotipos y caracteres cuantitativos.

Lu *et al.* (1996) realizaron un análisis comparativo de la diversidad genética en 10 genotipos de chícharo evaluados por RFLP y métodos basados en la PCR (RAPD, AFLP, AFLP-Microsatélite, e ISSR). Los métodos basados en la PCR fueron más informativos que los RFLP con ADNc.

Ahmad *et al.* (1996) estudiaron las relaciones genéticas en lenteja y determinaron el parentesco de sus híbridos interespecíficos usando marcadores RAPD. Utilizaron 14 iniciadores que generaron 158 fragmentos. El estudio reveló que el nivel de variación genética intraespecífica en lentejas cultivadas es más corta que en especies silvestres.

Maaß y Klaas (1995) utilizaron las isoenzimas y marcadores RAPD para analizar y estructurar una colección de 300 accesiones de ajos (*Allium ssp.*) y propusieron una clasificación intraespecífica de 4 grupos principales. El origen y distribución del cultivo lo discutieron de acuerdo con la distribución geográfica y a las distancias genéticas de las accesiones.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del área de trabajo

La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Interinstitucional de Investigación en Biotecnología Aplicada UACH-INIFAP, ubicado en el Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX), perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP).

3.2. Material vegetal

El material vegetal estudiado consistió de diez variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Provenientes del programa de Mejoramiento genético del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

1. Silvestre autocompatible
2. Silvestre autoincompatible
3. Milpero
4. Manzano
5. Arandas
6. Tamazula
7. Rendidora
8. CHF1-Chapingo
9. Salamanca
10. Puebla

La investigación se realizó en dos fases: una de campo (invernadero) ubicado dentro de la Universidad (UACH) y la otra en el laboratorio de Biotecnología.

3.3. Fase de campo

3.3.1. Siembra y cuidado del material vegetal

Esta primera parte de la investigación consistió en obtener el tejido vegetal (hojas) sano para extraer la mejor calidad de ADN para su posterior análisis en el laboratorio. Por lo que se procedió a realizar la siembra y cuidado del material vegetal en el invernadero ubicado en la Universidad Autónoma Chapingo, donde se efectuaron las actividades siguientes:

- La siembra se llevó a cabo el 13 de octubre de 1996 en germinadores de poliestireno de 200 cavidades, una variedad en cada charola. El sustrato utilizado fue Peat-moss.

- El trasplante se realizó el 23 de noviembre, 40 días después de la siembra, en bolsas de polietileno de 6 kg diseñadas para cultivo en sistema hidropónico, colocando una planta por bolsa y 30 plantas o macetas por cada variedad de tomate de cáscara, el sustrato empleado fue tezontle rojo.

- Manejo. Las charolas se regaron diariamente, 20 días después de la siembra se le proporcionaron 4 riegos con solución nutritiva y una fertilización foliar. Posterior al trasplante los riegos se realizaron con la solución nutritiva cada tercer día. El control de plagas y enfermedades se efectuó constantemente hasta que las plantas y el follaje desarrollaron lo suficiente

para llevar a cabo la colecta de las hojas, esto sucedió mes y medio después del trasplante.

3.3.2. Colecta del material vegetal

Esta actividad se realizó durante dos semanas, e inició el 15 de enero de 1997. Consistió en colectar por separado las hojas jóvenes y sanas de cada planta, las que se cortaron de la base o peciolo con tijeras y se guardaron en bolsas de malla de fibra de vidrio previamente etiquetadas, identificadas por planta y variedad; estas bolsas se doblaron y amarraron con ligas, para transportarlas al laboratorio en una hielera donde se cuidó que no hubiera contacto directo del tejido con el hielo para evitar quemaduras de éste. Era importante mantener las muestras frías hasta congelarlas, ya que el ADN es degradado rápidamente por enzimas endonucleasas que se encuentran naturalmente en las células y enseguida de que el tejido se cosecha, éstas entran en acción (Salinas *et al.*, 1996).

3.4. Fase de laboratorio

Esta fase inició con el almacenado y congelado del material vegetal y finalizó con la obtención de las fotografías correspondientes al patrón de bandas de cada material vegetal estudiado.

3.4.1. Congelado del material vegetal

Las muestras de tejido vegetal se conservaron congeladas con nitrógeno líquido (detiene los procesos fisiológicos sin causar daño), lo que se realizó en una hielera de unicel de tamaño medio. Dentro se colocaron aproximadamente 20 muestras y se bañaron con el nitrógeno líquido procurando que se impregnaran lo mejor posible; al final se guardaron dichas muestras en cajas de cartón y colocaron dentro del ultracongelador a -70°C , donde permanecieron hasta el liofilizado.

3.4.2. Liofilizado

Este es un proceso de deshidratado del tejido por sublimación. Las muestras congeladas se transfirieron al liofilizador, el cual debe encenderse con anticipación, para tener la cámara a temperatura baja (-55°C) y producir un vacío adecuado de ≤ 100 micrones. El deshidratado se llevó a cabo en tres días, después el aparato se dejó enfriar un día para volver a utilizarlo. Es importante saturar los frascos del liofilizador. Una vez deshidratadas las muestras se guardaron en bolsas de plástico para evitar que se humedecieran y se volvieron a colocar en el ultracongelador hasta la molienda.

3.4.3. Molienda

La molienda se realizó en un molino eléctrico (marca THOMAS CIENTIFIC, Serie: 900501) hasta obtener un polvo fino, entre más fino mayor será la cantidad de ADN obtenido. Cada muestra se molió de forma individual y

se envasó en frascos de cristal tipo vial previamente lavados, etiquetados y esterilizados. El tejido así obtenido se guardó nuevamente en refrigeración ($\pm 4^{\circ}\text{C}$).

3.4.4. Extracción y aislamiento del ADN genómico

El procedimiento de extracción del ADN se cita completo en el Anexo 1A y la preparación de los reactivos utilizados en el Anexo 2A. Se extrajo el ADN del tejido liofilizado de cada una de las 30 plantas colectadas por material de tomate de cáscara; la técnica empleada fue la modificada por Edwards *et al.* (1991).

Durante la separación del ADN de los otros componentes celulares, primero hay que permitir su salida de la célula sin que sea dañado, para lo cual la membrana celular se desestabiliza aplicando soluciones con propiedades detergentes como el SDS, quelatos como el EDTA y el EGTA. El ADN sale acompañado de ARN, otros organelos y sustancias; para purificarlo se aplicó un buffer de extracción con CTAB como componente, el cual se pega al ADN y desplaza las proteínas. Este compuesto se removió del ADN con lavados de cloroformo. También se aplicó cloruro de sodio (NaCl), que en cierta concentración destruye los enlaces electrostáticos entre proteínas y el ADN. El ARN acompañante se hidrolizó con la enzima ARNasa agregada a la muestra.

3.4.5. Cuantificación de la concentración y pureza del ADN

Después de la extracción del ADN se evaluó la pureza y la concentración de los ácidos nucleicos de cada muestra obtenida ya que si este

va contaminado los resultados no son confiables. La cuantificación de la pureza del ADN se realizó con luz UV a través de su absorbancia por los ácidos nucleicos (espectrofotometría), dicha medición se efectúa a una absorbancia de 260 nm.

La relación entre la lectura de 260 y 280 nm, aporta una estimación de la pureza de los ácidos nucleicos. Las preparaciones más puras de ADN y ARN tienen valores de 1.8 a 2.0. Si existe contaminación con proteínas o fenol, los valores citados son diferentes.

Para este trabajo la evaluación se efectuó en un espectrofotómetro DU-65 de Beckman diseñado para la cuantificación de un número considerable de muestras, el cual se encuentra en el Laboratorio de Biología Molecular del CIMMYT en Texcoco, Estado de México. El procedimiento se cita en el anexo del manual del Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT (Hoisington *et al.*, 1994). Las muestras se diluyeron con TE a $0.3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN, después de diluir estas muestras se formaron alícuotas de cada una a concentración de $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ de ADN para su uso definitivo.

3.4.6. Estandarización de las condiciones de PCR

Es importante efectuar diversas pruebas antes de llevar a cabo las amplificaciones definitivas para generar los RAPD, con el fin de economizar tiempo y reactivos, así como adquirir suficiente destreza en el manejo del equipo y material que son delicados. El procedimiento general de los RAPD se cita en el Anexo 3A.

Uno de los aspectos más importantes de cuidar es la asepsia, pues cualquier contaminante por mínimo que sea puede interferir seriamente en la amplificación o evitar que ésta suceda. Por ello, se esterilizó el material (tubos, puntas, aceite mineral, etc.) y los reactivos se prepararon con agua bidestilada esterilizada previamente en la autoclave, además de emplear guantes de cirujano a lo largo del proceso.

Se evaluaron diversos programas de termociclaje (Cuadro 2), diferente número de ciclos, temperaturas apropiadas y tiempos de duración, para buscar el que proporcionara los mejores productos amplificados (bandas mejor diferenciadas y nítidas). El termociclador utilizado fue de la marca TECHNE, PHC-2.

La concentración del ADN genómico, enzima Taq polimerasa y $MgCl_2$ son específicos para cada especie de plantas, por lo que se realizaron experimentos para probar diferentes concentraciones de cada componente. En el Cuadro 5 del apartado de resultados, se muestran pruebas realizadas con tres marcas de enzima (Perkin Elmer, Bioselec y Fisher) variando sólo los componentes más importantes; estas pruebas se llevaron a cabo utilizando como testigo muestras de frijol y enzima de la marca Perkin Elmer, con las cuales ya se habían obtenido amplificaciones en experimentos previos.

La enzima Taq usada para este trabajo fue de la marca Bioselec, ya que es una de las más económicas que existen en el mercado. Se probó la totalidad de los lotes que se adquirieron (ya que se requiere ajustar los componentes de la mezcla de reacción con base también en la marca y lote de enzima que se

disponga), encontrando que uno de los cinco no produjo amplificaciones. Las concentraciones probadas fueron de 0.15, 0.18, 0.20, 0.25, 0.28, 0.30 y 0.40 unidades por μl ($\text{U } \mu\text{l}^{-1}$).

Cuadro 2. Programas probados en el termociclador para realizar la amplificación de los fragmentos de ADN por la PCR.

