



Universidad Autónoma Chapingo

Departamento de Fitotecnia
Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CONTENIDO
DE RESVERATROL DE LÍNEAS DE CACAHUATE
(*Arachis hypogaea* L.)**

PRESENTA

Luz Amalia Sánchez Ávila

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

AGRÍCOLA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Director de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

Chapingo, Méx. junio, 2016

La presente tesis titulada: **Caracterización molecular y contenido de resveratrol de líneas de cacahuete (*Arachis hypogaea L*)** fue realizada por la **C. Luz Amalia Sánchez Ávila**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:


Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

CODIRECTOR:


Dr. Samuel Sánchez Domínguez

ASESOR:


Dra. Rosario García Mateos

ASESOR:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

Chapingo, Estado de México, Junio de 2016

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ABREVIATURAS USADAS.....	VIII
DEDICATORIAS.....	X
AGRADECIMIENTOS.....	XI
DATOS BIOGRÁFICOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS GENERALES.....	4
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1 Generalidades del cultivo.....	5
4.2 Características bromatológicas del cacahuate.....	6
4.3 Resistencia genética a enfermedades.....	9
4.4 Marcadores moleculares de ADN.....	13
4.5 Método de separación.....	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 Material vegetal.....	20
5.2 Caracterización molecular.....	20
5.2.1 Extracción de ADN.....	20
5.2.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN.....	21
5.3 Selección de iniciadores y amplificación.....	23
5.4 Determinación de resveratrol.....	26
5.5 Análisis de resultados.....	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Detección de RGAs.....	28
6.2 Corroboración de RGAs.....	34

	Página
6.3 Análisis de alineamiento.....	35
6.4 Análisis de agrupamiento.....	37
6.5 Contenido de resveratrol.....	38
VII. CONCLUSIONES.....	43
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	45
IX. APÉNDICE.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Composición química promedio de la semilla de <i>Arachis hypogaea</i>	7
Cuadro 2. Líneas de cacahuete utilizadas para la búsqueda de análogos de genes de resistencia (RGA)s y determinación de contenido de resveratrol en semilla.....	20
Cuadro 3. Componentes de la mezcla de reacción en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR) para la detección de análogos de genes de resistencia (RAG)s.....	23
Cuadro 4. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR para la detección de análogos de genes de resistencia (RGAs).....	24
Cuadro 5. Características de los iniciadores utilizados para la detección de análogos de genes de resistencia (RAGs) en 30 líneas de cacahuete.....	25
Cuadro 6. Contenido de resveratrol en semilla cruda de 30 líneas de cacahuete determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del resveratrol.....	8
Figura 2. Curva de calibración obtenida a partir de solución estándar de resveratrol.....	27
Figura 3. Gel de agarosa que muestra el resultado de la amplificación utilizando los iniciadores S48-2F en el que se puede apreciar la banda esperada de un peso de 215pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.....	29
Figura 4. Gel de agarosa que muestra la amplificación obtenida con iniciadores CV811 en el cual no aparece la banda deseada que corresponde a un peso de 260pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.....	30
Figura 5. Amplificación utilizando los iniciadores S534-R, donde se aprecia la banda esperada con un peso de 314 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.....	31
Figura 6. Gel correspondiente a la amplificación utilizando los iniciadores S5-26-F que muestra la banda deseada con un peso de 418 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.....	32
Figura 7. Gel correspondiente a la amplificación utilizando los iniciadores PCRE, donde la banda objetivo es de 600 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.....	33
Figura 8. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos consenso obtenida con los iniciadores S48-2F en 28 líneas de cacahuete. a) Nucleótidos 1 a 129, b) nucleótidos 130 a 240.	36
Figura 9. Dendrograma obtenido con base en el alineamiento Clustal W de secuencias nucleotídicas de 28 líneas de cacahuete bajo el método de máxima parsimonia con 1,000 remuestreos.....	38
Figura 10. Cromatograma del estándar de resveratrol y su estructura química, visualizado a 306 nm, con un tiempo de retención de 5.7 min.....	39

Figura 11. Cromatograma de HPLC del extracto de cacahuate de la muestra que corresponde al criollo de Chalpulhuacán, Hgo. que presenta la menor concentración, señalado con flecha el pico que representa al resveratrol, los demás pertenecen a compuestos no identificados.....40

Figura 12. Cromatograma de HPLC del extracto de cacahuate de la muestra que corresponde a 6-06CH, que presenta la mayor concentración, señalado con flecha el pico que representa al resveratrol, los demás pertenecen a compuestos no identificados.....43

ABREVIATURAS USADAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ATP: adenosín trifosfato.

Avr: genes de avirulencia.

cm: centímetro.

°C: grados Celcius.

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico.

g: gramos.

GLPL: glicina-leucina-prolina-leucina.

GTP: guanosín trifosfato.

HCl: ácido clorhídrico.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

kb: kilobase.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LRR: sitios ricos en leucina.

M: concentración molar.

Mg: miligramo.

μg: microgramo.

μL: microlitro.

mL: mililitro.

μM: micromolar.

mM: minimolar.

mm: milímetros.

NaCl: cloruro de sodio.

NBS: sitios de unión de nucleótidos.

ng: nanogramo.

nm: nanómetro.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PK: proteínas quinasas.

ppm: partes por millón.

Proteínas tipo TIR: proteínas tipo *Drosophila Toll* and human *Interleukine-1 like Receptors*.

R: resistencia.

RAHM o RAMPO: amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites.

RGA: análogos de genes de resistencia.

RP-HPLC: HPLC de fase reversa

Ser/Treo: serina/treonina.

TE: solución de Tris-HCl y EDTA.

TAE: solución de Tris-base, ácido acético glacial , EDTA.

TIR: dominio receptos de interleucina.

TM: dominio transmembranal.

t: tonelada.

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

v/v: volumen/volumen.

Dedicatorias

A mi mamá que siempre me alentó a seguir adelante, que superara mis miedos, a que no me rindiera bajo ninguna circunstancia para lograr hacer cosas importantes, y a trabajar duro. Que nunca perdió la confianza en mi, que me enseñaste el valor del trabajo y del conocimiento, gracias por que se que desde donde estas me sigues apoyando y sigues de la mano en cada paso que doy, te amo mamá.

A ti papá que me has ayudado en todo y que en el camino de la vida me haz apoyado en cada una de mis decisiones, por mostrarme que investigar, leer y adquirir cada día un nuevo conocimiento es una de las cosas mas hermosas de esta vida; por presionarme para que no me diera por vencida, por creer que si acabaría la maestría y por vivir cada emoción conmigo, te amo papá.

A mi hija que vivió conmigo de cerca cada emoción, por mostrar paciencia y amor pese a lo difícil de esta aventura, mi pequeña compañera de viaje. Gracias por mostrarme que el amor es incondicional y que este es un logro de ambas y de corazón espero que te sirva para que tu algún día ames la ciencia y el conocimiento, te amo hija.

A mi hermano que a sido mi apoyo, respaldo, amigo, y colega, por que me has alentado siempre y otras tantas me haz enseñado tu conocimiento en lo académico y en experiencias de vida, gracias por ser como eres, te amo hermano.

Agradecimientos

A CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por concederme financiamiento para cursar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo que me dio la oportunidad de ser orgullosamente parte de ella, pues me brindo la oportunidad de experimentar valiosas experiencias en lo académico y en lo personal que son fundamentales en mi vida.

A Dios por iluminar mi camino y llegar a este punto satisfactorio de mi vida.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por su ayuda, confianza, disposición, compromiso y por su inmensa sabiduría que hizo posible este gran proyecto.

A mi comité asesor Dr. Samuel Sánchez Domínguez por su aportación de los suministros de muestras con las que se conto en este proyecto, por sus amables aportaciones y disposición de enseñanza. Dra. Ma. Rosario García Mateos por su orientación y enseñanzas en la realizacion de la tesis. Dr. José Luis Rodríguez de la O por su orientación soporte y enseñanzas que contribuyeron a esta tesis.

A los tecnicos academicos María Elisa Alvarado Cano y Ricardo Gaspar Hernández por su entera disposición, enseñansas y facilitar el trabajo en el laboratorio molecular, ya que su guía fue parte fundamental para la realizacion de este proyecto.

Al Dr. Maximino Huerta Bravo y a la técnico académico Dra. Citlalli Celeste González Ariceaga por facilitar el uso del equipo HPLC del Laboratorio de Análisis Bromatológico del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombres: Luz Amalia Sánchez Avila.



Fecha de nacimiento: 9 de Diciembre de 1985.

Lugar de nacimiento: Tlalnepantla de Baz, Estado de México.

CURP: SAAL851209MMCNVZ08

Profesión: Químico Farmacéutico Biólogo.

Cédula profesional: 7563864.

Desarrollo académico

Bachillerato: 2001-2004 Preparatoria Anexa a la Normal No. 10 Cuautitlán Izcalli.

Licenciatura: 2005-2010 Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 UNAM

Maestría: 2014-2016 Universidad Autónoma Chapingo.

Experiencia Profesional

FES-C1 UNAM Como colaborador en Investigación Genotoxicológica. Donde tuve responsabilidades de manejo de un equipo de trabajo para crear un modelo para pruebas anticancerígenas, se trabajo con muestras biológicas.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CONTENIDO DE RESVERATROL DE LÍNEAS DE CACAHUATE
(*Arachis hypogaea* L.)**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND RESVERATROL CONTENT OF 30
GROUNDNUT (*Arachis hypogaea* L.) INBRED LINES**

Sánchez Á., L. A.¹; Peña O., M. G.²

RESUMEN

El cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) es una leguminosa tropical de importancia mundial con un genoma tetraploide de gran tamaño que dificulta la transferencia de genes de resistencia a patógenos provenientes de especies silvestres diploides. Por lo que la búsqueda de análogos de genes de resistencia (RGAs) en este cultivo es una estrategia de gran potencial. En el presente estudio se utilizaron nueve pares de iniciadores degenerados diseñados a partir de dominios presentes en las proteínas codificadas por genes de resistencia reconocidos en otras especies para realizar la detección de RGAs en 30 líneas. Los resultados obtenidos muestran que los materiales evaluados presentan RGAs que codifican proteínas tipo TIR (*Drosophila* Toll and human Interleukine-1 like Receptors) las cuales contienen una estructura homóloga a la interleuquina-1 humana y regiones receptoras similares a la Toll de *Drosophila* relacionadas con la resistencia a nematodos del nudo de la raíz, hongos causantes del manchado de las hojas y potyvirus, por lo que se esperaba que los materiales probados al ser enfrentados con fitopatógenos en ensayos bióticos mostrarán resistencia. Adicionalmente se evaluó el contenido de resveratrol en semillas crudas de las 30 líneas mediante HPLC encontrándose una gran diversidad en niveles de concentración, detectándose algunas líneas que por su alto contenido podrían representar una ventana de oportunidad para los productores para su uso en la industria de los alimentos y farmacológica.

Palabras clave: Análogos de genes de resistencia (RGAs), *Arachis hypogaea* L., resveratrol.

ABSTRACT

Ground nut (*Arachis hypogaea* L.) is a globally important tropical legume crop very important worldwide with a large-size tetraploid genome that hinders the of resistance genes to plant pathogens from wild diploid species. Therefore, searching for resistance gene analogs (RGAs) in this crop is a suitable strategy with great potential. In this study, nine pairs of degenerate primers designed from domains present in proteins codified by resistance genes from different species were used to detect the presence of RGA in 30 inbred lines. Results show that all evaluated lines have RGAs that specify resistance proteins of TIR (*Drosophila* Toll and human Interleukine-1 like Receptors) type which have been related to root-knot nematodes, potyvirus, and leaf spot fungi. Therefore, it is expected that evaluated materials would show resistance against these plant pathogens in biotic essays. In addition, resveratrol content in raw seeds of the 30 groundnut inbred lines was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Distinct concentration values were found, and some promising lines were detected with high potential for food and pharmacological uses.

Key words: Resistance gene analogs (RGAs), *Arachis hypogaea* L., resveratrol.

¹ Tsista.e

² Director

I. INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista económico, las leguminosas son la familia más importante dentro de las dicotiledóneas y son sólo superadas por las gramíneas (cereales) como cultivos alimentarios en la agricultura mundial. En comparación con los granos de cereales, las semillas de las leguminosas son ricas en proteínas de alta calidad, proporcionando una fuente de alimento de alto valor nutritivo en lugares marginales, ya que muchas especies de leguminosas se desarrollan bien bajo condiciones limitantes. Adicionalmente, las leguminosas juegan un papel clave en la rotación de cultivos, debido a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico.

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) es una leguminosa tropical perteneciente a la familia *Fabaceae*, originaria y cultivada en diferentes áreas México, Perú, Asia, África y Australia. Su principal uso es en la alimentación humana, ya sea consumiéndose directamente los granos tostados o industrializándolos para la extracción de aceite comestible. Además de su valor nutricional como fuente de proteínas, se le han atribuido propiedades medicinales, ya que su consumo regular ayuda a prevenir enfermedades cardíacas al reducir el colesterol; asimismo, estimula y regula la digestión, y evita parcialmente el cáncer de colon.

A diferencia de la gran diversidad morfológica que se puede observar en distintos cultivares de cacahuete, la diversidad genética de este cultivo monofilético es baja y carece de fuentes efectivas de resistencia a factores bióticos. Se piensa que se originó a partir de un solo evento de alotetraploidia de un híbrido entre dos especies diploides, el cual al ser sexualmente incompatible con sus progenitores silvestres permaneció aislado, dando como resultado un cuello de botella genético (Leal-Bertioli *et al.*, 2009).

La escasez de polimorfismo genético del cacahuete lo hace especialmente vulnerable a una amplia variedad de patógenos tales como el virus de la roseta del cacahuete, la roya (*Puccinia arachidis* Speg.), mancha web (*Phoma arachidicola*

Marasas, Pauer y Boerema), mancha foliar temprana (*Cercospora arachidicola* S. Hori), mancha foliar tardía (*Cercosporidium personatum* Berk y MA Curtis.), marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) y nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) (Ratnaparkhe *et al.*, 2011).