FECHA	PROGRAMA
09-VI-97	1 ciclo 94°C/3 min 3 " 94°C/1 min, 35°C/1 min, 72°C/2 min 31 " 94°C/10 s, 40°C/20 s, 72°C/2 min 1 " 72°C/5 min
10-VI-97	1 ciclo 94°C/3 min 34 " 94°C/1 min, 36°C/1 min, 72°C/2 min 1 " 72°C/7 min
11-VI-97	1 ciclo 94°C/5 min 34 " 94°C/1 min, 36°C/30 s, 72°C/2 min 1 " 72°C/2 min
12-VI-97	1 ciclo 94°C/4 min 40 " 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min 1 " 75°C/2 min
14-VI-97	1 ciclo 94°C/2 min 3 " 94°C/1 min, 35°C/1 min, 72°C/2 min 32 " 94°C/10 s, 35°C/30 s, 72°C/1 min 1 " 72°C/5 min
18-VI-97	1 ciclo 94°C/1 min 38 " 94°C/30 s, 35°C/30 s, 72°C/1.5 min 1 " 94°C/15 s, 35°C/30 s, 72°C/1.5 min 1 " 72°C/5 min
23-VI-97	1 ciclo 94°C/3 min 3 " 94°C/1 min, 36°C/1 min, 72°C/2 min 38 " 94°C/10 s, 40°C/20 s, 72°C/2 min 1 " 72°C/5 min
2-VII-97	1 ciclo 94°C/3 min 3 " 94°C/1 min, 36°C/1 min, 72°C/2 min 34 " 94°C/10 s, 40°C/20 s, 72°C/2 min 1 " 72°C/5 min

Abreviaturas: min = minuto, y s = segundo

Las cantidades de ADN genómico (por planta o genotipo) probadas por muestra fluctuaron entre 20 y 160 ng en la mezcla de reacción. Las concentraciones de $MgCl_2$ probadas fluctuaron entre 50 a 75 mM y la utilizada fue de 60 mM; su presentación comercial es 30 mM.

Se probaron 17 iniciadores: OPA-14, OPA-16, OPAC-16, OPAE-19, OPB-06, APD-11, OPF-10, OPK-12, OPK-14, OPK-16, OPI-09, OPQ-09 y OPV-06 de la marca y compañía OPERON Technologies, con el fin de elegir los que mostraran mejor perfil de bandas y nitidez. También se incluyeron algunos sintetizados en la UNAM, como UNAM-1, UNAM-4, UNAM-17 y UNAM-22. En el Anexo 5A se describen las principales características de los iniciadores elegidos.

3.4.7. Mezcla o cocktail de reacción

La mezcla de reacción es el conjunto de componentes necesarios para que el proceso de amplificación del ADN se complete adecuadamente en el termociclador. Al respecto se realizaron diversos ensayos ya mencionados para probar las cantidades y concentraciones óptimas de estos componentes, las que se muestran en el Cuadro 4 de los resultados. El volumen total de reacción utilizado fue de 25 μ l por muestra.

Una muestra es una mezcla de reacción individual que se somete a amplificación y lleva la cantidad necesaria de ADN blanco correspondiente a una planta o genotipo de las 20 o 25 utilizadas por cada material vegetal estudiado; es importante aclarar que no todas estas muestras amplificaron.

3.4.8. Análisis de los productos amplificados

A. Electroforesis

Tan pronto como concluyó el proceso de amplificación de las muestras de ADN, se retiraron del termociclador y se guardaron en refrigeración donde pueden permanecer por varios días sin sufrir alteración alguna; o de lo contrario se sometieron al último paso que es la separación de los fragmentos amplificados (electroforesis) en un gel de agarosa de 12 x 14 cm al 1.4% y posterior visualización con luz UV por tinción con BrEt. El procedimiento general de electroforesis se describe en el Anexo 4A.

B. Tinción

Cuando el colorante azul (buffer de carga) que sirve para monitorear el avance de los fragmentos del ADN se encontraba a una distancia de por lo menos un centímetro de la orilla opuesta a los pozos del gel, se desconectó de la fuente de poder y el portageles con el gel se retiró para introducirlo en un recipiente, que contenía bromuro de etidio a concentración de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, durante 20 minutos en oscuridad y agitación suave constante. Después de este tiempo, el gel se enjuagó en una charola con agua destilada estéril por diez minutos y se observó exponiéndolo a la luz ultravioleta en el transiluminador. Por último, esta información se archivó, tomando la fotografía correspondiente bajo condiciones especiales (citadas en el siguiente apartado y en resultados).

Después de esto el gel se desechó en un lugar especial para guardar residuos tóxicos. Este paso se realizó con doble guante y careta de protección.

C. Fotografía

Generalmente la información se archiva en fotografías instantáneas tipo Polaroid, pero resulta costoso debido a que la película es cara y el rollo presenta pocas exposiciones; así que, se efectuaron diversas pruebas (Cuadro 3) para obtener fotografías blanco y negro de revelado normal que son económicas, y se probó la velocidad de exposición, apertura de diafragma y tipo de papel para impresión; para lo cual se utilizó una cámara fotográfica marca Minolta con lentillas de acercamiento del número 4 y filtro color naranja.

Cuadro 3. Condiciones probadas para la toma de fotografías.

Abertura de diafragma	Velocidad (seg.)
2	1
4	1
4	2
6	1
8	1
8	2
11	1
11	2

3.5. Análisis estadístico

3.5.1. Datos moleculares

Para el análisis de los resultados moleculares se utilizó el paquete computacional especialmente diseñado para el análisis estadístico de trabajos con marcadores de ADN llamado RAPDistance Package, Versión 1.04 (Gibbs *et al.*, 1995) obtenido del INTERNET, el cual contiene varios subpaquetes con diversas aplicaciones. Aquí se formó la matriz con los datos codificados en presencia (1) y ausencia (0) de las bandas de ADN amplificadas y se calculó la frecuencia de aparición de cada banda registrada, obteniéndose así la matriz de las distancias genéticas entre los materiales (Cuadro 6) utilizando el programa de similitud SIMGEND (Similaridad para datos genéticos) y coeficiente de Nei's (1978) con el paquete computacional llamado Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc), Versión 1.80 (Rolf, 1993); por el método de agrupamiento NJOIN (Neighbor-Joining) se construyeron los dendogramas de agrupamiento correspondientes.

La información vertida en RAPDistance se codificó en términos numéricos (código binario). Estos datos se obtuvieron de la identificación de cada banda por muestra de las 10 seleccionadas dentro de las que amplificaron en cada material vegetal (fotografía por gel); estas muestras se seleccionaron en base a la claridad y nitidez de sus productos amplificados.

3.5.2. Datos morfológicos

Estos datos se obtuvieron de evaluaciones realizadas en diversas parcelas experimentales sembradas con el material vegetal estudiado, ubicadas en la zona aledaña a la Universidad (UACH). Para su análisis comparativo de agrupamiento se utilizó el mismo paquete computacional NTSYS-pc, utilizando el método de agrupamiento SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical and Nested) con el que se construyó el respectivo dendograma de agrupamiento, obtenido con el método UPGMA (Unweighted pair-group); basado en los promedios aritméticos de los caracteres de la planta evaluados.

Los datos promedio analizados fueron en base a caracteres de flor, fruto y semilla como: diámetro y longitud de flores; peso, longitud, ancho y volumen de fruto; número de semilla por fruto, peso de cien semillas; peso promedio de frutos por planta, número de frutos totales por planta; rendimiento promedio por planta y grado de acidez de los frutos (Cuadro 7).

3.5.3. Cálculo del índice de variabilidad genética intra-varietal

El índice de variabilidad genética (IVG) es un indicador de la diversidad genética existente dentro de cada población de plantas; se calculó a partir de la matriz de código binario obtenida de los datos moleculares con el paquete RAPDistance, a la que se aplicó la siguiente fórmula propuesta por Montero *et al.* (1998):

$$H_p = \sum_{hp=1}^n h_p / p$$

$$h_p = \frac{2n \left[\left(\sum_{p=1}^n V_m/V_M \right) / B \right]}{2n-1}$$

Donde: h_p = Índice de variabilidad genética de cada población por primer

H_p = Índice de variabilidad genética promedio de cada población
para todos los primers

p = Número total de primers

n = Número total de individuos

V_m = Cantidad menor de 0's ó 1's en todos los individuos de una
población definidos para una banda de ADN dada

V_M = Cantidad mayor de 0's ó 1's en todos los individuos de una
población definidos para la misma banda que V_m

B = Número total de bandas por primer

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados moleculares

4.1.1. Estandarización de las condiciones de amplificación

En todo trabajo de investigación donde se involucre el uso de la PCR es necesario realizar ensayos preliminares para determinar las condiciones óptimas de amplificación de los fragmentos de ADN, con el fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados y economizar tiempo y reactivos que son de altos costos.

En el Cuadro 4 se muestran las condiciones de reacción óptimas utilizadas en la amplificación de los fragmentos de ADN en el proceso de PCR, el volumen total manejado en la mezcla de reacción fue de 25 μ l, la cual se forma de siete componentes principales utilizando de éstos las cantidades y concentraciones indicadas en dicho cuadro. En cualquiera de estos trabajos, primero se determinan y ajustan las concentraciones óptimas de enzima, $MgCl_2$ y ADN nativo o genómico, lo que varía en función de la especie u organismo a estudiar; los otros componentes no representan problema utilizarlos a las cantidades recomendadas. En el Cuadro 5 se ilustran las primeras pruebas realizadas con el fin de determinar las condiciones anteriores, utilizando frijol con enzima Perkin Elmer como testigos; después de ajustar las concentraciones de $MgCl_2$ y ADN genómico se obtuvieron los primeros productos amplificados con la enzima Bioselec. Otras pruebas se efectuaron

para ajustar y minimizar estas primeras cantidades, principalmente de enzima que es uno de los reactivos más caros utilizados, por lo que se probaron concentraciones de 0.15 a 0.40 U μl^{-1} de enzima por reacción y en todas las pruebas se obtuvieron productos amplificados, por lo que se utilizaron las concentraciones más bajas (0.18 y 0.2 U μl^{-1}), y entre 100 y 120 ng de ADN genómico, lo que se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Cantidad y concentración óptima de cada componente en la mezcla de reacción para la PCR.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD EN μl
ddH ₂ O	-	10.8
Buffer PCR 10X	1X	2.5
MgCl ₂ 20x (30 mM)	60 mM	2.0
dNTP's (2.5 mM)	200 μM c/u	2.0
Primer: (10 μM)	15 μM	1.5
ADN nativo (20 ng μl)	120 ng	6.0
Taq Polim. (5 U μl^{-1})	1 U	0.2
Volumen Total	-	25

A la par se probaron diferentes programas y ciclos de amplificación en el termociclador con el fin de seleccionar el mejor a utilizar (el que originara los mejores productos amplificados o bandas más claras y nítidas), en el Cuadro 2

del apartado 3.4.6 se muestran éstos, obteniéndose resultados positivos con los dos últimos programas probados y adoptados.

Cuadro 5. Prueba de amplificación con tres marcas de enzima y concentración de ADN nativo en tomate de cáscara y frijol.

COMPONENTES	Frijol	Tomate					
ddH ₂ O (μl)	11.7	11.7	11.7	11.7	6.7	8.7	8.6
Buffer 10x (μl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂ 20x (30 mM)	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
dNTP's (2.5 mM)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Primer:							
OPK-12 (10 μM)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
ADN nativo (ng μl ⁻¹)	2.0	2.0	2.0	2.0	4.0	4.0	4.0
Taq Polimerasa (U μl ⁻¹)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
Volumen Total (μl)	25	25	25	25	25	25	25
Marca de enzima	P. E.	Bios.	Bios.	P. E.	Bios.	Fisher	Fisher
Result. De electrof.	+	-	-	+	+	+	+

Nota: - Las cantidades de los componentes están expresadas en μl y en concentración final por cada μl de mezcla de reacción.
 - En la última columna, los resultados de la electroforesis + ó - significa si hubo productos amplificados o no.

Las pruebas de fotografía fueron de las últimas realizadas y las mejores condiciones obtenidas fueron con impresión en papel ILFORD grado 3 y brillante, película blanco y negro tipo Tris X PAN ASA 400, abertura de

diafragma 8 y un segundo en tiempo de exposición; debe utilizarse lentillas de acercamiento y filtro color naranja para mejores resultados de nitidez de las bandas en la fotografía.

4.1.2. Resultados moleculares y análisis

Se probaron 17 iniciadores, 11 de la marca OPERON Technologies y 4 sintetizados en la UNAM (citados en materiales y métodos), de los cuales se seleccionaron los que originaron mejores productos amplificados, mayor número de bandas amplificadas y mejor definidas; éstos fueron OPAE-19, OPB-06, OPD-11, OPI-09 y OPV-06 descritos en el Cuadro 5A del anexo.

En total, estos iniciadores generaron 56 fragmentos amplificados de ADN, la mayoría fueron bandas monomórficas (55%) y el 45% resultaron ser polimórficas. OPAE-19 (Figura 6A) y OPB-06 produjeron el mayor número de fragmentos de ADN (15 y 12, respectivamente), de los cuales la mayoría fueron monomórficos, lo mismo ocurrió con OPI-09 que produjo sólo 9 bandas: dos iniciadores OPD-11 (Figura 8A) y OPV-06 (Figura 7A) produjeron cada uno 10 fragmentos y aportaron más bandas polimórficas. La cantidad de fragmentos polimórficos generados por cada iniciador no es determinante en el valor de índice de variabilidad genética (IVG) detectada por cada uno de ellos, esto se discutirá más adelante en el apartado (4.3).

La cantidad de bandas polimórficas amplificadas depende del ADN blanco y las secuencias de bases de que esté formado el iniciador utilizado, ya que esta secuencia tendrá que ser complementaria con parte o partes del ADN

blanco (de la planta) por lo cual, cuando el número de bandas amplificadas es bajo, significa que el número de regiones homólogas en el genoma del organismo con la del iniciador también es bajo y el nivel de polimorfismo detectado puede ser poco, sobretodo si la mayoría de las bandas amplificadas son comunes en la mayor parte de las muestras (bandas monomórficas).

En el Cuadro 6 se muestra la matriz de valores de las distancias genéticas entre pares de poblaciones de tomate de cáscara, obtenidas del análisis conjunto de los resultados con los cinco iniciadores utilizando el coeficiente de Nei's (1978). Estas distancias fueron muy amplias (en general toman valores entre 0 y 1), variando en un intervalo de 0.199 entre los tipos con parecido más cercano hasta 0.878 entre los más distantes. Las distancias genéticas más grandes se registraron entre el tipo Silvestre autofértil con Salamanca, Chapingo y Arandas (Cuadro 6), lo que se relaciona con los trabajos de algunos investigadores al considerarlo como otra especie de *Physalis* (Peña *et al.*, 1992 y Santiaguillo *et al.*, 1997). En general entre los tipos mejorados, silvestres, milpero y Manzano se observa un comportamiento similar. Las distancias más cortas se registraron entre los materiales mejorados, como: Chapingo con Puebla, Salamanca y Rendidora.

Cuadro 6. Matriz de valores de las distancias genéticas entre las poblaciones de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.) obtenida de los datos moleculares con cinco primers.

	SILVEST. AUTOF.	SILVEST. INCOMP.	MILPERO	MANZANO	ARANDAS	TAMAZULA	RENDI- DORA	CHAPINGO	SALA- MANC	PUEBLA
SILVESTRE AUTOFERT	0.0									
SILVESTRE INCOMPAT	0.527	0.0								
MILPERO	0.460	0.360	0.0							
MANZANO	0.507	0.411	0.298	0.0						
ARANDAS	0.841	0.580	0.515	0.515	0.0					
TAMAZULA	0.683	0.472	0.359	0.521	0.307	0.0				
RENDIDOR	0.655	0.442	0.354	0.469	0.337	0.264	0.0			
CHAPINGO	0.878	0.360	0.415	0.375	0.364	0.302	0.284	0.0		
SALAMANC	0.878	0.499	0.354	0.415	0.405	0.430	0.340	0.254	0.0	
PUEBLA	0.579	0.361	0.351	0.302	0.429	0.376	0.360	0.199	0.249	0.0

Los valores de distancias genéticas reportados por varios autores que han utilizado esta técnica, difieren a los aquí presentados, debido posiblemente a que han aplicado métodos de análisis distintos, y por consecuencia diferentes escalas de valores; sin embargo, esto no afecta las conclusiones obtenidas.

De la matriz de distancias genéticas se derivó el dendograma mostrado en la Figura 2, donde se agrupan y separan las razas de tomate de cáscara con base en la distancia genética entre ellas, obtenido por el método de agrupamiento NJOIN. Se puede observar la separación de cuatro grandes grupos bien definidos; uno que incluye a las poblaciones silvestres, el segundo al Milpero cultivado, el tercero a la raza Manzano y el cuarto a los mejorados.

Las poblaciones que se asocian más cercanamente se ubican dentro del grupo 1, y son las razas Arandas y Tamazula (subgrupo 1.4), lo que resulta del hecho de compartir gran cantidad de fragmentos de ADN similares revelados por el conjunto de iniciadores utilizados. Este subgrupo, se une a un tercer material (Rendidora) para formar el siguiente subgrupo (1.3) mejor relacionado. El subgrupo 1.2 se forma al unirse los dos primeros con la variedad CHF1-Chapingo. El subgrupo 1.1 lo integran la raza Salamanca con el subgrupo 1.2, y a su vez todos éstos unidos con Puebla conforman el grupo 1; estos cuatro subgrupos contienen los seis materiales (Arandas, Tamazula, Rendidora, CHF1-Chapingo, Salamanca y Puebla) con mayor parentesco entre ellos y juntos se separan claramente de los tipos Silvestres, Milpero y Manzano; este último material unido con el primer grupo se asocian aparte para formar el

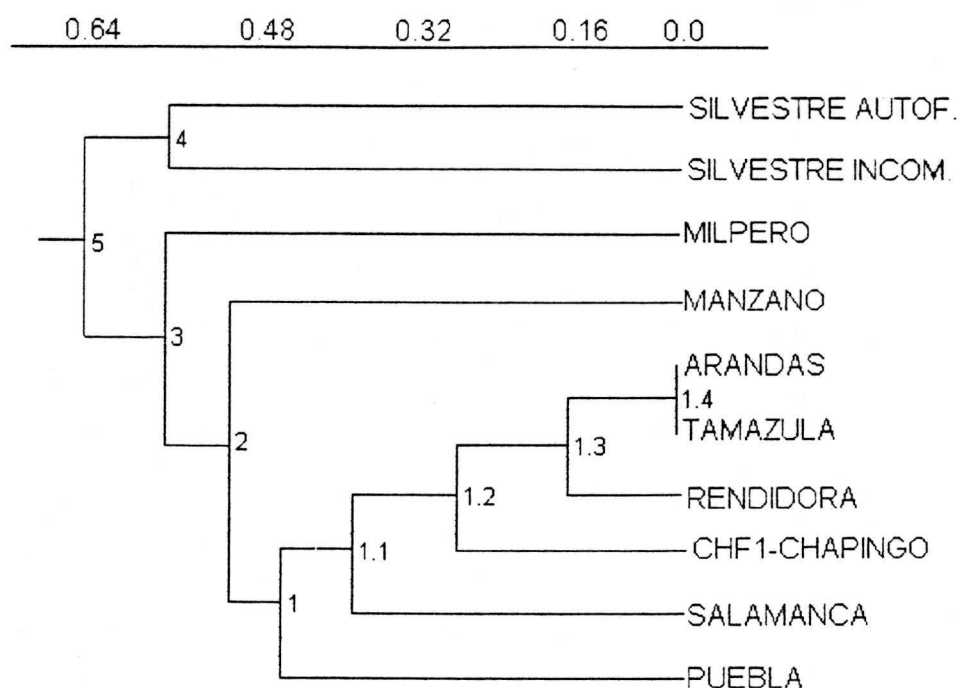


Figura 2. Dendrograma de agrupamiento de las diez variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.), obtenido a partir de los datos moleculares con los cinco iniciadores.

grupo 2, que se une a mayor distancia con los grupos 3 y 4, lo que indica que Manzano difiere claramente con las demás razas cuando menos a nivel molecular. El Milpero cultivado al igual que Manzano forman grupos diferentes (grupos 2 y 3) unidos lejanamente con el grupo 4, el cual está formado por los silvestres: Silvestre autofértil y Silvestre autoincompatible; sin embargo, éstos se unen a una distancia genética amplia entre ellos (0.527) y con las demás poblaciones, lo que significa que son materiales que difieren mucho a pesar de

estar en un mismo grupo, debido a que comparten menos fragmentos comunes de ADN. Este grupo 4 se une lejanamente con el 3 para unir la totalidad de las poblaciones de tomate estudiadas en un agrupamiento general (grupo 5).

Otro agrupamiento (dendograma) de comportamiento similar al anterior se construyó con los datos obtenidos del iniciador OPV-06 (Figura 5A del anexo), los otros cuatro iniciadores originaron dendogramas de comportamiento variado, lo que significa que el análisis en conjunto de ellos para este caso es lo más recomendado y que el iniciador OPV-06 es el mejor indicador y determinante del resultado final de agrupamiento, a pesar de no originar el mayor número de bandas. Para ilustrar mejor lo anterior con el iniciador OPV-06, se realizó la amplificación de todas las variedades de tomate de cáscara en conjunto, utilizando cuatro genotipos de cada material vegetal. En la Figura 3 se muestran las fotografías correspondientes al gel con las 40 muestras amplificadas, observándose como cambia el patrón de bandeo obtenido para cada variedad, ésta es una forma sencilla de distinguir e identificar la variabilidad existente entre las variedades .

El agrupamiento de las variedades mostrado con datos moleculares (Figura 2) guarda similitud con trabajos citados anteriormente (Santiaguillo *et al.*, 1997 y Peña, 1998b) realizados de acuerdo al grado evolutivo determinado por caracteres genéticos, morfo-fisiológicos; origen y domesticación del género. Aunque cabe destacar que el Manzano no se ajusta totalmente a lo referido, lo que posiblemente se deba a que su domesticación ha ocurrido principalmente en la zona de transición entre el clima templado y el cálido seco.