La transferencia de genes de resistencia a enfermedades procedentes de especies silvestres hacia los cultivares es particularmente difícil en cacahuete debido a los diferentes niveles de ploidía que causan una barrera de fertilidad. Por lo que la detección de genes endógenos de resistencia a patógenos resulta de suma importancia (Leal-Bertioli *et al.*, 2009)

En los últimos años han cobrado fuerza los esfuerzos para obtener una perspectiva de la evolución y organización genómica de secuencias relacionadas a la resistencia genética en cacahuete. Se ha encontrado que éstas comparten dominios altamente conservados como sitios de unión de nucleótidos (NBS), sitios ricos en leucina (LRR), proteínas quinasas (PK), dominio transmembranal (TM) y dominio receptor de interleucina (TIR). Estos dominios conservados facilitan el aislamiento de genes R o análogos de genes de resistencia (RGA) de la misma o de otras especies de plantas, los cuales una vez encontrados pueden ser transferidos por cruzamiento a cultivares que carezcan de ellos (Zhanji *et al.*, 2013).

Por otro lado, la preocupación social por la salud humana ha promovido investigaciones recientes sobre los derivados fitoquímicos con posibles efectos benéficos. El cacahuete ha sido identificado como una fuente de fitoquímicos tales como trans-resveratrol, fitoesteroles y las isoflavonas genisteína, y daidzeína. Se ha reportado que algunos de estos compuestos biológicamente activos pueden tener efectos antibacterianos, antivirales, anti-inflamatorios, anti-cancerígenos y estrogénicos, entre otros. En particular el resveratrol, es un polifenol, que ha sido clasificado como una fitoalexina debido a que se sintetiza en la planta como

respuesta a ciertos tipos de estrés. Sin embargo, este compuesto tiene la característica de contener en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, lo que le confiere una alta capacidad antioxidante entre otras características, por lo que resulta benéfico para la salud humana, de manera que la identificación de cultivares de cacahuete con altos contenidos de resveratrol permitirá incrementar su valor agregado en la industria alimenticia.

II. OBJETIVOS GENERALES

Analizar el ADN de líneas de cacahuate mediante marcadores moleculares para revelar la presencia de análogos de genes de resistencia a patógenos (RGA`s) que puedan ser utilizados dentro de un programa de mejoramiento de este cultivo.

Determinar el contenido de resveratrol en 30 líneas de cacahuate con objeto de identificar aquéllas con potencial de uso en la industria alimentaria.

III. HIPÓTESIS

Es posible detectar secuencias análogas de genes de resistencia a patógenos (RGAs) en líneas de cacahuate mediante el uso de marcadores moleculares.

Las líneas de cacahuate a evaluar presentarán distintos contenidos de resveratrol.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Generalidades del cultivo

El cacahuete es una dicotiledónea perteneciente a la familia *Leguminosae* (*Fabaceae*), subfamilia *Papilionoidae*, género *Arachis*. La planta consta de una parte aérea con ramificaciones, hojas y flores. Después de la fecundación, las flores forman ginóforos (porciones alargadas del receptáculo o del eje de algunas flores en cuyo ápice se dispone el gineceo) que se alargan y penetran en el suelo. El período desde el inicio de la fructificación hasta la cosecha dura de 40-50 días (INIFAP, 2002), y durante este lapso hay muchos agentes infecciosos (bióticos), como hongos y bacterias que pueden causar enfermedades a la planta.

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) es una planta originaria de las regiones limítrofes entre, Brasil, Argentina, Bolivia y Paraguay. Se sabe que era conocido desde la antigüedad al haberse encontrado cacahuates dentro de tumbas peruanas de la zona de Ancón que datan de por lo menos 1,200 años a.C. Se considera probable que este cultivo se haya originado en América del Sur, específicamente en Perú y que de ahí se haya propagado por el Nuevo Mundo cuando los exploradores españoles descubrieron su gran versatilidad en la elaboración de diferentes productos; más tarde los mercaderes difundieron el cultivo del cacahuete en Asia y África. En México ya era conocido por los nativos desde antes de la fundación de Tenochtitlan. Actualmente el cacahuete se cultiva en climas tropicales y subtropicales de Asia, Australia, África y América, donde destacan por su superficie sembrada India, con 6.4 millones de hectáreas, República Popular de China con 3.7 millones de hectáreas y Estados Unidos con 1.0 millón de hectáreas cultivadas al año. Otros países importantes son Sudán e Indonesia con 710 mil y 75 mil hectáreas, respectivamente (FAOSTAT, 2016).

La producción mundial de cacahuete en 2015 fue de 46 millones de toneladas. El principal productor fue China, con 35 % de la producción mundial, seguido por

India, Nigeria y Estados Unidos, con 14, 7 y 5 %, respectivamente (FAOSTAT, 2016).

En México, el cacahuete se cultiva en alrededor de 62,000 hectáreas, con una producción promedio anual de 60,000 t y un valor de la producción de 653 millones de pesos. Los principales estados productores son Sinaloa, Puebla, Chiapas, Oaxaca, Chihuahua y Guerrero, que en conjunto representan el 84 % de la superficie dedicada a este cultivo (SIAP, 2016).

4.2 Características bromatológicas del cacahuete

El consumo de cacahuete en México es de alrededor de 160,000 t anualmente; 145,000 se destinan al consumo humano, 6,000 al procesamiento industrial; 8,000 a usos diversos y 1,000 como semilla para siembra (SIAP, 2016).

La semilla de cacahuete posee un alto valor nutricional y comercial debido a la presencia de proteínas, ácidos grasos no saturados, carbohidratos y fibra, además de vitaminas, calcio y fósforo (Cuadro 1), lo cual garantiza un buen aporte de energía y proteínas a los consumidores. En México alrededor del 12 % de la producción se usa para la obtención de aceite y subproductos como mayonesa, mantequilla, pasteles y galletas. Otros productos industrializados que se obtienen de esta oleaginosa son tintas, lápices labiales, colores, productos farmacéuticos, lubricantes especiales y jabones. Sin embargo el 88 % restante se consume directamente después de tostado, así como en forma de palanqueta, garapiñado, dulces y botanas, ya sean salados o enchilados (Martínez *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Composición química promedio de la semilla de *Arachis hypogaea*.

CONCEPTO	PESO SECO %
Humedad	5.0
Proteína	28.5
Lípidos	46.3
Fibra cruda	2.8
Extracto Libre de Nitrógeno	13.3
Cenizas	2.9
Azúcares reducidos	0.2
Azúcares disacáridos	4.5
Almidón	4.0
Pentosas	2.5

Fuente: USDA, 2016.

Actualmente se ha enfatizado el papel del cacahuete como un alimento nutracéutico, ya que se considera que el consumo de 25 g al día proporciona más de la mitad de las vitaminas y 35 % de los minerales necesarios para un crecimiento sano. Asimismo la semilla de cacahuete contiene compuestos como: tocoferoles, flavonoides, fitoesteroles y resveratrol (30 veces superior al contenido en las uvas), por lo que se le atribuyen propiedades antitumorales, anti hipertensión, antioxidante y anti colesterol (Venkatachalam y Sathe 2006; Tuberoso *et al.*, 2007).

El resveratrol es un polifenol que ha sido clasificado como una fitoalexina, debido a que se sintetiza en espermatofitas en respuesta a ciertos tipos de estrés. La estructura de este compuesto presenta varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas, lo cual le confiere una alta capacidad antioxidante. Las principales fuentes alimenticias de donde obtenerlo son las uvas, el vino tinto y el cacahuete. Es considerado seguro sin efectos tóxicos identificados, incluso cuando se consume en grandes concentraciones. Las dosis usadas en los estudios son muy variables, con un promedio que se sitúa entre 0,5 a 1 g·día⁻¹.

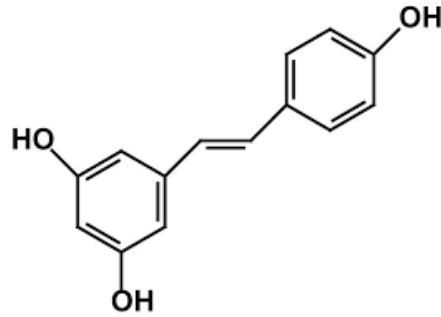


Figura 1. Estructura del resveratrol.

Algunos estudios sugieren que el resveratrol ejerce efectos quimiopreventivos sobre células cancerosas mediante la inhibición del ciclo celular (Wolter *et al.*, 2004). Con respecto al cáncer de próstata se postula que tiene capacidad para inhibir cada etapa de la carcinogénesis, limitar las poblaciones incipientes de células cancerígenas andrógeno-dependientes a través del antagonismo del receptor de andrógenos y por un cortocircuito en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que dependen de bucles autocrinos en las células cancerosas. Se ha postulado su uso para el control de peso ya que regula el número de adipocitos y la actividad lipolítica. En estudios con ratones se ha observado una disminución de patologías asociadas a la obesidad, como la degeneración hepática y una menor predisposición a la diabetes, así como un aumento del gasto de energía (Fischer-Posovszky *et al.*, 2010).

Al resveratrol también se le han atribuido efectos cardioprotectores pues se han detectado pequeñas reducciones en las fracciones de triglicéridos plasmáticos, colesterol LDL y apoproteínas E y B. Asimismo se ha especulado que puede tener un papel importante en la posible prevención de la oxidación de lípidos, la agregación plaquetaria y la vasodilatación arterial (Hung *et al.*, 2002). Adicionalmente se ha especulado acerca de que mejora la percepción cognitiva. Estudios con roedores han encontrado que el resveratrol puede ayudar a preservar la función cerebral dependiente de la edad y del daño cerebral así como producir beneficios directos en la función del sistema nervioso central mejorando el flujo sanguíneo y la perfusión. Se ha observado que en combinación con otros

polifenoles como el del vino tinto, aumenta la dilatación de las arteriolas cerebrales y mejora la perfusión cerebral post isquémica (Kennedy *et al.*, 2010). Por lo que el disponer de variedades mejoradas de cacahuate con un alto contenido de resveratrol podría representar una ventana de oportunidad para los productores de este cultivo.

4.3 Resistencia genética a enfermedades

Uno de los principales factores que limitan la producción de cacahuate en muchas partes del mundo es la presencia de enfermedades, las cuales se manifiestan como pudriciones de raíz, tallo y marchitez de las hojas, y pueden reducir la producción entre 10 y 30 %. Los agentes causales de estas enfermedades son principalmente hongos como *Rhizoctonia solani* y *Phitium spp.* (causantes del “damping off” o marchitamiento fúngico), *Sclerotium rolfsii* (podredumbre del tallo), *Sclerotinia minor* (tizón), *Macrophomina phaseolina* (pudrición carbonosa), *Cercosporidium personatum* (manchas foliares), *Puccinia arachidis* (roya), entre otros (Garrido *et al.*, 2011). Si bien para el control de estas enfermedades se pueden realizar aplicaciones de fungicidas químicos, la estrategia ecológicamente más amigable y económicamente más rentable es introducir resistencia genética en líneas comerciales, por lo que la búsqueda de genes de resistencia a enfermedades es de vital importancia dentro de los programas de mejoramiento genético de este cultivo (Leal-Bertioli *et al.*, 2009).

Los patógenos producen una gran diversidad de señales y algunas de éstas son detectadas por las plantas. Los genes de los patógenos que producen estas señales se denominan genes de avirulencia (Avr) y sus productos activan una respuesta de defensa en la planta que posee un gen de resistencia (R) apropiado. (De Wit, 1992). El resultado de esta interacción es la manifestación de la resistencia de la planta para ese patógeno específico. Sin embargo, ante cualquier modificación a esta interacción, la planta manifiesta una respuesta de sensibilidad al patógeno y se puede establecer una enfermedad.

La caracterización molecular de varios genes R de diversas especies de plantas, con especificidad para una amplia variedad de patógenos, ha revelado que éstos comúnmente codifican para proteínas de estructura similar aunque pueden ser altamente polimórficos. La mayoría de los que han sido ya clonados codifican una región denominada sitio de unión a nucleótidos (NBS), unida a repeticiones ricas en leucinas (LRR) de longitud variable localizado hacia la región carboxil-terminal. Un grupo de genes R codifica proteínas con una región denominada TIR, por su homología con un dominio que presenta la proteína Toll en *Drosophila melanogaster* y el receptor IL-1 en mamíferos; las secuencias TIR se localizan hacia la región N-terminal del NBS. Otros genes R no codifican un dominio TIR aunque el análisis de secuencias predice un motivo cierre de leucina en la región amino-terminal. Un análisis filogenético indica que los dominios NBS de plantas pueden ser categorizados en dos grupos mayores, un grupo TIR y un grupo sin TIR, la rama TIR consiste de secuencias exclusivamente de especies dicotiledóneas (Ratnaparkhe *et al.*, 2011).

Un mapeo físico sobre el genoma de *Arabidopsis*, demuestra que una gran proporción de estas secuencias que codifican NBSs tienden a agruparse en los cromosomas III, IV y V (Meyers *et al.*, 2003). En frijol, un estudio sobre la herencia de resistencia parcial contra *C. lindemuthianum* basada en QTLs, indica una co-localización de éstos y tres grupos de genes previamente mapeados involucrados en resistencia específica contra el mismo patógeno, además de algunos análogos de genes de resistencia (RGAs); todos ellos fueron localizados en una región que abarca 5 cM (González *et al.*, 2015). En este mismo sentido, otro estudio indica el agrupamiento de genes de resistencia a *C. lindemuthianum* identificando especificidades de origen Andino (Co-y; Co-z) y Mesoamericano (Co-9) a lo largo de un intervalo de 2.7 cM (Gonçalves-Vidigal *et al.*, 2007).

Estudios iniciales sugieren una asociación entre las características estructurales de las proteínas R y las rutas de señalamiento transduccional. La mayoría de los

genes R conocidos codifican para proteínas con dominios característicos de auténticos receptores encontrados en mamíferos, en *Drosophila* y levadura, de tal forma que es probable que desarrollen una función tipo receptor. Basados en los antecedentes de que dominios LRR en sistemas animales participan mediante interacciones proteína-proteína, se ha propuesto que en plantas interactúan con los estimuladores derivados del patógeno, y que estos mismos dominios podrían estar determinando la especificidad en la resistencia a la enfermedad.