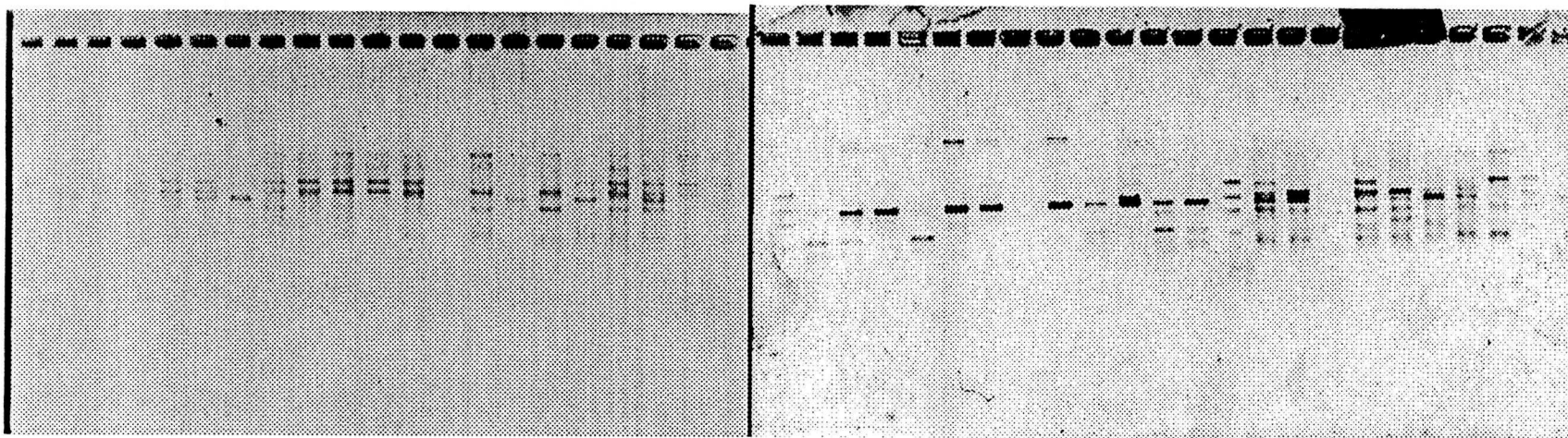


Figura 3. Patrón de bandas obtenido con el iniciador OPV-06 en todas las variedades de tomate de cáscara estudiadas. Iniciando de izquierda a derecha, carril 1: marcador de peso molecular ϕ 174, carriles 2-5: Silvestre autofértil, carriles 6-9: Silvestre autoincompatible, carriles 10-13: Milpero, carril 14: ϕ 174, carriles 14-18: Manzano, carriles 19-22: Arandas, carril 23: ϕ 174, carril 24 libre. 2a. Fotografía, carril 1: ϕ 174, carriles 2-5: Tamazula, carriles 6-9: Rendidora, carriles 10-13: Chapingo, carril 14: ϕ 174, carriles 15-18: Salamanca, carriles 19-22: Puebla y carril 23: ϕ 174.

4.2. Resultados morfológicos

La información fenotípica se obtuvo de los mismos materiales evaluados en tres localidades diferentes, principalmente se evaluaron caracteres de flores, frutos y semillas (Cuadro 7); estos datos se sometieron a un análisis de agrupamiento para poder realizar una comparación de éste con el agrupamiento molecular. El análisis se realizó con el paquete de cómputo NTSYS-pc, versión 1.80 por el método SAHN.

El dendograma obtenido se muestra en la Figura 4, donde se observa la separación de cuatro grupos bien definidos formados por los tipo silvestre; Milpero-Arandas-Tamazula; el grupo de los mejorados (Manzano, Rendidora, CHF1-Chapingo, Salamanca y Puebla); y separado un poco de este último se encuentra la raza Puebla .

Como materiales más relacionados (con mayor parecido de acuerdo a los caracteres evaluados) aparecen los del grupo 1: Manzano y Rendidora (subgrupo 1.1), Chapingo y Salamanca (subgrupo 1.2); estos cuatro a su vez conforman el grupo más grande y cercano (grupo 1) y unidos con Puebla forman el grupo 2 de los materiales mejorados; aquí se encuentran las poblaciones con mayor grado evolutivo, de domesticación, incluso de mejoramiento (Grimaldo, 1997; Peña, 1998b), motivo por el cual exhiben el mayor parentesco.

El tercer grupo lo integran el Milpero, Arandas, Tamazula y unido lejanamente al grupo 2; los dos primeros conforman el subgrupo 3.2 (al igual que los del grupo 1, están cercanamente relacionados) y unidos con Tamazula

componen el subgrupo 3.1. Estos tres grupos se unen lejanamente con los silvestres (grupo 4), para formar el último grupo general (grupo 5); estos silvestres son los materiales unidos más lejanamente entre sí y con las otras razas. Este comportamiento es debido principalmente a que una de estas poblaciones silvestres es autógena, a diferencia de las otras poblaciones estudiadas que son autoincompatibles o alógamas obligadas.

El agrupamiento anterior se sustenta por descripciones fenotípicas reportadas en trabajos realizados con los mismos materiales a los aquí presentados, en donde los asocian de forma parecida. Estas investigaciones se realizaron con objetivos similares al presente y se basan principalmente en caracteres morfológicos y fisiológicos (Ayala *et al.*, 1992; Santiaguillo y López, 1991; Santiaguillo y Peña, 1997); algunos más se fundamentaron en caracteres genéticos como características físicas de los cromosomas de cada material (Grimaldo, 1997).

En general, este agrupamiento (Figura 4) muestra similitud al obtenido con los resultados moleculares (Figura 2); dicho comportamiento es razonable, ya que en última instancia la morfología y/o fenotipo de las plantas no es otra cosa que el reflejo de su genotipo en interacción con el ambiente; de esta manera, las diferencias fenotípicas observadas en los organismos, es posible detectarlas a nivel genético o molecular para obtener información más confiable en cuanto a la diferenciación y clasificación de las poblaciones; garantizando un trabajo y análisis adecuado de los resultados. Así, con base en el agrupamiento hecho con datos moleculares (RAPD) y morfológicos, se

confirma que en general el orden evolutivo y/o de domesticación del tomate de cáscara es posiblemente el siguiente: Silvestre autofértil, Silvestre autoincompatible, Milpero, Arandas, Tamazula, Manzano, Rendidora, CHF1-CHAPINGO, Salamanca y Puebla.

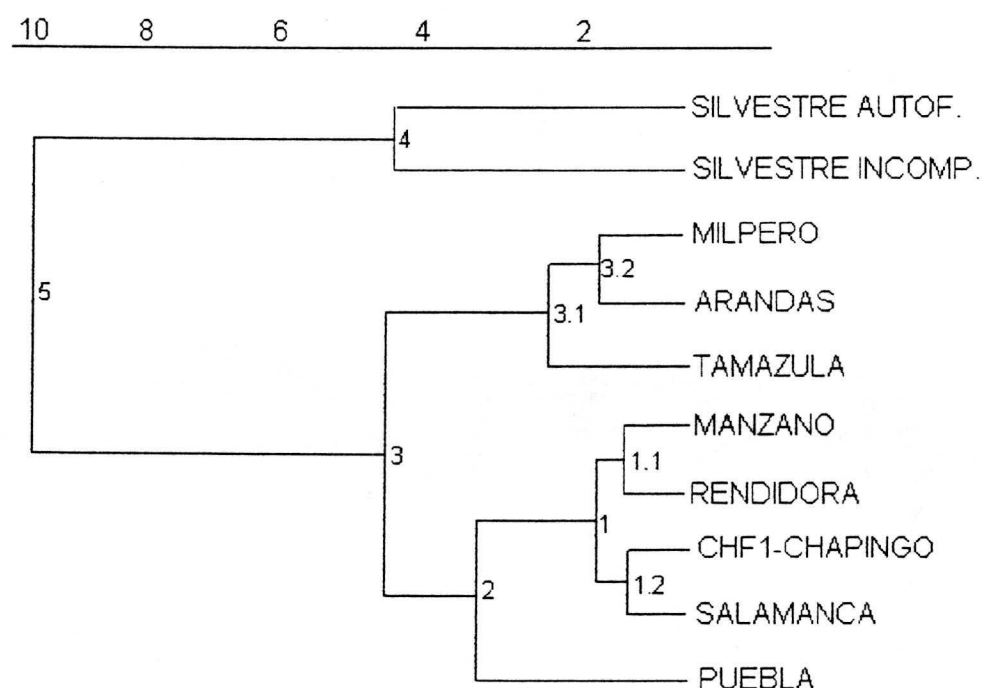


Figura 4. Dendograma obtenido con los datos morfológicos en las diez variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.).

Cuadro 7. Promedio de los valores de caracteres morfológicos evaluados en las variedades de tomate de cáscara
(*Physalis ixocarpa*, Brot.) estudiadas.

VARIEDAD	FLOR		SEMILLA		FRUTO							
	Long. en cm	Diámetro en cm	No./fruto	Peso de 100 sem.	Peso en grs	Long en cm.	Ancho en cm	Volum. en ml	Acidez	Peso prom.	# fru/ planta	Rto/pta (grs/pta)
Silvestre autofértil	0.74	1.02	131	0.07	1.38	1.20	1.29	1.27	5.42	1.30	45.15	56.25
Silvestre autoincomp.	1.14	1.82	279	0.07	4.57	1.76	2.04	4.54	5.27	0.85	22.9	24.92
Milpero	1.31	1.94	376	0.05	6.89	1.93	2.36	6.45	4.55	7.04	38.43	246.91
Manzano	1.37	2.03	308	0.07	9.32	2.22	2.68	9.16	4.50	7.77	37.29	286.0
Arandas	1.39	1.99	315	0.09	14.89	2.53	3.16	14.30	4.65	9.76	36.71	320.71
Tamazula	1.72	2.53	410	0.11	29.29	3.23	3.95	30.42	4.97	20.46	25.14	482.54
Rendidora	1.86	2.94	406	0.12	33.50	3.03	4.18	35.18	4.5	21.41	18.90	444.46
Chapingo	1.75	2.77	434	0.09	24.81	2.84	3.74	24.57	3.95	20.09	24.86	566.85
Salamanca	1.74	2.65	460	0.10	23.34	2.92	3.70	25.54	4.42	16.58	24.35	407.22
Puebla	1.61	2.54	453	0.14	52.69	3.65	4.91	52.58	3.87	45.82	13.51	567.05

Abreviaturas: Rto/pta = rendimiento de frutos por planta, Volum. = Volumen promedio de frutos por planta, No./fruto = Numero promedio de semillas por fruto.

4.3. Índice de Variabilidad Genética (IVG)

El IVG permite conocer la diversidad genética existente dentro de cada una de las poblaciones (variedades) de tomate de cáscara estudiadas. Partiendo del análisis de un patrón de bandas de ADN obtenido para cada individuo o planta por iniciador, se realiza una comparación de todos los individuos que conforman una población particular (h_p) y se obtiene al final el índice promedio calculado con todos los primers (H_p) utilizados. Este procedimiento es propuesto por Montero *et al.* (1998) como una adaptación para ser aplicado a datos moleculares obtenidos con la técnica RAPD.

En el Cuadro 8 se muestran los valores de variabilidad genética obtenidos para cada población de tomate de cáscara. Teóricamente esta variabilidad toma valores entre 0.0 y 1.0, sin embargo, es importante señalar que es difícil encontrar poblaciones con estos valores, ya que una población sería cero si es homogénea y que su patrón de bandas obtenido para cada individuo sea el mismo; y 1.0 para poblaciones con individuos totalmente disimilares (heterogénea) o que éstos no compartan bandas comunes de ADN. En este caso, las poblaciones de tomate de cáscara exhibieron valores que van de 0.2864 a 0.3896, los cuales se pueden considerar altos comparados con los valores reportados por otros autores (0.088 a 0.242) en estudios de diversidad genética en razas y líneas de maíz con isoenzimas (Montero, 1996 y Doebley *et al.*, 1985 citados por el primer autor) y esta especie es comparable con *Physalis* ya que ambas son especies alógamas.

El IVG más bajo se registró en la variedad Tamazula (0.2864) y Silvestre autofértil (0.2896). El comportamiento de este último puede explicarse por el hecho de ser una variedad autofértil, a diferencia de la mayoría que son autoincompatibles, aspecto que induce al fenómeno de endogamia y que confiere baja variabilidad genética por la ausencia de entrecruzamiento del material genético entre los individuos o plantas. En las poblaciones autoincompatibles (alógamas) sí existe dicho cruzamiento; a este tipo pertenecen en su mayoría las diferentes variedades de tomate de cáscara, por lo que presentan alta variabilidad genética; en este caso fueron Salamanca (0.3896), Rendidora (0.3884), Manzano (0.3828), Silvestre autoincompatible (0.3756) y Puebla (0.3685), lo que significa que son materiales con amplia base genética por explotar, sobre todo en los programas de mejoramiento genético, ya que un alto IVG confiere entre otras cosas amplia adaptación de las especies a condiciones de cultivo variables, e incluso tolerancia a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas. Esto no significa que las poblaciones con baja variabilidad genética no posean estas tolerancias y puedan ser de utilidad en dicho proceso.

Milpero, CHF1-Chapingo y Arandas presentan una variabilidad intermedia y de valores similares (0.3165, 0.3161 y 0.3080, respectivamente). Al igual que Tamazula, son comparativamente de baja diversidad genética aunque sean autoincompatibles; lo cual puede deberse (a excepción de CHF1-Chapingo) a que son materiales de distribución geográfica localizada o regional y no conviven cercanamente con otras variedades, lo que ocasiona un bajo

cruzamiento entre genotipos; esto mismo puede ocurrir con otras poblaciones que sean sometidas a monocultivo. Sin embargo, el caso de CHF1-Chapingo se debe a que es una variedad mejorada derivada por selección de Rendidora, motivo por el cual su variabilidad genética es menor (0.3161), esto debido a que el mejoramiento genético confiere homogeneidad a las poblaciones; aún así, este valor sigue siendo alto comparado con el de otras poblaciones y especies, por la condición de incompatibilidad y a que proviene de una población con alto IVG.

Cuadro 8. Índice de Variabilidad Genética (IVG) en las poblaciones de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) estudiadas.

VARIEDAD	IVG
Salamanca	0.3896
Rendidora	0.3884
Manzano	0.3828
Silvestre autoincompatible	0.3756
Puebla	0.3685
Milpero cultivado	0.3165
CHF1-Chapingo	0.3161
Arandas	0.3080
Silvestre autofértil	0.2896
Tamazula	0.2864

Otro aspecto importante es la cantidad de información aportada por cada iniciador utilizado para el cálculo del IVG por población; así, el OPB-06 y OPD-11 originaron los valores promedio más altos de diversidad genética con 0.3913 y 0.3870 respectivamente; por el contrario, OPV-06 y OPAE-19 proporcionaron los valores más bajos (0.2901 y 0.3128),. El iniciador OPAE-19, a pesar de haber producido la mayor cantidad de fragmentos amplificados (15 bandas y sólo 5 polimórficas), no proporcionó valores altos de variabilidad genética, lo que significa que esto es un indicador de mayor aporte de polimorfismo y variabilidad genética poblacional. El caso de OPV-06 es también interesante, ya que a pesar que de forma individual determinó el agrupamiento molecular final (Figura 5A del anexo) aportó el valor más bajo de variabilidad genética.

4.4. Análisis general

Los resultados generados en la presente investigación representan la primer aplicación de los marcadores genéticos (RAPD) para monitorear la diversidad y relaciones genéticas en un amplio grupo de genotipos de tomate de cáscara.

Las conclusiones reportadas en trabajos con objetivos parecidos realizados en *Physalis* guardan extrema concordancia con los resultados aquí reportados, lo que confiere cierto grado de confiabilidad requerida en toda investigación.

Los dos agrupamientos (moleculares y morfológicos) obtenidos muestran similitud entre ellos y con el orden citado en investigaciones previas (Santiaguillo y Peña, 1997; Peña, 1998a y 1998b) realizadas de acuerdo a caracteres morfo-fisiológicos, genéticos, grado evolutivo y de domesticación de las variedades reportadas.

En los dos sistemas de agrupamiento (Figuras 2 y 4), se evidencia la división de tres grupos generales más o menos definidos, uno que agrupa a los materiales mejorados (Rendidora, CHF1-Chapingo, Salamanca y Puebla), otro al Milpero y el tercero a los Silvestres; exhibiendo diferencias en el parentesco y/o en las distancias genéticas.

Se observan algunas diferencias entre estos agrupamientos; en el molecular (Figura 2) el grupo uno incluye a seis materiales ubicados dentro de los más cultivados y mejorados; en el cluster morfológico a este grupo lo integran cuatro de los anteriores materiales y Puebla aparece como un grupo aparte (grupo 2), siendo aquí donde se observa la diferencia más clara en ambas agrupaciones, ya que el grupo 2 en el agrupamiento molecular lo forma la raza Manzano separado del grupo de los mejorados. Este comportamiento quizá se deba a que Manzano y Puebla difieren fenotípicamente (sobre todo en los caracteres evaluados) y por consecuencia genotípicamente de los demás materiales. En el grupo tres del agrupamiento molecular, Milpero está solo y en el morfológico se une con Arandas y Tamazula, lo que significa que son más parecidos fenotípicamente que a nivel molecular, incluso Peña (1998b) los ubica (Tamazula y Arandas) en una misma raza.

Existe la posibilidad de mejorar estos agrupamientos, utilizando y probando un mayor número de iniciadores, pudiendo encontrar uno o más que proporcione polimorfismo suficiente. Esto es, porque en la mayoría de los trabajos reportados utilizan al menos el doble de primers con el fin de explorar mejor el genoma (Lerceteau *et al.*, 1997; Rusell *et al.*, 1997; Chan y Sun, 1997; y Lakshmi *et al.*, 1997); no se trata de usar muchos, sino probar el mayor número posible y elegir aquellos que proporcionen mejor información.

El caso de las variedades CHF1-Chapingo y Rendidora es una muestra de como el mejoramiento cambia las poblaciones, en los dos dendogramas (Figuras 2 y 3) se observa como otros materiales (Arandas-Tamazula, Manzano-Rendidora y CHF1-Chapingo-Salamanca) se agrupan más cercanamente que entre ellos; incluso se ubican a mayor distancia genética (Cuadro 6) y poseen diferente IVG.

Con respecto a este índice (IVG), en general los valores fueron altos para todas las poblaciones de tomate de cáscara analizadas; los materiales con mayor variabilidad genética fueron Salamanca, Rendidora, Manzano, Silvestre autoincompatible y Puebla, lo que significa que son poblaciones bastante heterogéneas y de amplia base genética, lo que indica que son interesantes en su aplicación en los programas de mejoramiento de la especie; sin embargo esto no significa que las otras poblaciones de variabilidad menor (Silvestre autofértil y Tamazula) no sean importantes para tales fines, ya que pueden poseer caracteres interesantes; como tolerancia a condiciones adversas de cultivo, el carácter de autofertilidad del material silvestre, etc.

V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se llegó a las conclusiones siguientes:

- Según la matriz de valores de las distancias genéticas la variedad Silvestre autofértil mostró las distancias genéticas más amplias con respecto a las otras poblaciones, se agrupó de forma diferente y mostró uno de los IVG más bajos (0.2896), esto puede sustentar lo afirmado por varios autores al ubicarlo como otra especie del género *Physalis*.

- El dendograma obtenido con los datos moleculares (Figura 2), mostró una organización general de 4 grupos: 1) Mejorados, 2) Manzano, 3) Milpero y 4) Silvestres; el primero agrupó a 6 poblaciones en 5 subgrupos bien definidos y a las distancias genéticas más cortas, lo que significa que fueron los materiales mejor relacionados o enparentados.

- El agrupamiento obtenido con los datos morfológicos (Figura 4), agrupó a las poblaciones también en cuatro grupos bien definidos: 1) Mejorados, 2) Puebla, 3) Milpero y 4) Silvestres. La diferencia con el molecular es que el grupo 2 lo constituyó diferente material, en este caso fue Puebla y en el anterior Manzano.

- Ambos agrupamientos guardan importantes similitudes con investigaciones previas (Santiaguillo y Peña, 1997; Peña, 1998b) realizadas de acuerdo a caracteres morfo-fisiológicos, y al estado evolutivo y de domesticación de las poblaciones.

- Los iniciadores que originaron el mayor polimorfismo fueron OPB-06, OPD-11 Y OPV-06, y el que mejor definió el agrupamiento final fue el OPV-06 (Figura 5A).

- Salamanca, Rendidora, Manzano, Silvestre autoincompatible y Puebla, son las variedades que poseen el mayor índice de variabilidad genética a nivel intra-poblacional (0.3896 a 0.3685), ubicándolos como materiales de alto interés y potencial en el fitomejoramiento.

- Los iniciadores que detectaron mayor IVG promedio fueron OPB-06, OPD-11 y OPI-09 (0.3913, 0.3870 y 0.3377, respectivamente) y los más bajos fueron OPV-06 y OPAE-19 (0.2901 y 0.3128, respectivamente), lo que indica que los primers más polimórficos no confieren como consecuencia el mayor IVG.

VI. LITERATURA CITADA

- Ahmad, M.; D. L. McNeil; A. G. Fautrier; K. F. Armstrong and A. M. Paterson. 1996. Genetic relationships in *Lens* species and parentage determination of their interspecific hybrids using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 92: 1091-1098.
- Armstrong, J.; A. Gibbs; R. Peakall and G. Weiller. 1995. The RAPDistances Package. Versión 1.04. Australian National University. Canberra, Australia. Sitio Internet: <http://life.anu.edu.au/molecular/software/rapd.html>.
- Avendaño A., C. H. 1997. Relación filogenética entre frijoles prehispánicos, silvestres y cultivados, con la técnica de RAPD's. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 79 p.
- Ayala P., J. P., A. Peña L. y J. Mulato B. 1992. Caracterización de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) en Chapingo, México. Revista Chapingo. Vol. XVI. No. 79-80:128-137.
- Beckmann, J. S. and M. Soller. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and cots. Theor. Appl. Genet. 67: 35-43.
- Beckmann, J. S. and M. Soller. 1990. Toward a unified approach genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Biotechnology 8: 930-932.