En el caso de proteínas R de localización citoplásmica, no está del todo claro si el dominio LRR es la región que confiere especificidad; sin embargo, se acepta que éste es el dominio de reconocimiento. Otra función podría ser la dimerización o interacción con otros componentes río arriba o río abajo en la ruta de transducción de señales. Dada la variabilidad en la organización del dominio TIR, éste también puede ser responsable de algunos aspectos del reconocimiento del patógeno. En las secuencias NBS se ha demostrado la presencia de al menos tres dominios de unión a ATP/GTP conocidos como dominios quinasa-1a ó asa P, quinasa 2 y quinasa-3a, los cuales se unen al ATP y presentan actividad ATPasa.

En líneas de *Arabidopsis* mutantes en el gen de resistencia RPM1 se han determinado residuos funcionalmente importantes en la región NBS por lo que se ha sugerido que esta región es un elemento clave asociado con la respuesta de hipersensibilidad o con la estabilidad de la misma proteína R (Boyes *et al.*, 1998). Datos bioquímicos de proteínas relacionadas demuestran que el NBS forma oligómeros. Se sugiere que el dominio TIR actúa en forma similar al dominio citoplásmico del receptor Toll en *Drosophila* e IL-1 en mamíferos, los cuales liberan y/o activan factores de transcripción. Un paralelismo entre las rutas controladas por genes de resistencia en plantas y los receptores Toll en *Drosophila* y receptor IL-1 en mamíferos es estimular la producción de oxígeno activado y una explosión oxidativa, además de una modulación de las respuestas mediante la participación del ácido salicílico, en un nivel río abajo en la ruta de transducción de señales. Un planteamiento más general propone que los dominios

TIR están involucrados en la transducción de una señal a componentes río abajo en la ruta de señalamiento transduccional (Bowie y O'Neal, 2000).

Hasta ahora, alrededor de 70 genes R, que confieren resistencia a diversas enfermedades han sido identificados a partir de diferentes especies de plantas ya sea por clonación o métodos de marcaje de trasposones. Basándose en la presencia de dominios conservados específicos, los genes R de plantas pueden agruparse en al menos cinco clases: 1) genes R que contienen dominios NBS-LRR forman la clase más grande de genes R (Meyers *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2006). Esta clase puede ser dividida en dos sub-clases: 1a) TIR-NBS-LRR y 1b) no-TIR-NBS-LRR, basados en la presencia de un dominio TIR en el extremo N-terminal (Meyers *et al.*, 2003). Por ejemplo, el gen N de tabaco, que confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco, posee una NBS N-terminal y C-terminal de dominios LRR, además de un dominio TIR río arriba de NBS, mientras que el RPS2 de *Arabidopsis* que confiere resistencia a la bacteria *Pseudomonas syringae*, contiene un NBS N-terminal y al menos 14 C-terminales en el dominio LRR imperfecto con una espiral de la bobina (CC) río arriba del dominio NBS (Bent *et al.*, 1994).

2) La segunda clase de genes R se compone de aquellos dominios LRR y PK, tales como Xa21, que se encuentra en el arroz, con un dominio de serina/treonina quinasa intracelular y 23 LRRs extra citoplásmica. Xa21 confiere resistencia al tizón de la hoja de arroz, causado por la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. 3) La tercera clase son aquéllos que contienen treonina/quinasa (proteína quinasa) de dominio serina. Un ejemplo de esta clase es el gen Pto del jitomate que confiere resistencia a la mancha bacteriana causada por *Pseudomonas syringae* pv. tomate (Martin *et al.*, 1993). 4) La cuarta clase es la de los genes R que contienen grandes dominios LRR extracelulares, como el gen de jitomate Cf-2. El gen de la FQ-2, que proporciona resistencia a *Cladosporium fulvum*, contiene 37 LRR. 5) La quinta clase incluye todos los otros genes R, que confieren resistencia a los patógenos por diferentes mecanismos, tales como el gen Hm1 de maíz. Hm1

confiere resistencia a la mancha de la hoja causada por el hongo *Cochliobolus carbonum*. Hm1 fue el primer gen R clonado, y codifica para una enzima reductasa que detoxifica la HC-toxina de *C. carbonum* (Johal y Briggs, 1992).

Los NBS contienen un número variable de motivos de aminoácidos entre los que se encuentran el lazo-P, la quinasa-2 y el GLPL (gly-leu-pro-leu). Por lo que usando iniciadores degenerados diseñados a partir de estas secuencias, se ha desarrollado una técnica para identificar y aislar análogos de genes R (RGAs) en papa y soya (Yu *et al.*, 1996). Mediante esta técnica se puede amplificar un gran número de diversas regiones codificadoras de NBS. Estas regiones al ser clonadas han demostrado estar ligadas genéticamente a genes R de resistencia conocidos o ser fragmentos de los propios genes R (Peñuela *et al.*, 2002).

Las plantas cultivadas con genomas grandes como es el caso del cacahuate no se espera que sean completamente secuenciadas en un futuro cercano, por lo que la búsqueda de genes de resistencia a enfermedades en esta especie debe llevarse a cabo siguiendo la estrategia de genes candidatos. La comparación de secuencias de genes R de resistencia conocidos y sus homólogos en especies como soya, papa, frijol, etc., han permitido la construcción de iniciadores degenerados para PCR que amplifican regiones codificadoras de sitios de unión de nucleótidos (NBS), presentes en la mayoría de las proteínas codificadas por dichos genes de resistencia (Bertioli *et al.*, 2003).

La técnica de RGAs ha sido usada con éxito en la búsqueda de genes de resistencia a enfermedades en cacahuate por parte de Yuskel *et al.* (2005) y Leal-Bertioli *et al.* (2009).

4.4 Marcadores moleculares de ADN

Los organismos vivos pueden revelar regiones del genoma con diferentes secuencias nucleotídicas (polimorfismos) que los hacen diferentes de otros individuos y fungen como una huella genética y que por tanto puede ser usada

como un marcador molecular. Esta variabilidad o polimorfismos genéticos ocurren de manera natural entre y dentro de diferentes poblaciones de organismos (Hartl y Jones, 2009). Las diferencias son resultado de cambios o rearrreglos entre las bases que forman el ADN como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Estos marcadores pueden ser dominantes o codominantes y no son influenciados por el ambiente. Las huellas genómicas (DNA fingerprinting) hacen referencia a la identidad genética de un organismo, y se representan por los perfiles de ADN obtenidos mediante electroforesis, aunado al peso molecular de cada una de las bandas (Valadez y Kahl, 2005).

Los marcadores moleculares de ADN pueden agruparse en tres categorías, dependiendo el tipo de técnica que se utiliza para generarlos. La primera categoría se basa en la técnica de hibridación (Southern), cuyo propósito principal es explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos de ADN ocasionadas por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular. La segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (polymerase chain reaction). Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables no mayores de 6 kb en promedio. Estas secuencias pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas. La tercera categoría involucra metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern (Hartl y Jones, 2009).

Por ejemplo la técnica de RAHM o llamada también RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites), requiere de la síntesis previa de ADN con cualquiera de las metodologías de la PCR y la posterior hibridación con algún iniciador que detecte microsatélites, optimizando de esta manera la tipificación del ensayo, pues con el resultado de la PCR se detecta un patrón de fragmentos llamados de “primera generación” pero al hibridar las huellas con un iniciador radioactivo que detecta microsatélites se revela otro patrón llamado de “segunda generación” (Valadez y Kahl, 2005).

Las propiedades deseables de los marcadores moleculares deben ser: a) fácil acceso a cientos de caracteres (a veces miles) en un corto período de tiempo, b) alto nivel de polimorfismo, c) herencia codominante, d) designación no ambigua de alelos, e) ocurrencia frecuente en el genoma, f) comportamiento neutral (no son influidos por el ambiente), g) ensayos rápidos y fáciles y, h) alta reproducibilidad (Valadez, 2006). Los marcadores moleculares representan variación genética permitiendo estimar parentesco entre diferentes genotipos y, consecuentemente, predecir cuáles apareamientos producirán nuevas y superiores combinaciones de genes. Los principales usos son la realización de mapas genómicos, análisis de germoplasma como nuevas fuentes de variación, identificación de genotipos, detección de híbridos y determinación de rangos de autocruzas, análisis de pedigrí, etiquetado de genes que controlan caracteres de importancia comercial, elaboración de mapas de *loci* con rasgos cuantitativos, estudios de introgresión de genes, población genética y estudios taxonómicos y expansión del conocimiento sobre la estructura del genoma. Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse fácilmente (Rodney, 2001).

La técnica de PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, es una tecnología utilizada para multiplicar (sintetizar) *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma del individuo en estudio. Se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de secuencias de nucleótidos denominadas “iniciador” (primer), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual es complementaria. En forma general, los principales pasos del PCR son los siguientes: se extrae el ADN del material a analizar, se separa la molécula del ADN en dos hebras (desnaturalización), se induce el alineamiento o reconocimiento del iniciador con las secuencias blanco complementarias o molde del ADN, y por medio de la enzima Taq polimerasa se lleva a cabo la extensión o alargamiento de la molécula iniciadora. Este proceso

se realiza en un termociclador, que se encarga de realizar los cambios de temperatura necesarios para que se desarrollen las etapas o ciclos anteriormente mencionados. Los ciclos se repiten la cantidad de veces que sea necesario, hasta obtener la cantidad de copias de ADN que se requieran (Hartl y Jones, 2009).

Un iniciador es una cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesita un iniciador porque la mayoría de ADN polimerasas, enzimas que catalizan la replicación del ADN, no pueden empezar a sintetizar una nueva cadena de la nada, sino que sólo pueden añadir nucleótidos a una hebra preexistente. Por lo que se necesitan dos iniciadores para la reacción de PCR (“forward” y “reverse”), uno en el extremo 3' y el otro complementario al extremo 5' para la otra hebra. Estos iniciadores están formados por aproximadamente 10 a 20 nucleótidos debido a que es la cantidad necesaria para que de manera probable se una a un sitio específico de la cadena de ADN (Hartl and Jones, 2009).

La elección de la longitud de los iniciadores y de la temperatura de alineamiento depende de varias consideraciones. La temperatura de alineamiento de un iniciador se define como la temperatura a la cual el 50 % de esa misma especie de molécula de ADN forma una doble hélice estable y el otro 50 % se separa en moléculas de un solo filamento. La temperatura de alineamiento requerida aumenta con la longitud del iniciador. Los iniciadores que son demasiado cortos se anexarían en diversas posiciones en una larga plantilla de ADN, lo cual llevaría a copias no específicas. Por otro lado, la longitud del iniciador está limitada por la temperatura requerida para alinearlo. Las temperaturas de alineamiento muy altas, es decir por encima de los 80 °C, pueden causar problemas porque la ADN polimerasa es menos activa en esas temperaturas. La longitud óptima de un

iniciador generalmente está entre 20 y 30 nucleótidos con una temperatura de alineamiento de entre 55 y 65 °C (Haas *et al.*, 2003).

En plantas cultivadas con genomas grandes su secuenciación completa requerirá de mucho tiempo, por lo que cuando se desea detectar la presencia de genes relacionados por ejemplo con la resistencia a enfermedades, se puede recurrir a la información disponible en el banco mundial de genes (GenBank) para otras especies y utilizar su secuencia para diseñar iniciadores degenerados para mediante PCR detectar secuencias homólogas en un cultivo no secuenciado aún (Bertioli *et al.*, 2003). Los iniciadores degenerados se definen como una mezcla de secuencias oligonucleotídicas en las cuales algunas posiciones contienen un número de bases posibles proporcionando una población de iniciadores con secuencias similares que cubren todas las posibles combinaciones de nucleótidos que codifican para una proteína dada (Iserte *et al.*, 2013).

4.5 Método de separación

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. La cromatografía líquida clásica se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Luego de inyectar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad (Skoog *et al.*, 2014).

Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones el tamaño de la fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluyera la fase móvil. De esta manera nació la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas. A diferencia de la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta resolución

no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra.

La HPLC es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. Con una fase móvil líquida interactiva, otro parámetro se encuentra disponible para la selectividad, en adición a una fase estacionaria activa. Ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación (Castro *et al.*, 2004).

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , donde el R es una cadena alquílica tal como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin ninguna especificación adicional. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar. La fuerza conductora en la unión del compuesto a la fase estacionaria es la disminución del área del segmento apolar del analito expuesto al disolvente. Este efecto hidrofóbico está dominado por el aumento de la entropía, y la consecuente disminución de la energía libre, asociada con la minimización de la interfase compuesto-disolvente polar. El efecto hidrofóbico disminuye con la adición de disolvente apolar a la fase móvil. Esto modifica el coeficiente de partición de forma que el compuesto se mueve por la columna y eluye (Castro *et al.*, 2004).

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la

retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida. Aparte de la hidrofobicidad de la fase inmóvil, otras modificaciones de la fase móvil pueden afectar la retención del compuesto; por ejemplo, la adición de sales inorgánicas provoca un aumento lineal en la tensión superficial, y como la entropía de la interface compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, la adición de sales tiende a aumentar el tiempo de retención (Castro *et al.*, 2004).

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como el fosfato de sodio para controlar el valor del pH. Estos tampones también neutralizan la carga o cualquiera resto de sílica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contra iones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica.

Las columnas de fase reversa se echan a perder con menor facilidad que las columnas de sílica normales. Aun así, muchas columnas de fase reversa están formadas por sílica modificada con cadenas alquil y no se deben utilizar nunca con bases en medio acuoso puesto que éstas podrían dañar el esqueleto de sílica subyacente. Las columnas se pueden utilizar en ácidos en medio acuoso pero no deben estar expuestas demasiado tiempo al ácido porque éste puede corroer las partes metálicas del aparato de HPLC (Castro *et al.*, 2004).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

En el presente estudio se evaluaron 30 líneas provenientes del programa de mejoramiento genético de cacahuate de la Universidad Autónoma Chapingo (Cuadro 2). Los estudios de caracterización molecular se llevaron a cabo en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia, mientras que la determinación del contenido de resveratrol se realizó en el Laboratorio de Análisis Bromatológico del Departamento de Posgrado de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, la cual se localiza en el Estado de México, entre las coordenadas 19° 29' 34.61" LN, 98° 53' 06.93" LO, a 2,254 msnm.

Cuadro 2. Líneas de cacahuate utilizadas para la búsqueda de análogos de genes de resistencia (RGA)s y determinación de contenido de resveratrol en semilla.

No.	Nombre	No.	Nombre	No.	Nombre
1.	13-06CH	11.	23-06CH	21.	Río Balsas
2.	Criollo de Chalpulhuacán, Hgo.	12.	Criollo de Cuauchi	22.	12-06CH
3.	11-06CH	13.	25-06CH	23.	Chin-Nay
4.	15-06CH	14.	C. Ocozocuautila	24.	Ter-Sal
5.	2-06CH	15.	21-06CH	25.	8-06CH
6.	4-06CH	16.	6-06CH	26.	Rastrera de Pte. de Ixtla
7.	14-06CH	17.	19-06CH	27.	18-06CH
8.	Chino Huazulco	18.	5-06CH	28.	NC-17UACH
9.	17-06CH	19.	Rojo de Cuauchi	29.	CRSCH
10.	16-06CH	20.	9-06CH	30.	14R-14

5.2 Caracterización molecular

5.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN 10 semillas de cada línea de cacahuate se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades y se mantuvieron bajo condiciones

de invernadero hasta que las plantas alcanzaron una altura aproximada de 8 cm momento en el cual se colectaron hojas jóvenes. El ADN se extrajo utilizando el método propuesto por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones: Se tomaron hojas jóvenes, limpias y sanas y se lavaron con alcohol al 70 %, dejándose escurrir en papel secante. Se pesó 0.3 g de cada muestra y se colocaron en un mortero, se agregó nitrógeno líquido cubriendo por completo la muestra, se molió hasta obtener un polvo fino, el cual se transfirió con una espátula a un microtubo de 1.5 mL, conteniendo 700 μ L de amortiguador de extracción precalentado (Tris-HCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol, SDS 1.3 %, pH 8.0) se agitó por inversión, hasta homogenizar, se calentó a 65 °C, durante 10 minutos, se agregaron 200 μ L de acetato de potasio 5 M, se colocó en baño de hielo de 30 a 60 minutos, posteriormente se centrifugó por 20 minutos a 12 000 xg y el sobrenadante se transfirió a otro microtubo que contenía 600 μ L de isopropanol enfriado previamente, se dejó a -20 °C de 30 a 60 minutos, para permitir que el ADN precipitara, después se centrifugó a 6000 xg durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante con cuidado que no se perdiera la pastilla de ADN, se agregaron 700 μ L de amortiguador para disolver (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y se dejó toda la noche a 4 °C. Una vez que se disolvió el ADN, se agregaron 4 μ L de ARNasa (10 mg·mL⁻¹) y se incubó a 37 °C por lo menos una hora, se vuelve a precipitar el ADN adicionando 75 μ L de acetato de sodio 3 M y 500 μ L de isopropanol frío, se dejó a -20 °C por una a dos horas, se centrifugó a 8000 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de ADN se lavó con etanol al 70 % (grado reactivo), se centrifugó nuevamente a 8000 xg por 5 minutos se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el ADN a temperatura ambiente y finalmente se disolvió en 50 μ L de TE pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se guardó a 4 °C.

5.2.2 Evaluación de la cantidad y calidad del ADN

La concentración del ADN obtenido de las distintas muestras se midió en un espectrofotómetro GENESYS 10 UV, para lo cual se hizo lo siguiente: a 597 μ L de

agua destilada contenidos en un microtubo de 1.5 mL se le agregaron 3 μL de la solución de ADN extraído, se mezcló por inversión, después se transfirió a una celda de cuarzo y ésta se colocó en el espectrofotómetro y se tomó la lectura a 260 nm. Para calcular la concentración de ADN se usó la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN } \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \times \text{Factor de dilución}\cdot 1000^{-1}$$

La calidad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para ello se hizo lo siguiente: en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se pesaron 0.8 g de agarosa, se adicionó 100 mL de amortiguador TAE 1X (Tris-base 2 M, ácido acético glacial 50 mM aprox., EDTA 50 mM), y se calentó casi a punto de ebullición cuidando que no se derrama, se agitó vigorosamente durante unos segundos, se repitió la operación hasta que la agarosa se disolvió, se dejó enfriar aproximadamente a 50 °C durante 20 minutos. Se ensambló la cámara de electroforesis, se niveló y entonces la agarosa fue vertida en el portageles, cuidando que no se formaran burbujas, se dejó solidificar durante 20 minutos, se retiró el peine y los aditamentos que se usaron para preparar el gel y se agregó amortiguador de corrimiento TAE 0.25 X (Tris-base 2 M, ácido acético glacial 50 mM aprox., EDTA 50 mM) hasta cubrir el gel.

Para cada línea se hizo una mezcla (“bulk”) agregando la misma cantidad de ADN de cada una de las plantas muestreadas, el cual había sido previamente homogeneizado a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. De cada mezcla se tomaron 10 μL a los cuales se les adicionaron 2 μL de amortiguador de carga 1 X (sacarosa 65 %, Tris-HCl pH 7.5 10 mM, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0.3 %) y se depositaron en cada pozo del gel.

Una vez cargadas todas las muestras en el gel, se colocó la tapa de la cámara y se conectó a la fuente de poder. La electroforesis se desarrolló a 200 voltios por aproximadamente 1 hora 30 minutos, cuando el colorante azul de bromofenol recorrió las dos terceras partes del gel. En ese momento se desconectó y se desmontó la cámara, se retiró el gel escurriéndolo bien y se colocó en una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) para teñirlo durante 15 minutos. Con

ayuda de una espátula se retiró el gel del bromuro de etidio y se colocó en el transiluminador de un fotodocumentador “DigiDoc-it Imaging System” (marca UVP) y se fotografió.

5.3 Selección de iniciadores y amplificación

Para la búsqueda de análogos de genes de resistencia en las líneas de cacahuate se seleccionaron 9 pares de iniciadores (secuencia hacia adelante y reversa) propuestos por diversos investigadores en trabajo previos realizados en este cultivo, cuyas características y secuencias se presentan en el Cuadro 5.

Para cada par de iniciadores se usaron las temperaturas de alineamiento recomendadas. Los componentes de la mezcla de reacción se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Componentes de la mezcla de reacción en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR) para la detección de análogos de genes de resistencia (RGAs).

Componentes de la mezcla	Volumen en μL
H ₂ O grado biología molecular	5.2 μL
dNTP's (500 μM)	10.0
Amortiguador de PCR (10 X)	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.5
Iniciador (10 ng· μL^{-1})	3.0
Enzima (5 U· μL^{-1})	2.5
ADN genómico (10 ng· μL^{-1})	0.3

En un microtubo de 1.5 mL se fueron agregando en el orden indicado, cada uno de los componentes, a excepción del iniciador. Después de adicionar la enzima ADN *taq* polimerasa, la mezcla se agitó muy bien y se centrifugó. En microtubos de 0.2 mL, debidamente etiquetados, se colocaron 22 μL de la mezcla de reacción y 3 μL de cada iniciador y se mezcló bien. La PCR se llevó a cabo en un termociclador TECHNE TC-412 con el programa que se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR para la detección de análogos de genes de resistencia (RGAs).

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Ciclos
Pre-desnaturalización	93	8	1
Desnaturalización	93	1	40
Alineamiento	Z	1	
Extensión	72	4	
Extensión final	72	6	1
Enfriamiento	10	-	-

z Dependió de cada iniciador

La separación de productos amplificados se hizo mediante un gel de agarosa al 1 %. En cada uno de los pozos del gel se depositaron 4 μ L de marcador de peso molecular (Invitrogen de 1 kb Plus DNA Ladder Cat. No. 10787-018), se colocó la tapa a la cámara y se conectó a la fuente de energía, se puso a un voltaje de 104 voltios durante 2 horas; cuando el tiempo concluyó el gel fue colocado en una solución de bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 15 minutos. Después con el apoyo de una espátula se retiró el gel se colocó en el transiluminador y se documentó con una cámara EDAS 290.

Una vez que se obtuvieron las bandas amplificadas por cada par de iniciadores se eligieron los S48-2F y se realizó nuevamente la amplificación en las 30 líneas de cacahuete utilizando una taq ADN polimerasa de alta resolución. Después se extrajeron las bandas del gel y se obtuvieron sus secuencias de nucleótidos mediante un secuenciador automático ABI 3700.

Cuadro 5. Características de los iniciadores utilizados para la detección de análogos de genes de resistencia (RAGs) en 30 líneas de cacahuate.

Iniciador	Referencia	Motivo	Secuencia Motivo	Secuencia iniciador 5' - 3'	Tamaño del producto pb
S48-2F-fwd	Leal et al.(2007)	S4_164		CAGGAGAATGTGATTGGTTTA	215
S48-2F-rev				TTGAGCATAATGTATTGCTT	
C8V11R-fwd	Leal et al.(2007)	Incompleto		TCGCTTGTTACGTACAAAGCA	260
C8V11R-rev				TTTAGGTGACACTATAGAATA	
S534-R-fwd	Leal et al.(2007)	S5_A_384		CCCAATTTGAAGAACACTGCA	314
S534-R-rev				AAACAGTGTTACTCCATGTGA	
S5-26-F-fwd	Leal et al.(2007)	S5_A_378		GGCAGTGTATAATTGGCTTGT	418
S5-26-F-rev				TGAAACTGAGCAATTCTAGAG	
SMP7_3-F-fwd	Leal et al.(2007)	SmpD6_A_56P		TCCATATATTGTGTAATGGATTT	222
SMP7_3-F-rev				CATCATCAAGAACAACAAGAACAA	
PNTR-fwd	Peñuela et al. (2002)	P-loop	GGVGKTT	GGNGGNGTNGGNAANACNAC	600
PNTR-rev		RNBS-D	CFLYCALFP	CGRAANARNSHRCARTANVNRAAR C	
PCRE-fwd	Lagudah et al. (1998)	Kinase-2	LILDDVW	TGATACTGGATGATGTCTGG	600
PCRE-rev		EGF	EGFIRNT	GTGCTTCTTATGAACCCTTC	
PPTO-fwd	Leung et al. (1998)	Pto kinase 1		GCATTGGAACAAGGTGAA	400
PPTO-rev		Pto kinase 2		AGGGGGACCACCACGTAG	
PCf-fwd	Ohmori <i>et al.</i> (1998)	LRR	SNKLGPI	WSNAAYAARYTNCAYGGNCCNAT	450
PCf-rev		LRR	GEIPQQLA	GCNARYTGTCKNGGNATYTCNCC	

Código Degenerado: N=A, G, C o T, R=A o G, H=A, C o T, S=C o G, V=A, C o G W=A or T, Y=C o T, K=G o T.

5.4 Determinación de resveratrol

Para determinar el contenido de resveratrol de las 30 líneas de cacahuete estudiadas se procedió a limpiar las semillas crudas retirándoles la cubierta, se molió 1.5 g de cada muestra. Luego se realizó la extracción para lo cual a las muestras se les añadió 6 mL de una mezcla metanol/agua a 70/30 v/v (ambos grado HPLC marca Sigma®). Las suspensiones se sonicaron por 60 minutos a una intensidad de $0.50 \text{ W}\cdot(\text{cm}^2)^{-1}$ en un baño de 450 W y luego se transfirieron a viales ámbar, se dejaron en agitación por 24 h (modificado de Chukwumah *et al.*, 2009). Subsecuentemente los extractos se pasaron por un papel filtro No. 2 de Whatman, y se aforo a un volumen total de 10 mL, los cuales se llevaron a sequedad en un rota evaporador a 35 °C. Luego se resuspendieron las muestras en 1.5 mL de metanol grado HPLC y se filtraron con acrodiscos de nylon de 0.42 mm (modificado de Rosales *et al.*, 2014).

Los extractos filtrados se analizaron en un sistema de cromatografía líquida, con un detector UV/Vis en un equipo HPLC Perkin Elmer. La separación de los compuestos se realizó en una columna de fase inversa de (C18 150x4.6 mm Perkin Elmer), la cual se mantuvo a temperatura ambiente. Se utilizó un caudal constante de $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ usando dos disolventes: el disolvente A estuvo formado por acetonitrilo al 80 % y 20 % del disolvente B, el cual a su vez estuvo conformado por 52.6 ml de ácido acético glacial en 900 ml de agua (grado HPLC). El perfil de elución fue el siguiente: 0 min: 22 A, 78 B; 5 min: 22 A, 78 B; 25 min: 100 A, 0 B. Se tomaron 20 μL por muestra para el análisis. Como estándar se usó resveratrol (Sigma-Aldrich®) el cual se suspendió en metanol. Los eluatos se monitorearon a 306 nm para el trans-resveratrol (Chukwumah *et al.*, 2009).

Para la cuantificación del contenido de resveratrol por HPLC se prepararon soluciones estándar de metanol a 5, 15, 25, 35, 45, 50, 100, 150, 300 y 600 ppm y se obtuvo el espectro de absorción a 306 nm. Con los resultados obtenidos se construyó la curva de calibración para relacionar el tiempo de retención de cada

estándar con tiempos de retención y área bajo la curva de los cromatogramas de las diferentes muestras Figura 2.