- Berumen C., J. 1993. El análisis del ácido desoxirribonucleico -ADN- en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo*. No. 111: 34-42.
- Bronstein, I. J. C.; K. G. Voyta, and B. Edwards. 1989. A comparison of chemiluminescent and colorimetric substrates in hepatitis B virus DNA hybridization assay. *Anal. Biochem.* 180: 95-98.
- Brown, A. H. D. 1990. The role of isozyme studies in molecular systematics. *Plant Systematics in the Age of Molecular Biology*. Editado por P. Y. Ladiges y L. W. Martinelli. Editorial CSIRO. Australia. pp. 36-48.
- Caetano - Anolles, G.; B. J. Bassam and M. P. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 294-307.
- Castillo G., F. 1993. La variabilidad genética y el mejoramiento de los cultivos. *Ciencia*. Número Especial, Vol. 44: 69-79.
- Chan, K. F. and M. Sun. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amarant*. *Teor. Appl. Genet.* 95: 865-873.
- Chen, B. H.; J. M. Martin; M. Lavin and L. E. Talbert. 1994. Genetic diversity in hard red sonny wheat based on sequence - Tagged - Site PCR markers. *Crop Sci.* 34: 7628-7632.
- Clegg, M. T. and M. L. Durbin. 1990. Molecular approaches to the study of plant biosystematics. *Plant Systematics in the Age of Molecular Biology*. Editorial CSIRO. Australia. pp. 1-8.

- Coperías E., M. 1995. Huellas Génicas: La nueva ciencia de la identidad. Revista Muy Interesante. Año X. No 4. pp. 6-17.
- Davis, G. L.; M. Dibner D. and J. Batty F. 1986. Basic methods in molecular biology. Editorial Elsevier. New York. 377 p.
- De Bustos, A.; C. Casanova; C. Soler and N. Jouve. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). Teor. Appl. Genet. 96: 101-111.
- Edwards, K.; C. Johnstone and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nuc. Acids Res. 19(6): 1349.
- Freeland J., H. 1981. El ADN: clave de la vida. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Ciencia y Desarrollo. México. 177 p.
- Freyre, R.; L. Panella and V. Llaca. 1995. RFLP Protocol. Bean Genetics Procedures. University of California. UC Davis. 9 p.
- Galindo F., E. 1988. Biotecnología: oportunidades y amenazas. Ciencia y Desarrollo. No. 80: 21-42.
- Golembiewski, R. C.; T. K. Danneberger and P. M. Sweeney. 1997. Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars. Crop Sci. 37: 212-214.
- Gómez C., M. A. 1991. El consumo de hortalizas en México. CIESTAAM. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. p. 9.

- Grimaldo J., O. 1997. Relación entre el grado de domesticación y las características citológicas y morfológicas del fruto en tomate de cáscara (*Physalis* spp.). Tesis de Maestría en Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 76 p.
- Halldén, C.; M. Hansen; N. O. Nilson; A. Hjerdin and T. Söll. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Teor. Appl. Genet.* 93: 1185-1192.
- Hartl, L. and S. Seefelder. 1998. Diversity of selected hop cv detected by fluorescent AFLP's. *Teor. Appl. Genet.* 96: 112-116.
- Hoisington, D., M. Khairallah y D. González de León. 1994. Protocolos de Laboratorio. Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. 2a. Edición. 51 p.
- Hueves, H. 1992. Protocol AFLP procedure. (Inédito). 8 p.
- Iglesias L. y R. Rojas. 1992. Utilización del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) en los programas de mejoramiento genético de plantas. Revisión bibliográfica. *Cultivos Tropicales.* 13(1): 74-88.
- Johnson, B.; V. Becerra; V. Llaca and C. Menendez. 1994. RAPD's. Bean Laboratory Procedures. Department of Agronomy and Range Science. University of California. Davis. 8 p.
- Krishnan, H. B. and D. A. Sleper. 1997. Identification of tall Fescue cultivars by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Crop Sci.* 37: 215-219.

- Lakshmi, M.; S. Rajalakshmi; M. Parami; C. S. Anoratha and A. Parida. 1997. Molecular phylogeny of mangroves. I. Use of molecular markers in assessing the intraspecific genetic variability in the mangrove species *Acanthus ilicifolios* (Acanthaceae). *Teor. Appl. Genet.* 94: 1121-1127.
- Lerceteau, E.; T. Robert; V. Pétiard and D. Crouzillat. 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among collects of *Theobroma cacao* using RAPD and RFLP markers. *Teor. Appl. Genet.* 95: 10-19.
- Llaca, V. 1992. PCR (Polymerase Chain Reaction). Experimental Protocols. Bean Genetics. Department of Agronomy and Range Science. University of California. Davis, USA. 5 p.
- Lee, M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*. Vol. 55: 265-344.
- Lee, S. J.; J. S. Shin; K. W. Park and Y. P. Hong. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. *Teor. Appl. Genet.* 92: 719-725.
- López M., R., J. F. Santiaguillo H., A. Peña L., J. A. Cuevas S. y J. Sahagún C. 1994. Evaluación de 60 colectas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) en Chapingo, México. *Revista Chapingo. Serie: Horticultura*. Vol. 1. No. 2: 131-134.
- Lu, J.; M. R. Knox; M. J. Ambrose; J. K. M. Brown and T. H. N. Ellis. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based methods. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1103-1111.

- Maaß, H. I. And M. Klaas. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Teor. Appl. Genet.* 91: 89-97.
- Maldonado R., R. y K. Loren B. 1989. Los oligonucleótidos sintéticos en el diagnóstico y la investigación. *Ciencia y Desarrollo.* No. 84: 67-75.
- Martínez F., C. 1997. Caracterización varietal de maíz por la técnica de RAPD's. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 93 p.
- Montalvo H., D. 1995. Nutrición y clorosis en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 195 p.
- Montero T., V. 1996. Evaluación por electroforesis de isoenzimas de la diversidad genética de los híbridos dobles de maíz H-28 y H-30. Tesis Profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 51p.
- Montero T., V., L. Montalvo H., A. Peña L., J. L. Morales G. y H. S. Azpiroz R. 1998. Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional con fragmentos de ADN amplificados al azar. *Agricultura Técnica en México.* (En revisión).
- Montes H., S. 1989. Algunos efectos de la domesticación sobre la morfología del tomate (*Physalis philadelphica* Lam.). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 151 p.

- Morjane, H.; J. Geistlinger; M. Harrabi, K. Weising and G. Kahl. 1994. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single chickpea field in Tunisia. *Curr Genet.* 26: 191-197.
- Muñoz C., J. M. 1990. Manual de prácticas de laboratorio en Bioquímica. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. México. pp. 19-22.
- Olson, M. L. H.; C. Canton and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245: 1434-1435.
- Peña L., A. 1998a. Parámetros genéticos, respuesta a la selección y heterosis en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Tesis de Doctorado en Genética. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 151 p.
- Peña L., A. 1998b. La variabilidad genética en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Folleto de divulgación técnica. No. 1. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México. 50 p. (En revisión).
- Peña L., A., J. Mulato B., J. P. Ayala P. y D. Montalvo H. 1992. Caracterización de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). in: Memoria del XVI Congreso Nacional de Fitogenética. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. p. 511.
- Rafalski, J. A.; S. V. Tingey and J. G. Williams. 1991. RAPD markers - a new technology for genetic mapping and plant breeding. *Research News and Information.* Vol. 3. No. 4: 645-648.

- Ramakrishna, W.; K. V. Chowdari; M. D. Lagu; V. S. Gupta and P. K. Ranjekor. 1995. DNA fingerprinting to detect genetic variation in rice using hypervariable DNA sequences. *Teor. Appl. Genet.* 90: 1000-1006.
- Richardson, T.; S. Cato; J. Ramser; G. Kahl and K. Welsing. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Res.* Vol. 24. No. 18: 3798-3799.
- Rivera B., R., I. Torres P., J. A. Garzón T. y L. Herrera E. 1991. Introducción a la Biología Molecular e Ingeniería Genética de plantas. Ed. COMP. 1a. Edición. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato. México. 222 p.
- Roder, M. S.; J. Plaschke; S. U. König; A. Börner; M. S. Sorrells; S. D. Tanksley and M. W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Genet.* 246: 327-333.
- Rohlf, J. 1993. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system. Versión 1.80. State University of New York.
- Rusell, J. R.; D. Fuller; M. Macaulay; B. G. Hatz; A. Jahoor; W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Teor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
- SAGAR. Centro de Estadística Agropecuaria. 1996. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo I. pp. 518-523.

- Sahagún C., J. 1997. Uso de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético vegetal. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Serie: Fitodomesticación. No.6. UACH. Chapingo, México. 11 p.
- Salinas G., G. E., H. Guillen A. y E. Benavides. 1996. Taller de análisis del genoma vegetal utilizando RFLP's. XVI Congreso de Fitogenética. Montecillos, México. 27 p.
- Santiagoullo H., J. F. y R. López M. 1991. Evaluación de 60 colectas de tomate de cáscara (*Physalis ssp.*) en Chapingo, México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Chapingo, México.
- Santiagoullo H., J. F., R. López M., A Peña L., J. A. Cuevas S. y J. Sahagún C. 1994. Distribución, colecta y conservación de germoplasma de tomate de cáscara (*Physalis spp.*) en México. Revista Chapingo. Serie: Horticultura. Vol. 1. No. 2: 125-129.
- Santiagoullo H., J. F. y A. Peña L. 1997. Tomate de cáscara ¡Elija su variedad!. Revista Agrocultura 8 (48): 12-14.
- Santiagoullo H., J. F., A. Peña L., F. Márquez S. y J. A. Cuevas S. 1997. Importancia de los recursos fitogenéticos del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) en México. Publicaciones del Programa Nacional de Etnobotánica. Serie: Recursos Vegetales Mesoamericanos. No. 2. Chapingo México. 11 p.
- Santiagoullo H., J. F., A. Peña L. y D. Montalvo H. 1997. El tomate milpero (*Physalis ixocarpa*, Brot.) como recurso fitogenético. II Congreso Nacional Agropecuario y Forestal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 10 p.