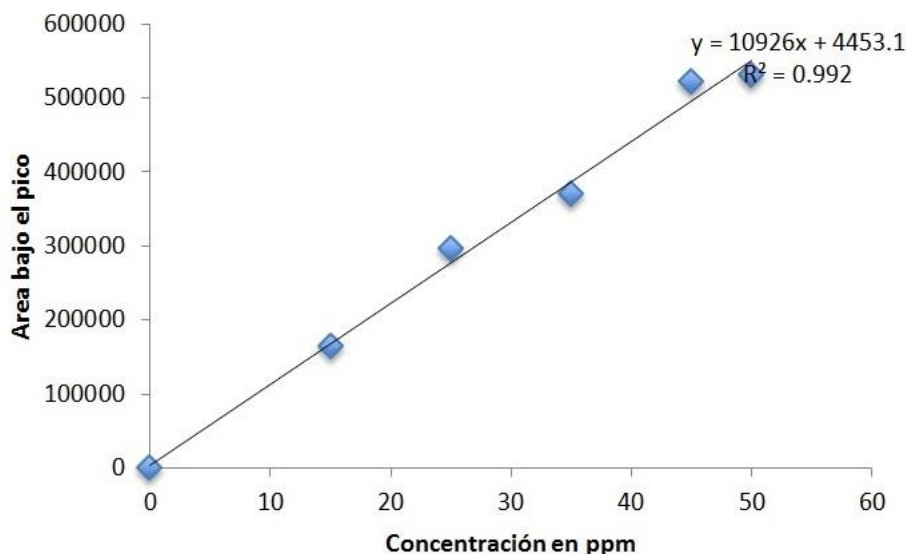


Figura 2. Curva de calibración obtenida a partir de la solución estándar de resveratrol

5.5 Análisis de resultados

Los secuenciogramas obtenidos de los RGAs detectados en las 30 líneas de cacahuate mediante la amplificación con los iniciadores S48-2F fueron limpiados (eliminación de los extremos redundantes) y se voltearon las secuencias reversas por medio del programa CHROMAS Ver. 2.5.0. Luego se usó el programa SEQMAN Pro de DNASTar para obtener las secuencias de consenso. Estas secuencias fueron utilizadas para realizar una búsqueda en el GenBank mediante el método BLAST para identificar secuencias homólogas registradas. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple con el programa Mega ver. 7.0.14 de las líneas con el método Clustal W, se obtuvieron distancias entre pares de accesiones y finalmente se procedió a construir un dendrograma para visualizar las similitudes y diferencias entre las líneas de cacahuate para el RGA detectado. Se realizaron 1,000 remuestreos (bootstrap) para obtener el árbol de consenso.

Para la determinación del contenido de resveratrol en las semillas de las 30 líneas

de cacahuate estudiadas se procedió a construir una curva de calibración y con las áreas bajo los picos de cada uno de los cromatogramas obtenidos se procedió a calcular las concentraciones utilizando un modelo de regresión lineal.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Detección de RGAs

El gel de calidad de ADN (Apéndice 1) mostró bandas claras y bien definidas lo que corrobora que el ADN extraído de las 30 líneas de cacahuate tuvo buena calidad. Asimismo, se obtuvieron altas concentraciones de ADN las cuales estuvieron entre 365 y 1,220 ng· μ L⁻¹. La pureza del ADN se evaluó por espectrofotometría con un NanoDrop, en donde todas las muestras produjeron una relación de absorbancia 260/280 nm de 1.8, la cual indica ADN puro.

En cuanto a la detección de análogos de genes de resistencia (RGAs), sólo cuatro de los 9 pares de iniciadores evaluados amplificaron la banda objetivo. En el caso de los iniciadores S48-2F produjeron una banda de 215 pb presente en todas las líneas evaluadas con excepción de la línea 9 (17-06CH) la cual mostró una banda de mayor longitud (Figura 3). Estos resultados sugieren que la mayoría de las líneas de cacahuate presentan la secuencia de consenso derivada del clon S4_164 perteneciente a la especie silvestre *A. stenosperma*, la cual presenta el genoma AA de *A. hypogaea* y se ha reconocido como una valiosa fuente de genes de resistencia (Bertioli *et al.*, 2003). En particular este clon presenta resistencia a un par de nematodos causantes del nudo de la raíz *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica*, así como a los hongos que provocan la manchas prieta de las hojas *Cercosporidium personatum* y la mancha parda *Cercospora arachidicola* (Guimaraes *et al.*, 2005). Por lo que la presencia de esta banda en las líneas de cacahuate evaluadas sugiere que esos materiales mejorados podrían tener resistencia genética a estos patógenos, lo cual tendría que ser corroborado mediante ensayos bióticos con exposición a éstos.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 B M

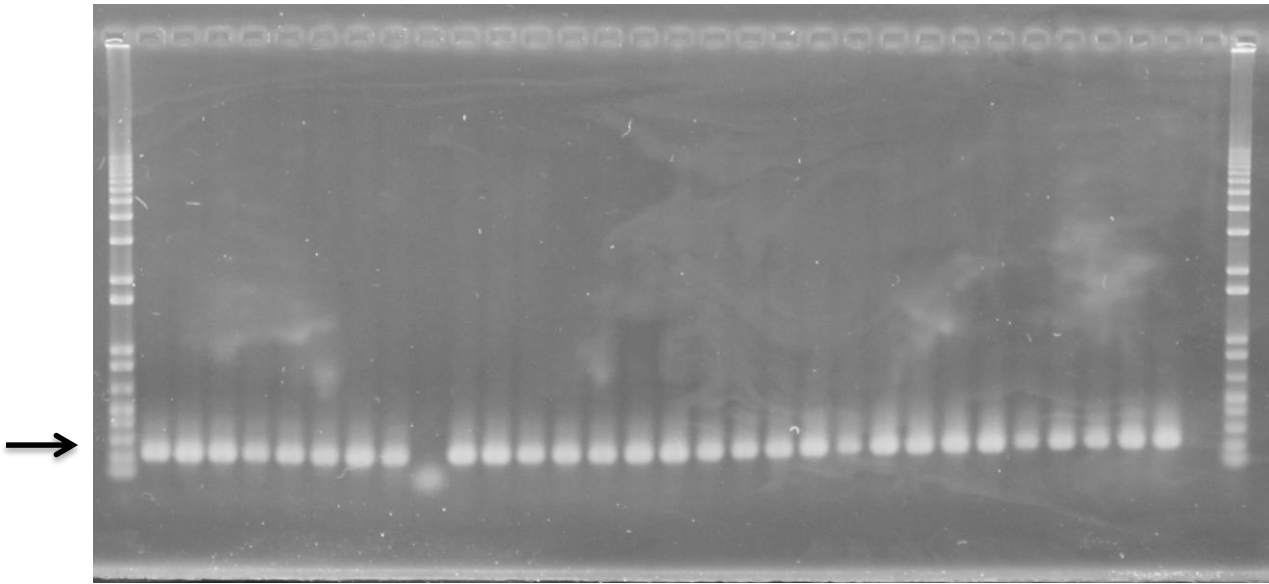


Figura 3. Gel de agarosa que muestra el resultado de la amplificación utilizando los iniciadores S48-2F en el que se puede apreciar la banda esperada de un peso de 215 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.

El segundo par de iniciadores utilizado, CV811R proveniente del pariente silvestre del cacahuate *Arachis cardenasii*, a pesar de producir diferentes bandas no amplificó aquella asociada con el RGA esperada de 260 pb (Figura 4), lo cual sugiere que las líneas de cacahuate evaluadas no presentan análogos de genes de resistencia similares a los provenientes de *A. cardenasii*. Este pariente silvestre ha sido reconocido como una fuente de resistencia genética al nematodo del nudo de la raíz, *Meloydogine arenaria* Neal (Chitwood) compatible con *A. hypogaea* (Nelson *et al.*, 1990)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 BM

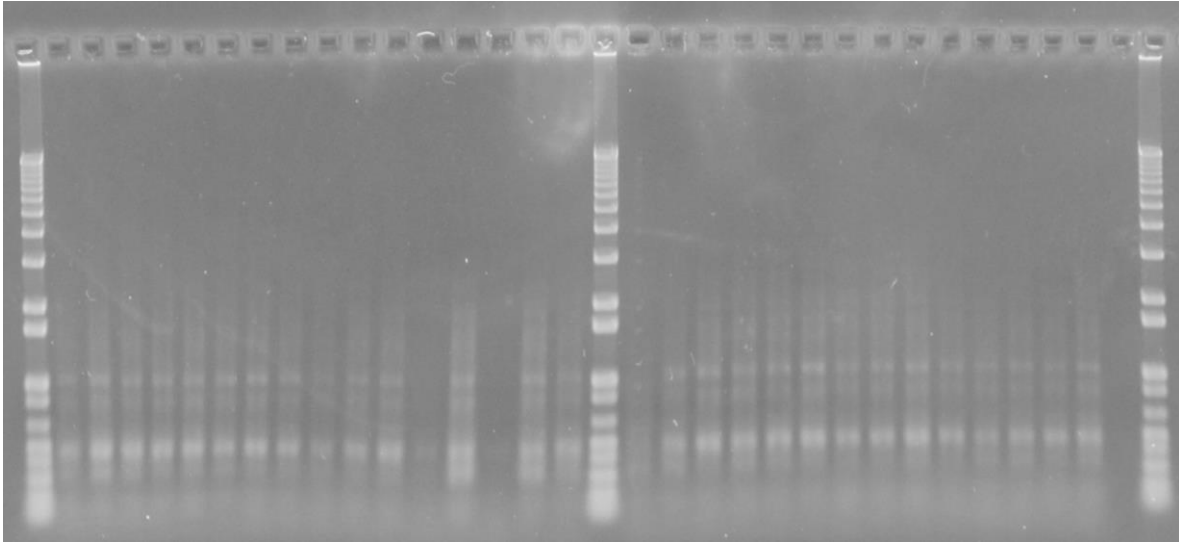


Figura 4. Gel de agarosa que muestra la amplificación obtenida con iniciadores CV811 en el cual no aparece la banda deseada que corresponde a un peso de 260 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.

Los iniciadores S534R produjeron en todas las líneas de cacahuate evaluadas una banda de 314 pb correspondiente al RGA esperado (Figura 5). Estos iniciadores fueron diseñados con base en el clon S5_A_384 proveniente nuevamente de *Arachis stenosperma*, el cual mostró similitud genética con genes TIR de resistencia identificados en *Medicago truncatula* (Bertioli *et al.*, 2003). Estos genes de resistencia en plantas se caracterizan por especificar proteínas que contienen una estructura homóloga a la interleuquina-1 humana y regiones receptoras similares a la Toll de *Drosophila* como el gen *N* de resistencia al virus del mosaico del tabaco (Whitham *et al.* 1996) y los genes *L6* y *M* de resistencia a la roya del lino (Lawrence *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que las líneas de cacahuate evaluadas podrían tener RGAs asociados con la resistencia genética a virus y hongos fitopatógenos, la cual tendría que ser evaluada en ensayos bióticos de exposición a los agentes patogénicos.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 B M

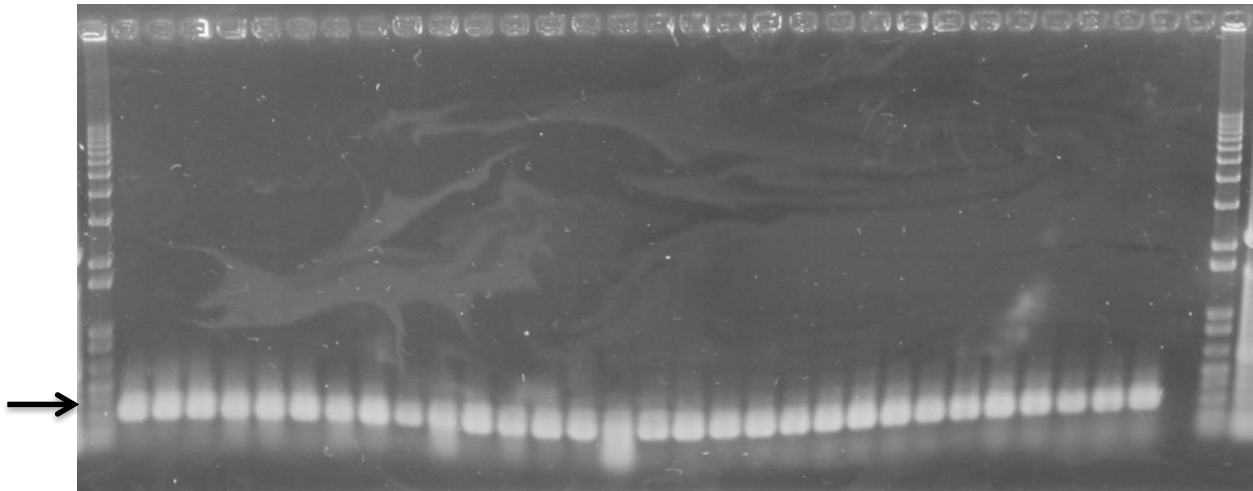


Figura 5. Amplificación utilizando los iniciadores S534-R, donde se aprecia la banda esperada con un peso de 314 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.

Los iniciadores S5-26-F derivados del clon S5_A_378 también de *Arachis stenosperma* amplificaron una banda de 418 pb asociada al RGA en las 30 líneas de cacahuate bajo estudio (Figura 6). Esta secuencia se ha agrupado con secuencias similares en el género *Arachis*, corresponde también a genes que especifican proteínas TIR pero adicionalmente presentan homología con genes de resistencia de soya (*Glycine max*), los cuales codifican tres motivos del sitio de unión de nucleótidos (NBS): lazo-P, quinasa-2 y quinasa-3, los cuales han sido mapeados en la vecindad de genes de resistencia a potyvirus (*Rsv1* y *Rpy*), pudrición de raíz ocasionada por *Phytophthora* (*Rps1*, *Rps2* y *Rps3*) y a cenicilla vellosa (*rmd*) (Yu *et al.*, 1996). Estos resultados ratifican la presencia en las líneas mejoradas de cacahuate de RGAs asociados a resistencia genética a virus y hongos.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 B M

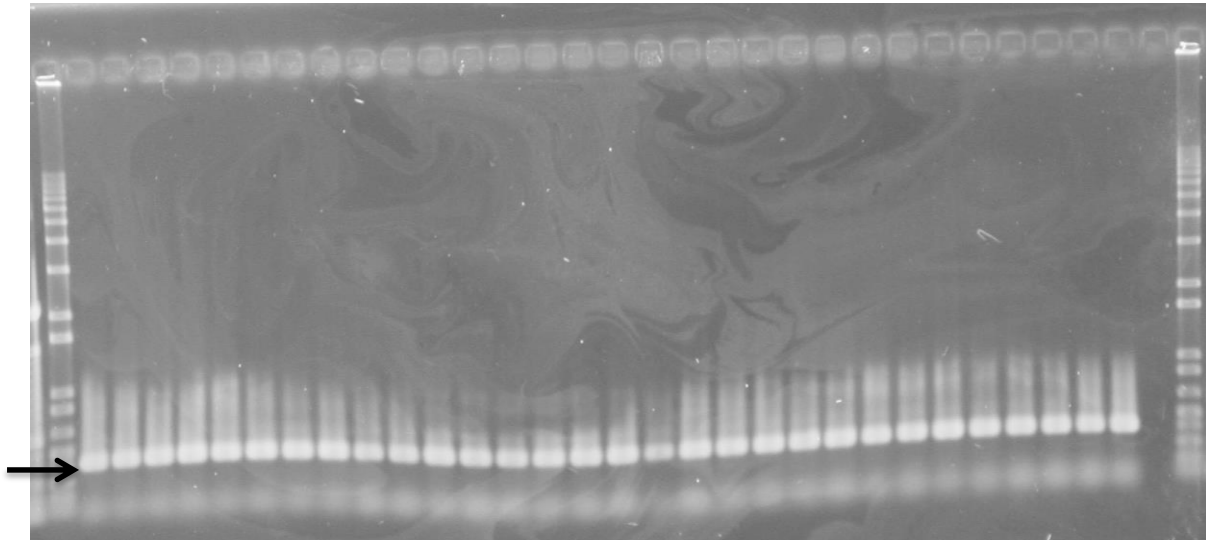


Figura 6. Gel correspondiente a la amplificación utilizando los iniciadores S5-26-F que muestra la banda deseada con un peso de 418 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.

Los iniciadores SMP7_3-F y PNTR no produjeron amplificación en ninguna de las 30 líneas de cacahuate evaluadas por lo que no se observaron las bandas esperadas de 222 y 600 pb, respectivamente. Estos resultados indican que las líneas mejoradas no presentan secuencias homólogas a *Arachis simpsonii* Krapov.&W.C. Greg, una de las especies silvestres que posee el genoma A del cacahuate cultivado y por tanto cercanamente relacionada con él y que ha sido considerada como valiosa fuente de genes de resistencia a incorporar en *A. hypogaea* (Milla *et al.*, 2005).

Por su parte el no haber amplificado secuencias con los iniciadores PNTR sugieren que las líneas estudiadas no presentan secuencias homólogas No-TIR, es decir, a aquéllas que codifican para proteínas de hélices superenrolladas, como las que se presentan en soya (Peñuela *et al.*, 2002).

Los iniciadores PCRE sí amplificaron una banda de 600 pb en todas las 30 líneas bajo estudio (Figura 7). Estas secuencias fueron derivadas del gen de resistencia Cre3 a nematodo del quiste en trigo, por lo que este resultado corrobora lo

señalado para los iniciadores S48-2F asociados a RGAs de resistencia a nematodos. De manera que puede suponerse que las líneas mejoradas poseen secuencias del tipo LZ-NBS-LRR, es decir, contienen un motivo de cierre de leucina, el sitio de unión de los nucleótidos y una repetición rica en leucina (Yuzkel *et al.*, 2005)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 B M

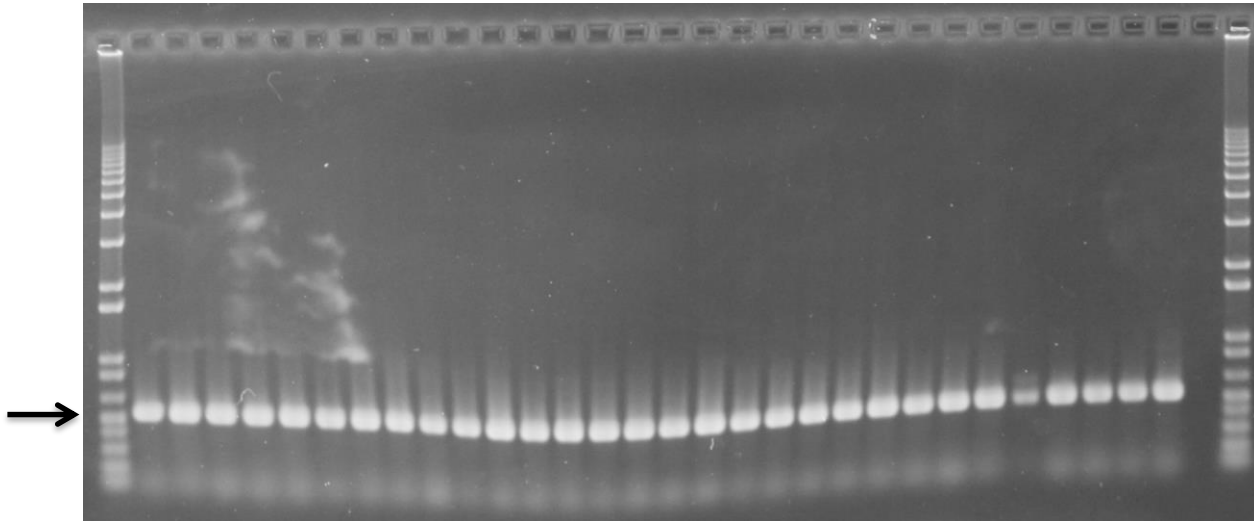


Figura 7. Gel correspondiente a la amplificación utilizando los iniciadores PCRE, donde la banda objetivo es de 600 pb. M: marcador de peso molecular Invitrogen® de 1 kb, B: blanco.

Por último, los iniciadores PPTO y PCf no produjeron amplificación en ninguna de las 30 líneas de cacahuate estudiadas, lo cual sugiere que éstas carecen de secuencias homólogas al gen *Pto* de jitomate que proporciona resistencia a *Pseudomonas syringae* pv tomato, agente causal de la peca bacteriana, el cual codifica para una proteína que contiene un dominio quinasa Ser/Treo sólo citoplásmico. Asimismo, estos materiales carecen de secuencias homólogas al gen de resistencia *Cf* de jitomate que confiere resistencia al hongo *Cladosporium fulvum* que provoca la cladosporiosis y codifica para una proteína con dominio LRR extracitoplásmico y un corto dominio TM (transmembranal) (Yuksel, 2005).

6.2 Corroboración de RGAs

Para confirmar que los productos amplificados fueran RGAs, las bandas del gel correspondiente a los iniciadores S48-2F fueron extraídas de éste, remojadas en 100 µL de agua destilada, que fue esterilizada en autoclave por una noche y se mantuvieron a 95 °C por 5 min. Una alícuota de 5 µL fue usada como molde para la PCR bajo las mismas condiciones de la amplificación original pero utilizando una ADN taq polimerasa de alta fidelidad marca Thermo Fisher Sci. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa mediante electroforesis, purificados y secuenciados en un secuenciador ABI 3700 (Applied Biosystems) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

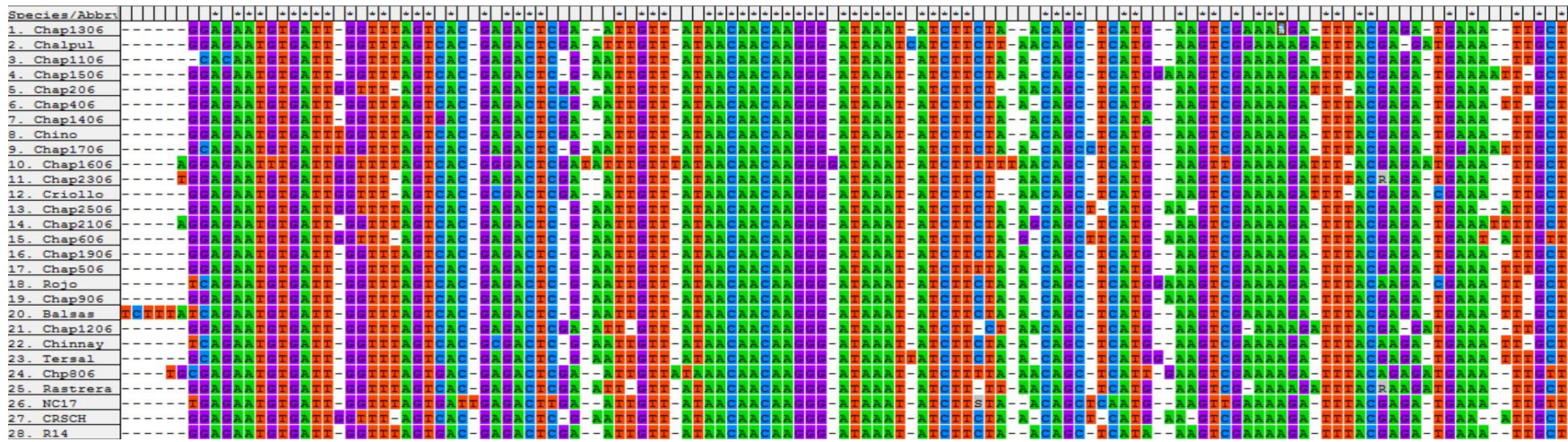
Los secuenciogramas obtenidos fueron “limpiados”, es decir, se eliminaron los extremos derecho e izquierdo con trazas y se voltearon las secuencias reversas por medio del programa CHROMAS Ver. 2.5.0. Luego se usó el programa SEQMAN Pro de DNASTar para obtener las secuencias de consenso en formato FASTA. Estas secuencias fueron utilizadas para realizar una búsqueda en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome para identificar secuencias homólogas registradas.

Los resultados de la búsqueda corroboraron que las secuencias de consenso obtenidas corresponden a la secuencia registrada con el ID AY157813, perteneciente al clon S4_A_164 de *Arachis stenosperma* que corresponde a un gen de resistencia de 215 pb que codifica para una proteína. Por lo que estos resultados corroboran que la detección de RGAs en el presente estudio se llevó a cabo correctamente.

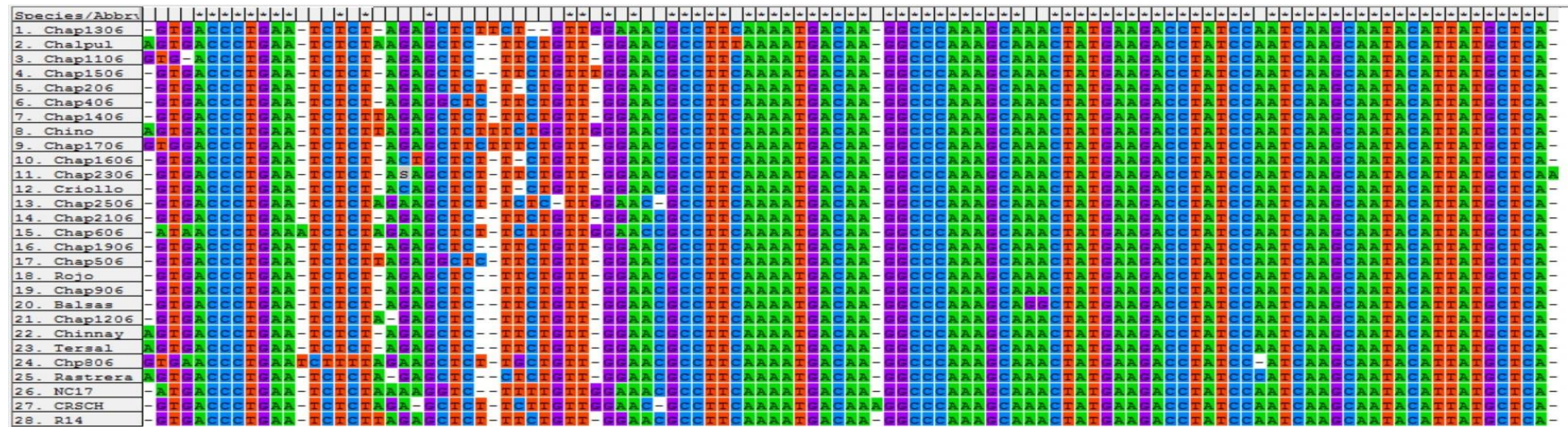
6.3 Análisis de alineamiento

Adicionalmente con las secuencias de consenso obtenidas en el análisis de corroboración se procedió a realizar un alineamiento múltiple de 28 de las 30 líneas de cacahuate evaluadas (ya que para dos de ellas los secuenciogramas no fueron utilizables) con el programa Mega ver. 7.0.14. El alineamiento se llevó a cabo con el método Clustal W. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8.

En ella se puede apreciar que las secuencias nucleotídicas presentes en las líneas de cacahuate mejoradas presentaron un 66.7 % de homología entre ellas para el dominio identificado con los iniciadores S48-2F. En la Fig. 8a se distingue la línea Río Balsas que puede diferenciarse perfectamente del resto de materiales evaluados al presentar una inserción de 5 bases al inicio de la secuencia, ausente en el resto. Adicionalmente esta línea presenta 23 deleciones y dos sustituciones en las posiciones 199 y 200 en las que dos adeninas fueron sustituidas por dos guaninas. Por su parte la línea 8-06CH presenta una inserción de dos bases en las posiciones 5 y 6 ausentes en el resto de los materiales evaluados. Asimismo muestra 16 deleciones, 7 inserciones y cuatro sustituciones en las posiciones 128 (C→T), 131 (G→T), 132 (T→ G) y 133 (G→A). Estos cambios nucleotídicos ocurridos en el dominio estudiado provocan que estos dos materiales sean los más distantes genéticamente entre sí ($d = 0.092$). Las diferencias genéticas entre líneas son resultado de cambios o rearrreglos entre las bases que forman el ADN como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas los cuales generan variabilidad o polimorfismos genéticos que pueden ocurrir de manera natural entre y dentro de diferentes poblaciones de organismos (Hartl and Jones, 2009).



a)



b)

Figura 8. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos consenso obtenida con los iniciadores S48-2F en 28 líneas de cacahuate. a) Nucleótidos 1 a 129, b) nucleótidos 130 a 240.

Por su parte las líneas 15-06CH, 9-06CH, 5-06CH y 4-06CH resultaron ser las más similares entre sí para el dominio estudiado. En la Figura 8b puede apreciarse un alto nivel de conservación entre líneas en la secuencia de nucleótidos de la posición 166 hacia 240, excepto para las líneas ya citadas como divergentes: 8-06CH, Río Balsas y CRSCH.

6.4 Análisis de agrupamiento

Con base en el polimorfismo observado en la secuencia de nucleótidos de las 28 líneas de cacahuete para el dominio estudiado, se obtuvieron las distancias entre pares de accesiones las cuales fueron utilizadas para realizar un análisis de agrupamiento por similitudes genéticas utilizando el programa Mega ver. 7.0.14. El método de agrupamiento utilizado fue el de máxima parsimonia permitiendo la construcción de un dendrograma para visualizar más claramente las similitudes y diferencias entre las líneas de cacahuete para el RGA detectado. Para corroborar la robustez de los agrupamientos obtenidos se realizaron 1,000 remuestreos (bootstrap) y se obtuvo el árbol de consenso el cual se presenta en la Figura 9.