- SARH. Subdirección de Planeación. 1993. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Tomo I. pp.215-217.
- Skroch, P. and J. Nienhuis. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD based estimates of genetic distance. *Teor. Appl. Genet.* 91: 1086-1091.
- Senior, M. L.; E. C. L. Chin; M. Lee; J. S. C. Smith and C. W. Stuber. 1996. Simple Sequence Repeat (SSR) markers developed from maize sequences found in the GENBANK database: Map construction. *Crop Sci.* 36: 1676-1683.
- Smith, C. J. S. and O. S. Smith. 1991. Restriction Fragment Length Polymorphisms can differentiate among U.S. maize hybrids. *Crop Sci.* 31: 893-899.
- Smith, C. J. S. and O. S. Smith. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*. Vol. 47: 85-140.
- Soltis, D. E. and P. S. Soltis. 1989. Isozymes in Plant Biology. Department of Botany. *Advances in Plant Science Series*. Vol. 4. Washington State University. USA. 268 p.
- Talbert, L. E., N. K. Blake, P. W. Chee, T. K. Blake and G. M. Magyar. 1994. Evolution of "sequences-Tagged-site" PCR products as molecular marker in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 87: 789-794.

- Tatineni, V.; G. Cantrell and D. D. Davis. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD. *Crop Sci.* 36: 186-192.
- Tingey, V. S. and P. J. del Tufo. 1993. Genetic analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology*. 101: 349-352.
- Tingey, V. S.; J. A. Rafalski; J. C. K. Williams and S. Sebastian. 1991. Soybean genome analysis: DNA polymorphisms are identified by oligonucleotide primers of arbitrary sequence. *Plant Molecular Biology* 2. Plenum Press. New York. pp: 263-268.
- Ureña F. y J. I. Dávila. 1983. Moléculas Marcadas. *Ciencia y Desarrollo*. Vol. IX. No. 52: 95-101.
- Valadéz M., E. y G. Kahl. 1997. Análisis del genoma vegetal: Amplificación de las huellas del ADN. *Apuntes del Tercer Curso Internacional de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético Vegetal. MÓDULO I.* Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 121 p.
- Walker, J. M. 1984. *Nucleic Acids Methods in Molecular Biology*. Vol. 2. Ed. Human a Press. Clifton, New Jersey. USA. pp: 43-50.
- Watson D., J. 1983. *Biología Molecular del Gen*. 3a. Edición. Editorial Fondo Educativo Interamericano. México, D.F. 740 p.
- Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.

- Williams, J. G. K.; A. R. Kubellk; K. J. Livak; J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yang, W. A.; A. C. de Oliveira; I. Godwin; K. Schertz and J. L. Bennetzen. 1996. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghums. *Crop Sci.* 36: 1669-1676.
- Zhou, Z.; P. J. Bebelj; D. J. Somers and J. P. Gustafson. 1997. Direct amplification of minisatellite-region DNA with VNTR core sequences in the genus *Oryza*. *Teor. Appl. Genet.* 95: 942-949.
- Zietkiewicz, E.; J. A. Rafalki and D. Labada. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) - anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20: 176-183.

VII. ANEXO

Protocolos, cuadros y figuras del anexo

1A. Protocolo de extracción y aislamiento del ADN genómico

El procedimiento de extracción y aislamiento del ADN genómico en plantas realizado en el Laboratorio se basó en la metodología modificada por Edwards *et al.* (1991), y es la siguiente:

Se puede utilizar tejido foliar fresco o seco (liofilizado y molido), debe ser lo más sano y joven posible. Se cosecha con tijeras, guantes y se etiquetan correctamente las bolsas o mallas de fibra de vidrio donde se guardan. Si es en fresco se realizan los pasos siguientes, y si es liofilizado, se usan de 30 - 100 mg de tejido molido y se inicia por el paso 3:

1. Cortar 1 - 2 discos de hoja con la tapa de un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril. Almacenar a -20°C hasta su uso (que no debe demorar mucho tiempo).

2. Macerar el tejido con un molino estéril (Korites # K749520-000) para fisher, si se reusa debe lavarse y enjuagarse con alcohol étílico.

Los pasos siguientes son comunes si se emplea tejido fresco o liofilizado:

3. Adicionar 400 µl de buffer de extracción CTAB caliente a 65°C (se coloca en baño María con una hora de anticipación aproximadamente). Macerar o agitar el tejido para que se impregne completamente.

4. De inmediato agregar 4 µl de β-mercaptoetanol luego del CTAB.

5. Mezclar hasta que la solución esté homogénea, incubar los tubos a 65°C por 20 minutos en el baño María.

6. Adicionar 400 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar en agitación por 15 minutos.
7. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 8 minutos.
8. Cuidadosamente transferir la capa superior (acuosa) a un nuevo tubo Eppendorf que contenga 400 μ l de isopropanol. Mezclar bien y dejar los tubos a temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 8 minutos.
10. Desechar el sobrenadante. Dejar los tubos invertidos por 5 minutos para secar el pellet o pastilla de ADN.
11. Resuspender el pellet en 100 μ l de TE_{0.1} y adicionar 4 μ l de ARNasa (10 mg/ml en solución stock).
12. Dejar los tubos a temperatura ambiente durante 15 minutos.
13. Precipitar el ADN con 200 μ l etanol frío al 100% (se coloca al ultracongelador una media hora antes de usarse).
14. Mezclar perfectamente y dejar los tubos a temperatura ambiente por 5-10 min.
15. Centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 5 minutos.
16. Desechar el sobrenadante y permitir que el alcohol etílico remanente se evapore (aprox. 5 min.). El pellet también puede secarse usando un "SPIN-VAC" u otro tipo de cámara de vacío.
17. Resuspender el pellet en 100 μ l de TE_{0.1}.
18. Guardar las muestras o tubos a -20°C.

2A. Preparación de las soluciones y reactivos utilizados en el proceso de extracción del ADN.

Para preparar 100 ml de solución

1. Amortiguador de extracción:

Solución concentrada	Concentración final
- 28 ml de NaCl 5 M	700 mM
- 4 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0	50 mM
- 10 ml de Tris-HCl 1M pH 8.0	100 mM
- 10 ml de agua bidestilada (ddH ₂ O) estéril	
- Ajustar el pH a 8.0, aforar a 67 ml y esterilizar	
- 33 ml de CTAB 5%	1 %

2. TE:

- 1.0 ml de Tris-HCl 1M	10 mM
- 0.2 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0	1 mM
- Aforar a 100 ml con ddH ₂ O estéril	

3. Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1):

- 96 ml de cloroformo
- 4 ml de alcohol isoamílico

4. Enzima: 10 mg/ml de ARNasa

El NaCl 5 M para el buffer de extracción se prepara con 29.22 grs de NaCl disueltos en 100 ml de agua bidestilada (ddH₂O) la mezcla se esteriliza en autoclave. Para el EDTA 0.5 M con pH 8.0 se pesan 18.61 grs de este reactivo y se afora a 100 ml con ddH₂O. El CTAB al 5% se prepara con 5 grs de éste en 100 ml de ddH₂O, la mezcla se calienta a una temperatura constante de 65°C en agitación para que se logre disolver.

En la preparación del buffer de extracción primero se mezclan las cantidades adecuadas del NaCl, EDTA, Tris-HCL y el ddH₂O, se esteriliza en la autoclave y se agrega el CTAB.

Sí se requiere preparar alguna otra cantidad de solución o se tienen diferentes concentraciones de los reactivos (soluciones madres o concentradas), es importante y utilizar la fórmula siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C_1 = Es la concentración inicial a la cual se encuentran los reactivos en la solución madre o concentrada

V_1 = Es el volumen inicial que se tomará de cada reactivo para preparar la cantidad de solución requerida

C_2 = Es la concentración final o a la que quedará la solución a utilizar

V_2 = Es la cantidad o volumen total de solución que se quiere preparar

3A. Protocolo de la técnica de los RAPD

1. Encender el termociclador con media hora de anticipación.
2. Preparar una solución principal para la cantidad de reacciones que se colocarán en el termociclador (25 μl para cada reacción), en este trabajo se amplificaron de 20 a 24 reacciones. La mezcla de reacción contenía lo siguiente:

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	CANTIDAD EN μl
ddH ₂ O	-	10.8
Buffer PCR 10X	1X	2.5
MgCl ₂ 20x (30 mM)	60 mM	2.0
dNTP's (2.5 mM)	200 μM c/u	2.0
Primer: (10 μM)	15 μM	1.5
ADN nativo (20 ng μl)	120 ng	6.0
Taq Polim. (5 U μl^{-1})	1 U	0.2
Volumen Total	-	25

Nota: Las cantidades están expresadas en concentración y μl

3. Se deben utilizar puntas y tubos nuevos y estériles, después de adicionar cada componente a la mezcla cambiar la punta de la micropipeta. Los reactivos y soluciones se deben trabajar en frío con hielo.

4. Cuando se tiene la solución principal, mezclar o agitar suavemente, repartirla en partes iguales a cada microtubo previamente etiquetados y adicionar el ADN genómico.
5. Posteriormente, centrifugar suavemente, colocar 30 μ l de aceite mineral estéril a cada tubo, y volver a centrifugar. Esto se realiza con el propósito de evitar la evaporación de la mezcla de reacción durante el proceso de amplificación.
6. Programar el termociclador con los tiempos y temperaturas elegidas y colocar en cada celda del aparato una gota de aceite mineral, con el fin de mejorar la distribución del calor al contacto del tubo con la celda.
7. Colocar los tubos bien tapados en cada celda alrededor del sensor, y correr el programa, el cual para este trabajo tuvo una duración de 3.5 horas, pero existen programas con diversos tiempos de duración.
8. Después de la amplificación se llevará a cabo la electroforesis o separación de los fragmentos de ADN amplificados (en caso de no realizar este paso, las muestras o tubos se guardan en refrigeración hasta su corrimiento), removiendo cuidadosamente la fase inferior o mezcla de reacción sin contaminarla con el aceite mineral, y pipetearla a otro tubo que contenga amortiguador de carga, el cual contiene glicerol para aumentar el peso de la muestra, azul de bromofenol y cianol xilol como marcador de corrimiento.
9. Mezclar por inversión 2 μ l de amortiguador de carga con el producto de la reacción amplificada.

10. Antes ya se tiene preparado el gel de agarosa, que se cubre con amortiguador TAE 1X dentro de tanque de electroforesis entre 5 y 7 mm por encima del gel.
11. Colocar las muestras dentro de los pozos, evitando contaminar los adyacentes. En uno de éstos colocar 2 μl de marcador de peso molecular (aproximadamente $0.1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$) para tener idea del tamaño de las bandas observadas
12. Iniciar la electroforesis a temperatura ambiente, con 90 voltios por 1.5 a 2 horas.
13. Cuando el color azul llega a 1 cm del extremo posterior del gel, teñirlo en bromuro de etidio ($1\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$) durante 20 minutos aproximadamente en oscuridad y agitación constante, este tiempo puede variar de acuerdo a las veces que se haya utilizado la solución de BrEt. Se llegan a teñir seis geles en promedio.
14. Enjuagar el gel en agua destilada estéril durante 10 minutos, para retirar el exceso de BrEt.
15. Observar el gel en el transiluminador y tomarle la (s) fotografía (s) correspondiente.