En esta figura puede corroborarse lo señalado en el apartado anterior, en relación a que las líneas Río Balsas, 8-06CH y 16-06CH fueron las más divergentes entre sí con base en sus secuencias nucleotídicas para el dominio estudiado, mientras que los materiales 15-06CH, 9-06CH, 5-06CH y 4-06CH fueron los más similares entre sí para la secuencia analizada. Estos resultados deben ser tomados con reserva ya que el hecho de que los iniciadores hayan sido diseñados para una región RGA específica no excluye la posibilidad de que éstos se unan a otra región no relacionada del genoma. Por lo que para certificar la identidad del marcador genético utilizado y ratificar las relaciones genéticas obtenidas son necesarias la reamplificación y secuenciación de las bandas generadas (Bertioli *et al.*, 2003).

Finalmente, el hecho de que cinco de los nueve pares de iniciadores utilizados en

el presente estudio sugieran la presencia de análogos de genes de resistencia en las 30 líneas de cacahuete evaluadas, no es una certeza de que estos materiales serán resistentes bajo condiciones de campo o laboratorio, por lo que es indispensable la validación de los marcadores moleculares en ensayos biológicos controlados usando como criterio de éxito la resistencia a nivel de campo (Bernardo *et al.*, 2013).

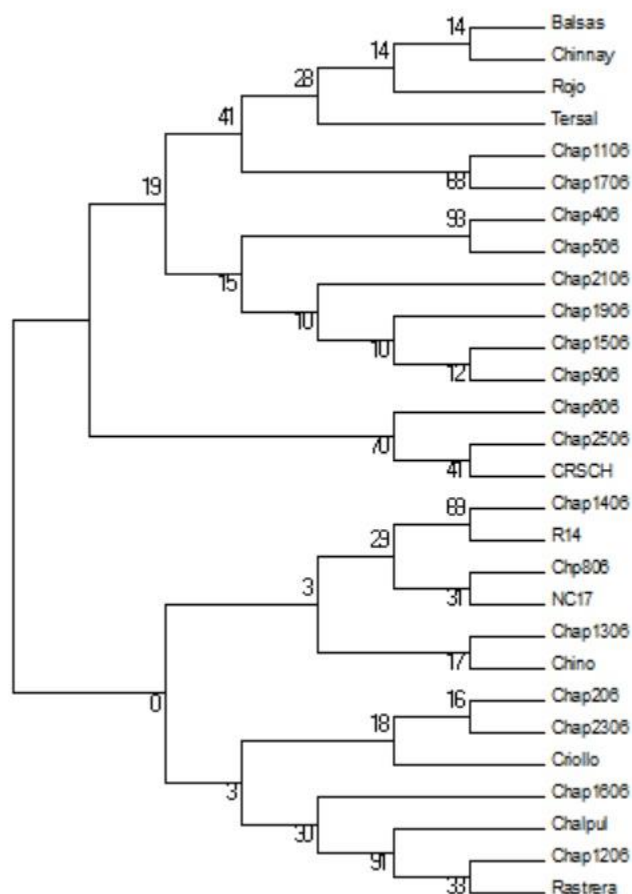


Figura 9. Dendrograma obtenido con base en el alineamiento Clustal W de secuencias nucleotídicas de 28 líneas de cacahuete bajo el método de máxima parsimonia con 1,000 remuestros.

6.5 Contenido de resveratrol.

Para la cuantificación del contenido de resveratrol por HPLC en las semillas crudas de cacahuates de las 30 líneas evaluadas con los resultados obtenidos en

el espectro de absorción a 306 nm y área bajo la curva para soluciones estándar de etanol a 5, 15, 25, 35, 45, 50, 100, 150, 300 y 600 ppm obtenidos.

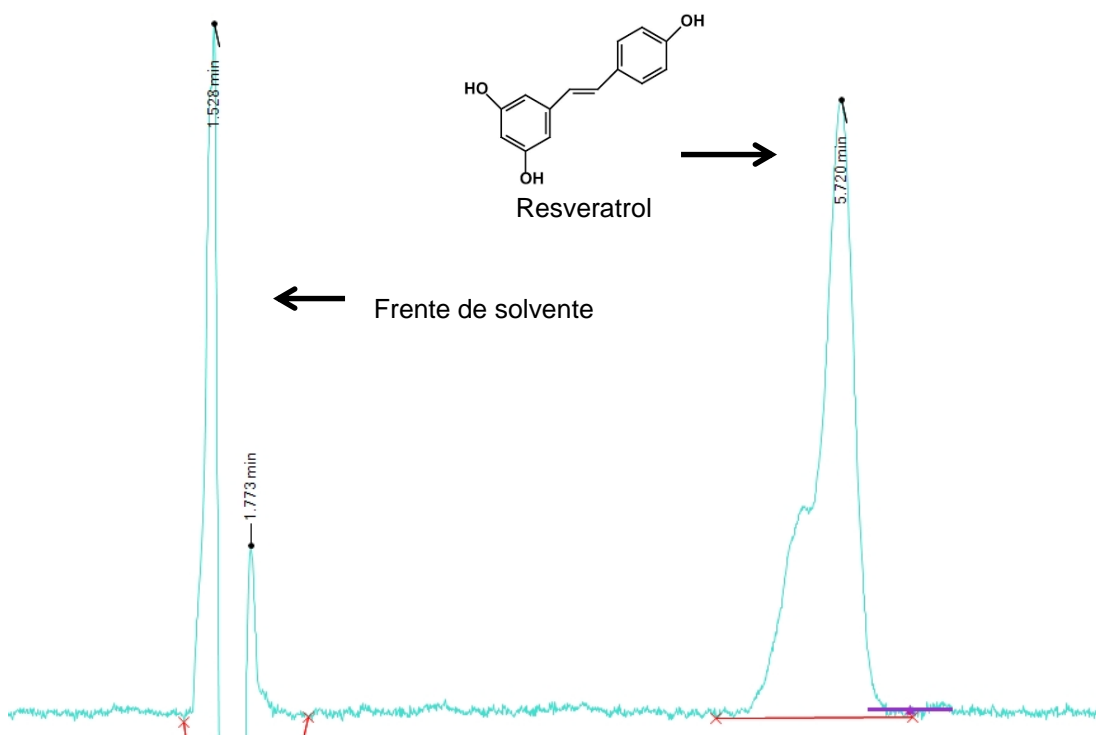


Figura 10. Cromatograma de HPLC del estándar de resveratrol en fase reversa en condiciones isocráticas de fase móvil detectado a una longitud de 306 nm, con un tiempo de retención de 5.7 min.

El cálculo de la concentración de resveratrol en las semillas de cacahuate se obtuvo despejando el modelo de regresión de la siguiente forma:

$$\text{concentración inicial} = \frac{y - 4453.1}{10926}$$

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 6. En él se puede apreciar que existieron diferencias marcadas entre los contenidos de resveratrol de las líneas de cacahuate evaluadas. Entre ellas resaltan las líneas 6-06CH (16.32), 16-06CH (15.84) y 4-06CH (14.04) ppm, mientras que las líneas con menores contenidos de resveratrol fueron 18-06CH (6.30), 15-06CH (5.04) y el criollo de Chapuluacán, Hgo. (4.00) ppm.

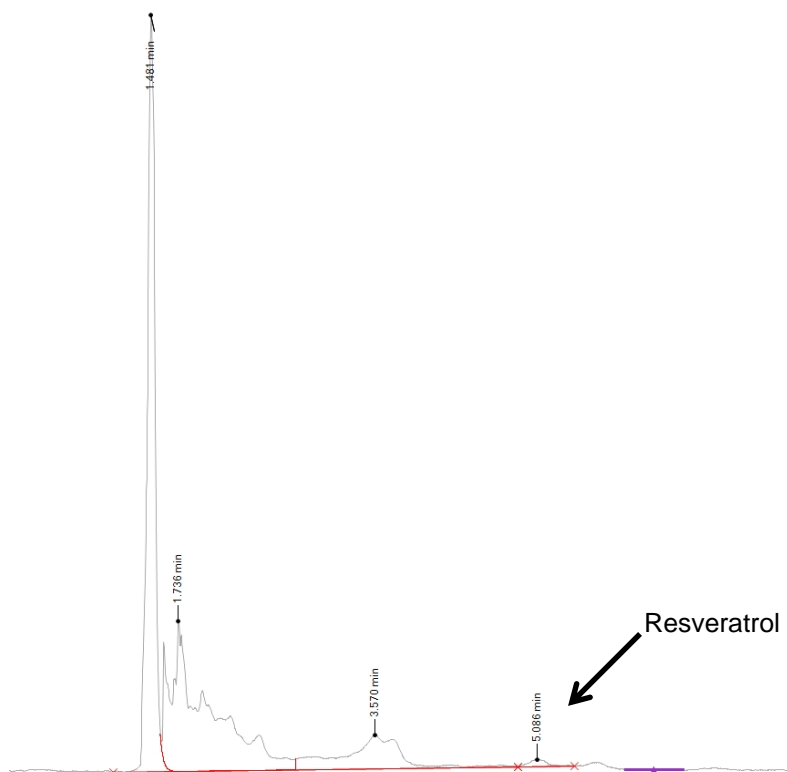


Figura 11. Cromatograma de HPLC del extracto de cacahuate de la muestra que corresponde al criollo de Chalpulhuacán, Hgo. que presenta la menor concentración, señalado con flecha el pico que representa al resveratrol, los demás pertenecen a compuestos no identificados.

No resulta sorprendente que el criollo de Chalpulhuacán, Hgo. halla sido el que presenta una menor concentración de este antioxidante en comparación a líneas pertenecientes al programa de mejoramiento genético de cacahuate de la UACH, ya que su selección ha sido llevada de manera empírica por los productores de esta leguminosa, fundamentalmente usando como criterio de selección caracteres agronómicos relevantes, no así la calidad del grano (Williams, 1994). Sin embargo, los criollos provenientes del estado de Morelos como Chino Huazulco y Rojo de Cuauchi presentaron de dos a tres veces mayor contenido de resveratrol que aquél. Otros autores han encontrado que el contenido de resveratrol en grano está inversamente correlacionado con el estrés abiótico durante el llenado de grano (Rudolf and Resurreccion, 2005), por lo que si se considera que en general la

cantidad de lluvia media anual en las zonas productoras de cacahuate probablemente sea superior en Hidalgo respecto a Morelos, lo que podría explicar las diferencias en concentración encontradas en estos materiales. Sin embargo dicho aspecto podría ser corroborado en investigaciones futuras, ya que en general todos los materiales analizados provenían de una siembra realizada en el año de 2014 en el estado de Morelos. Como población de líneas y variedades en el Cuadro 6 se observa que existe una amplia variabilidad en el contenido de resveratrol desde 4.0 ppm en el Criollo de Chalpulhuacán Hgo. y 16.32 ppm en la línea 6-06CH.

Cuadro 6. Contenido de resveratrol en semilla cruda de 30 líneas de cacahuate determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Línea	[ppm]	Línea	[ppm]
1. 13-06CH	10.74	16. 6-06CH	16.32
2. Criollo de Chalpulhuacán, Hgo.	4.00	17. 19-06CH	10.78
3. 11-06CH	6.38	18. 5-06CH	8.27
4. 15-06CH	5.04	19. Rojo de Cuauchi	8.69
5. 2-06CH	9.72	20. 9-06CH	7.94
6. 4-06CH	14.04	21. Río Balsas	7.48
7. 14-06CH	13.80	22. 12-06CH	7.71
8. Chino Huazulco	10.25	23. Chin-Nay	12.04
9. 17-06CH	7.28	24. Ter-Sal	12.99
10. 16-06CH	15.84	25. 8-06CH	6.61
11. 23-06CH	10.28	26. Rastrera de Ixtla	6.60
12. Criollo de Cuauchi	5.77	27. 18-06CH	6.30
13. 25-06CH	7.99	28. NC-17UACH	6.93
14. C. Ocozocuautla	10.90	29. CRSCH	9.90
15. 21-06CH	13.76	30. 14R-14	11.30

Por otra parte, varias de las líneas mejoradas, a pesar de haber sido seleccionadas también bajo criterios de superioridad agronómica y no bajo estándares de calidad de grano, presentan altos contenidos de resveratrol, los cuales superan a los reportados por otros autores (Chukwumah *et al.*, 2009). Por lo que tienen un alto potencial para ser aprovechadas por la industria para la extracción de este polifenol, cuyo consumo ha sido asociado a múltiples beneficios para la salud humana como efectos quimiopreventivos sobre células cancerosas mediante la inhibición del ciclo celular (Wolter *et al.*, 2004), prevención de la oxidación de lípidos, la agregación plaquetaria y la vasodilatación arterial (Hung *et al.*, 2002), disminución de patologías asociadas a la obesidad, como la degeneración hepática y una menor predisposición a la diabetes, así como un aumento del gasto de energía (Fischer-Posovszky *et al.*, 2010), aumentar la dilatación de las arteriolas cerebrales y mejorar la perfusión cerebral postisquémica (Kennedy *et al.*, 2010), entre otros. Por lo que el disponer de variedades mejoradas de cacahuete con un alto contenido de resveratrol podría representar una ventana de oportunidad para los productores de este cultivo.

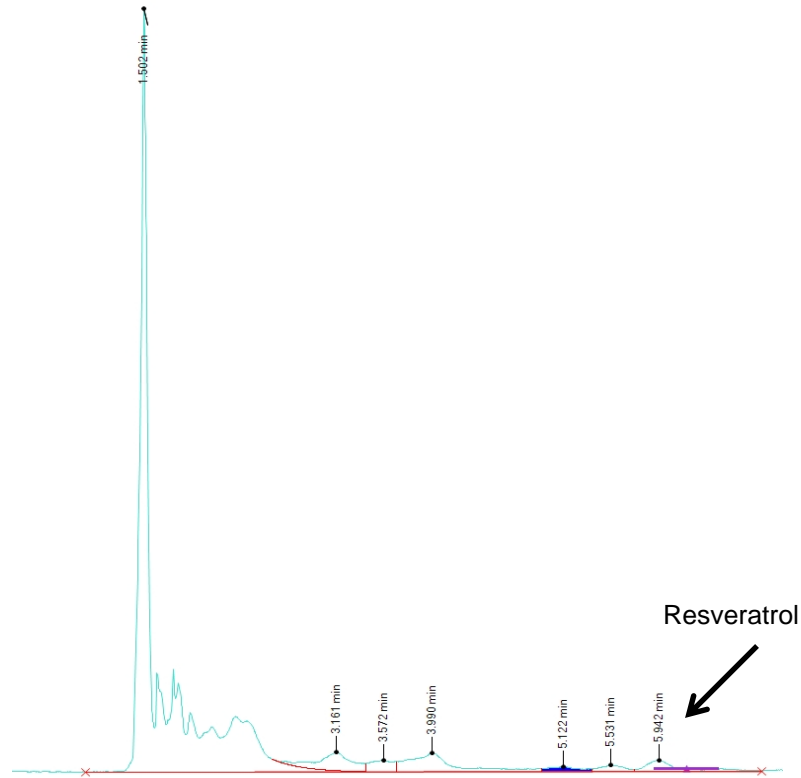


Figura 12. Cromatograma de HPLC del extracto de cacahuete de la muestra que corresponde a 6-06CH, que presenta la mayor concentración, señalado con flecha el pico que representa al resveratrol, los demás pertenecen a compuestos no identificados.

VII. CONCLUSIONES

Las líneas de cacahuete pertenecientes al programa de mejoramiento genético de este cultivo de la Universidad Autónoma Chapingo presentan análogos de genes de resistencia (RGAs) similares a los identificados en la especie silvestre *A. stenosperma*, la cual presenta el genoma AA de *A. hypogaea* y se ha reconocido como una valiosa fuente de genes de resistencia.

La detección de RGAs en los materiales evaluados supone que al ser enfrentados con fitopatógenos en ensayos bióticos mostrarán resistencia a nematodos agalladores.

Aparentemente las líneas evaluadas en el presente estudio poseen secuencias que codifican proteínas de resistencia tipo TIR (Toll Interleuquina Receptor) las cuales se caracterizan por presentar dominios del tipo LZ-NBS-LRR, es decir, contienen un motivo de cierre de leucina, el sitio de unión de los nucleótidos y repeticiones ricas en leucina.

Algunos de los materiales evaluados presentaron altas concentraciones del polifenol resveratrol en semilla cruda como 6-06CH (16.32) y 16-06CH (15.84), por lo que su cultivo podría representar una ventana de oportunidad para los productores para su uso en la industria de los alimentos y farmacológica.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Bent, A.F.; Kunkel, B.N.; Dahlbeck, D.; Brown, K.L.; Schmidt, R.; Giraudat, J.; Leung, J.; Staskawicz, B.J. 1994. *RPS2 of Arabidopsis thaliana: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes*. Science 265:1856–1860.
- Bernardo, A.N.; Bowden, R.L.; Rouse, M.N.; Newcomb, M.S.; Marshall, D.S.; Bai, G. 2013. Validation of molecular markers for new stem rust resistance genes in U.S. hard winter wheat. Crop Sci. 53:755-764.
- Bertioli, D.J.; Leal-Bertioli, S. C. M.; Lion, M. B.; Santos, V. L. ; Pappas Jr, G. ; Cannon, S. B.; Guimarães, P. M. 2003. A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. Mol. Gen. Genomics 270:34-45.
- Bowie, A.; O'Neill, L. A. J. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J. Leukocyte Biol. 67:508-514.
- Castro, R.M.; Lamderberg, M.C.; Walz, R.; Carlotti, C.G.J.; Huang, N.; Cunha, D.R.; Moura, R.; Caballero, O.L.; Sakamoto, A.C.; Nitrini, R.; Brentani, R.R.; Martins, V.R. 2004. High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing HPLC. Journal of Neuroscience Methods 139:263-269.
- Chukwumah, Yvonne C.; Walker, Lloyd T.; Verghese, Martha; Ogutu, Sinom. 2009. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). Ultrasonics Sonochemistry 16:293–299.

De Wit, P.J.G.M. 1992. Molecular characterization of gene- for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30:391-418.

FAOSTAT. 2016. Producción mundial de maní. Consultada el 22 de abril de 2016. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>

Fischer-Posovszky, P.; Kukulus, V.; Tews, D.; Unterkircher, T.; Cebatin, K.M.; Fulda, S.; Wabitsch, M. 2010. Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *Am. J. Clin. Nutr.* 92(1):5-15.

Garrido R., E.R.; López L., A.; Noriega C., D.H.; Hernández G., E. 2011. Principales plagas y enfermedades del cacahuate en Chiapas. INIFAP. Folleto para Productores No. 11. 53 p.

Gonçalves-Vidigal, M.C.; Da Silva, C.R.; Soares V., P.; Gonela, A.; Kvitschal, M.V. 2007. Allelic relationships of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) resistance in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Michelle and the proposal of a new anthracnose resistance gene, Co-11. *Genet. Mol. Biol.* 30(3):589-593.

González, A.M.; Yuste-Libona, F.J.; Rodiño, A.P.; De Ron, A.M.; Caspel, C.; García-Alcazar, M.; Lozano, R.; Santalla, M. 2015. Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. *Front. Plant Sci.* 6:141 doi: 10.3389/fpls.2015.00141.

- Haas, S.A.; Hild, M.; Wright, A.P.H.; Hain, T.; Talibi, D.; Vingrom, M. 2003. Genome-scale design of PCR primers and long oligomers for DNA microarrays. *Nucle. Acid Res.* 31(19):5576-5581.
- Hartl, D.L.; Jones, E.W. 2009. *Genetics. Analysis of Genes and Genomes.* 7th Edition. Jones and Bartlett Publishers. E.U. 738 p.
- Hung, L.M.; Su, M.J.; Chu, W.K.; Chiao, C.W.; Chan, W.F.; Chen, J.K. 2002. The protective effect of resveratrol on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British J. Pharmacol.* 135:1627-1633.
- INIFAP. 2002. Producción del cultivo de cacahuate en el estado de Morelos. Folleto Técnico No. 18. 41 p.
- Iserte, J.A.; Stephan, B.I.; Goni, S.E.; Borio, C.S.; Ghiringhelli, P.D.; Lozano, M.E. 2013. Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. *Biotechnol Res Int* 2013:38364.
- Johal G.S.; Briggs, S.P. 1992. Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. *Science* 258:985–987.
- Kennedy, D.O.; Wightman, E.L.; Reay, J.L.; Lietz, G.; Okello, E.J.; Wilde, A.; Haskell, C.F. 2010. Effects of resveratrol on cerebral blood flow variables and cognitive performance in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Am. J. Clin. Nutr.* 91(6):1590-1597.
- Leal-Bertioli, S.C.M.; José, A.C.V.F.; Alves-Freitas, D.M.T.; Moretzsohn; M.C.; Guimarães, P.M.; Nielen, S.; Vidigal, B.S.; Pereira, R.W.; Pike, J.; Fávero, A.P.; Parniske, M.; Varshney, R.K.; Bertioli, D.J. 2009. Identification of

candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. *BMC Plant Biology* 9:112-124.

Martin, G.B.; Brommonschenkel, S.H.; Chunwongse, J.; Frary, A.; Ganai, M.W.; Spivey, R.; Wu, T.; Earle, E.D.; Tanksley, S.D. 1993. Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432–1436.

Martínez S., J.; Fernández G., I.; Espinoza P., N.; Morales de la C., F.R.; Martínez V., B.B.; Hernández C., M.C. 2013. Características físicas y químicas del aceite de cacahuete de diferentes variedades cultivadas en Chiapas. INIFAP. Folleto Técnico No. 16. 4 p.

Meyers, B.C.; Kozik, A.; Griego, A.; Kuang, H.; Michelmore, R.W. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:809–834.

Milla, S.R.; Isleib, T.G.; Stalker, H.T. 2005. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. *Genome* 48(1):1-11.

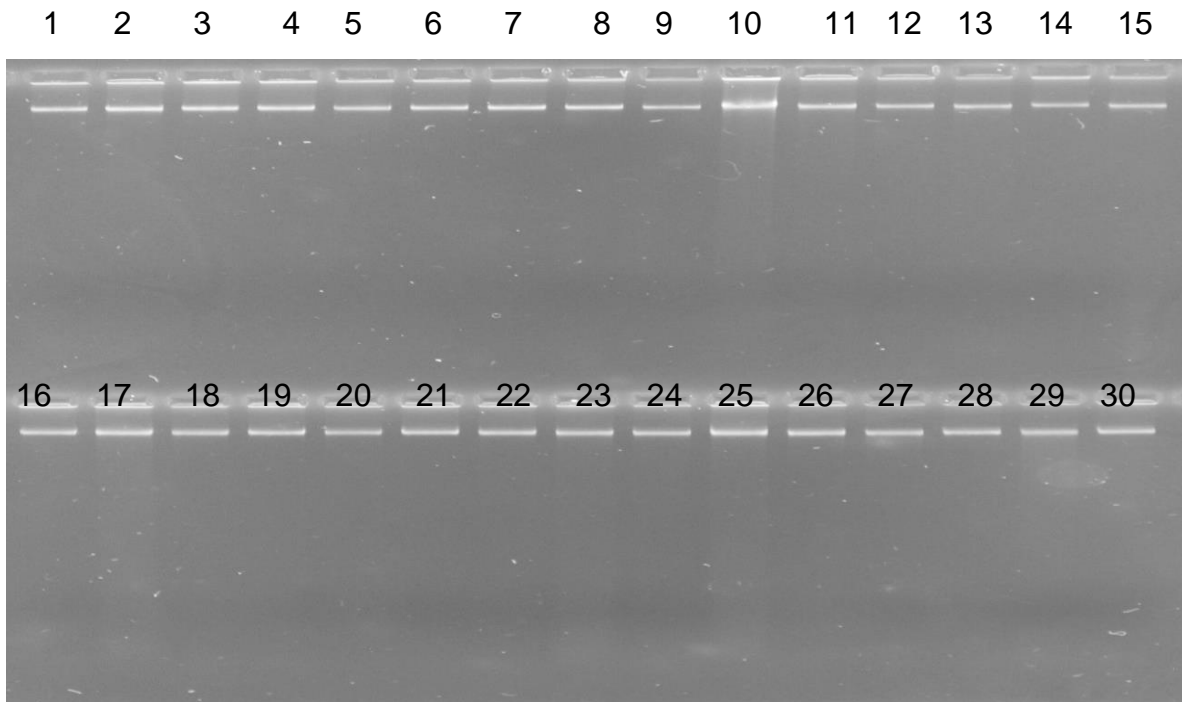
Peñuela, S.; Danesh, D.; Young, N.D. 2002. Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of nonTIR NBS-LRR genes in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 104:261-272.

Ratnaparkhe, Milind B.; Wang Xiyin; Li, Jingping; Compton, Rosana O.; Rainville, Lisa K; Lemke, Cornelia; Kim, Changsoo; Tang, Haibao; Paterson, Andrew H. 2011. Comparative analysis of peanut NBS-LRR gene clusters suggests evolutionary innovation among duplicated domains and erosion of gene microsynteny. *New Phytologist* 192:164–178

- Rhoades, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucl. Acid Res. 18(21):6409-6412.
- Rosales, Martínez Patricia; Arellano, Cárdenas Sofía; Dorantes, Álvarez Lidia; García, Ochoa Felipe; López, Cortez Ma. Del Socorro. 2014. Comparison Between Antioxidant Activities of Phenolic Extracts from Mexican Peanuts, Peanuts Skins, Nuts and Pistachios. J. Mex. Chem. Soc., 58(2), 185-193.
- Rudolf, J.R.; Resurreccion, A.V. 2005. Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. J. Agric. Food. Chem. 53(26):10186-10192.
- SAGARPA. 2015. Bases de datos oleaginosas mundial y nacional 1980 – 2013. Comité Nacional Sistema Producto. Consultada el 22 de abril de 2016. http://www.oleaginosas.org/cat_69.shtml
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/cacahuate> Consultada el 22 de abril de 2016.
- Skoog, D.A.; West, D.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. 2014. Fundamentos de Química Analítica.9a. Ed. Cengage Learning Editores. 1088 p.
- Tuberoso, C.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E.; Cabras, P. 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. J. Food Chem. 103:1494-1501.
- USDA. 2012. Peanut butter smooth. National Nutrient Data Base for Standard Reference. Household USDA Foods Fact Sheet.

- Valadez M. E.; Kahl, G. 2005. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio) Editorial Mundi-prensa. D.F., México. 147p.
- Venkatachalam, M.; Sathe, S. 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J. of Agric. and Food Chem.* 54:4705-4714.
- Williams, D. E. 1994. Exploración etnobotánica para recursos fitogenéticos de cacahuete en México. *En: Cuevas S., J.A.; Estrada L., E.; Cedillo P., E. (Eds). Memorias del I Simposio Internacional sobre Etnobotánica en Mesoamérica "Efraím Hernández X.". Universidad Autónoma Chapingo, México. pp. 137-148.*
- Wolter, F.; Ulrich, S.; Stein, J. 2004. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer: key role of polyamines? *J. Nutr.* 134 (12):3219-3222.
- Yu, Y.G.; Buss, G.R.; Saghai-Marroof, M.A. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11751–11756.
- Yuksel, B.; Estill, J.C.; Schulze, S.R.; Paterson, A.H. 2005. Organization and evolution of resistance gene analogs in peanut. *Mol. Genet. Genomics* 274(3):248-263.
- Zhanji, Liu; Suping, Feng; Manish, K. Pandey; Xiaoping, Chen; Albert, K. Culbreath; Rajeev, K. Varshney; Baozhu, G. 2013. *Journal of Integrative Plant Biology* 2013, 00 (00):1–9

IX. Apéndice



Apéndice 1: Gel de calidad. Se muestra las bandas de las 30 líneas de cacahuete donde se aprecian bien definidas y claras lo que corrobora que el ADN extraído fue de buena calidad.