Es importante tomar todas las medidas de precaución sugeridas para manejar sustancias tóxicas ya que el BrEt es un potente mutagénico; además de utilizar lentes o careta y bata para protegerse de los rayos UV al observar el gel.

4A. Protocolo de la electroforesis

1. Cerciorarse que el equipo a utilizar esté completo y limpio.
2. Sellar los extremos del portagel con cinta adhesiva, insertar el peine adecuado y colocarlo en una superficie plana o mesa nivelada con un nivel portátil.
3. Pesar 1.4 gramos de agarosa, colocarla dentro de un matraz de 150 ml, aforar a 100 ml con TAE 1X, y derretirla completamente en un horno de microondas; el gel quedará al 1.4 % recomendado.
4. Enfriar la mezcla hasta 60°C aproximadamente y vaciarla con cuidado dentro del portageles, remover las burbujas con una punta de micropipeta.
5. En 20 minutos el gel se solidificará, entonces remover el peine y la cinta, y sumergirlo dentro de la cámara de electroforesis con TAE 1X hasta ser cubierto completamente.
6. Colocar las muestras de ADN amplificadas con cuidado en cada pozo del gel junto con el amortiguador de carga.
7. Incluir un pozo con marcador de peso molecular, para monitorear que la amplificación se realice sin errores.
8. Tapar la cámara de electroforesis y conectar los electrodos a la fuente de poder. La terminal del cátodo azul o negro es de donde partirá la migración de los fragmentos del ADN.
9. Encender la fuente de poder y programarla a 90 voltios máximo, durante 1.5 a 2 horas.

10. Teñir el gel por inmersión en el bromuro de etidio durante 20 minutos o más tiempo, según las veces que se haya utilizado con anterioridad la solución de BrEt.
11. Observar el gel en el transiluminador de luz UV durante corto tiempo de exposición y de acuerdo a los resultados obtenidos, fotografiarlo.

Tomar las medidas de protección indicadas al contacto con el BrEt y los rayos UV.

Cuadro 5A. Características de los primers o iniciadores utilizados.

CÓDIGO	5' → 3'	Peso molecular	p moles	µg/tubo
OPB-06	TGCTCTGCCC	2946	6473	19.0
OPD-11	AGCGCCGTTG	3019	5300	16.0
OPI-09	TGGAGAGCAG	3108	4625	14.5
OPAE-19	GACAGTCCCT	2979	5531	16.5
OPV-06	ACGCCCAGGT	3004	5377	16.0

Cuadro 6A. Equipo de laboratorio utilizado

- Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μl - Gradillas de unicel para 25 y 100 tubos - Refrigerador a -4 y -20°C - Ultracongelador a -70°C - Fuentes de poder de 500 V - Potenciómetro - Balanza analítica y semianalítica - Incubadora a 36°C - Autoclave - Máquina para hielo frappé - Centrífuga de 12000 rpm - Agitador orbital - Agitador magnético - Horno de microondas - Campana de flujo laminar - Liofilizador - Molino Eléctrico - Frascos tipo vial - Tubos eppendorf de 0.2 y 1500 ml - Espectrofotómetro - Termociclador	- Equipo de electroforesis: tanque, charolas, peines, fuentes de poder - Puntas para micropipetas - Agua bidestilada - Aceite mineral - Transiluminador - Cámara fotográfica y rollo blanco y negro Tris X PAN ASA 400 - Lentillas de acercamiento y filtro naranja - Papel para impresión de las fotos ILFORD grado 3 brillante - Careta y lentes de protección - Reactivos diversos: cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol, EDTA, nucleótidos, ARNasa, BrEt, etanol, enzimas polimerizadoras, iniciadores, CTAB, NaCl, Tris-HCl, agarosa, BrEt, marcador de peso molecular, buffer de carga, buffer de corrimiento para electroforesis
---	---

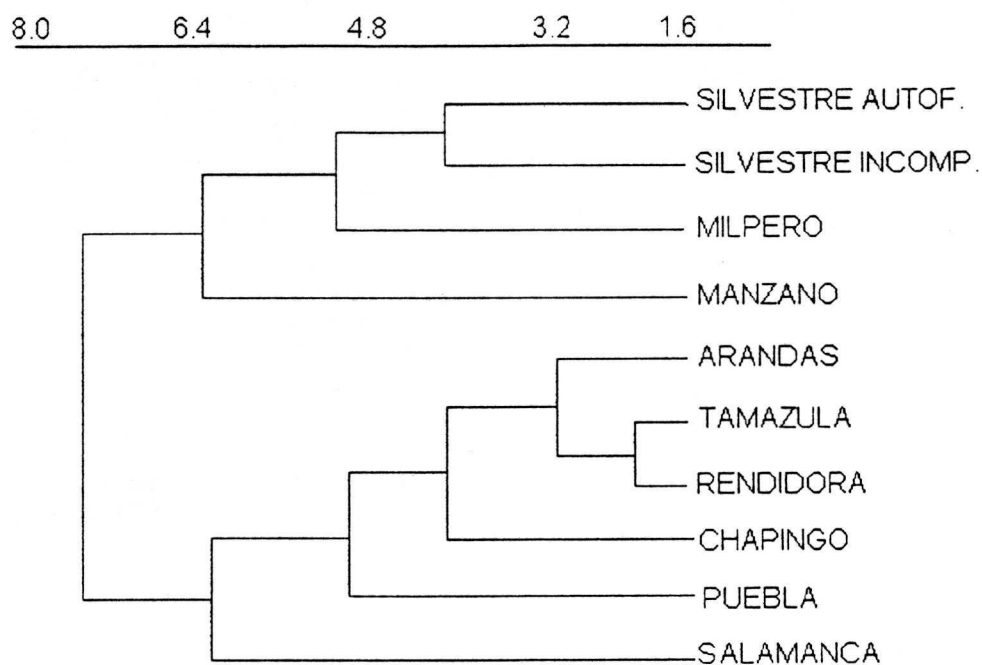


Figura 5A. Dendrograma de agrupamiento de las variedades de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.) a partir de datos moleculares obtenidos con el iniciador OPV-06.

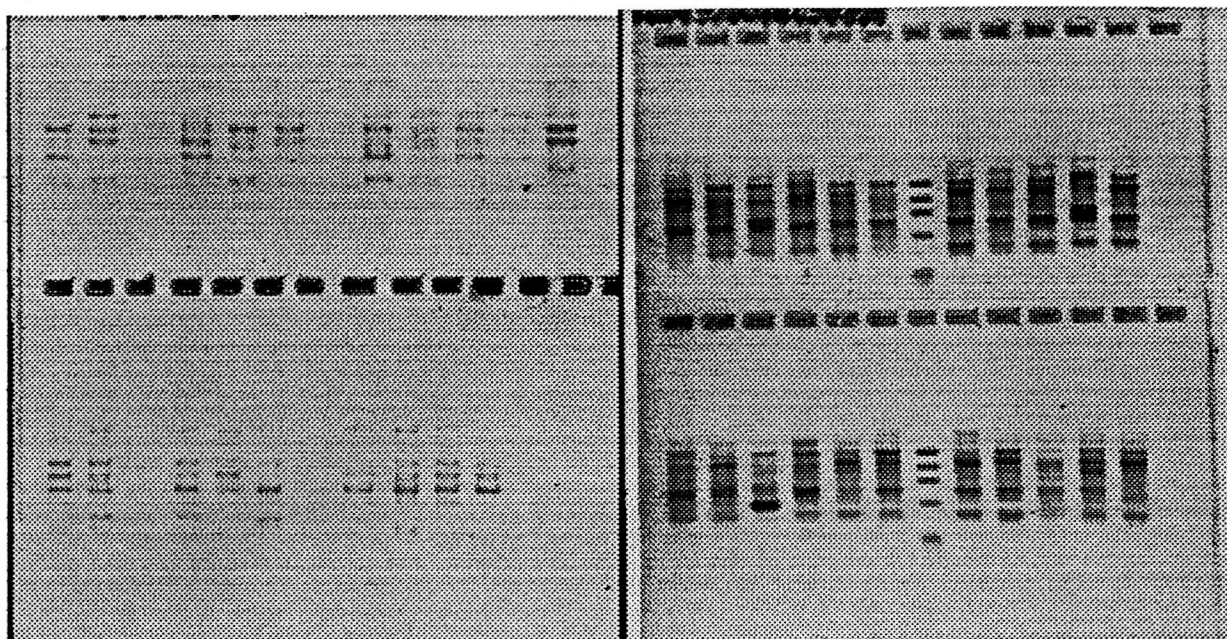


FIGURA 6A. Patrón de bandas obtenido con el iniciador OPAE-19 en la variedad CHF1-Chapingo y Rendidora

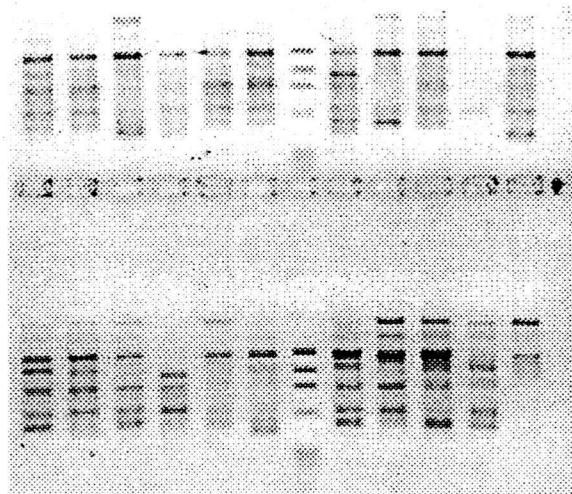


FIGURA 7A. Patrón de bandas obtenido con el iniciador OPV-06 en el material Puebla

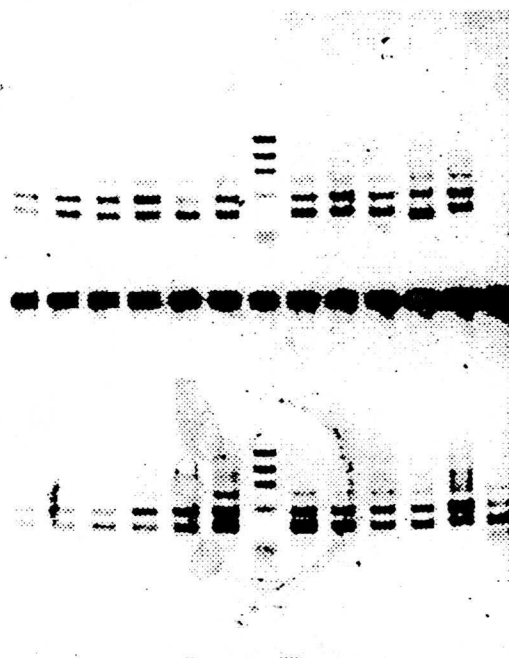


FIGURA 8A. Patrón de bandas obtenido con el iniciador OPI-09 en el material Puebla.