

**ESTUDIO COMPARATIVO DE MARCADORES MOLECULARES Y  
VALORES C DE DNA ENTRE PLANTAS ESTAMINADAS Y  
PISITILADAS DE SOTOL (*Dasyilirion cedrosanum*)**

**YADHIRA DEL CARMEN ORTIZ COVARRUBIAS**

**TESIS**

**Presenta como Requisito Parcial para**

**Obtener el Grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**EN FITOMEJORAMIENTO**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**Saltillo, Coahuila, México**

**Junio de 2013**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

ESTUDIO COMPARATIVO DE MARCADORES MOLECULARES Y VALORES C  
DE DNA ENTRE PLANTAS ESTAMINADAS Y PISTILADAS DE SOTOL  
(*Dasyliroa cedrosanum*)

TESIS

POR

YADHIRA DEL CARMEN ORTIZ COVARRUBIAS

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como requisito  
parcial para optar el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal:

  
Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

Asesor:

  
Dr. Francisco Paredes Corona

Asesor:

  
Dr. Adalberto de la Cruz Mendoza

Asesor Externo:

  
Dr. Gerardo Rodríguez Herrera

Asesor Externo:

  
Dr. Octavio Martínez de la Vega

Asesor Externo:

  
Dra. Julie K. Simpson-Williamson

  
Dr. Fernando Ruiz Zarate  
Subdirector de Posgrado  
Saltillo, Coahuila, México, Junio 2014

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que participaron directa e indirectamente en la realización de esta tesis y los que colaboraron en la meta para realizar mi postgrado:

Siempre estaré agradecida con mi familia ya que en todo momento me han brindado apoyo profesional y por supuesto amor. A mi mamá, la persona que es mi modelo a seguir. A Karla y César por la revisión de este manuscrito, gracias por su presión para la finalización del mismo.

A Sebastián por ser la personita más especial en mi vida y generarle más alegría y emoción. Te amo cabezón!

A mi asesor Dr. Humberto Reyes quien me permitió ser parte del proyecto, por su asesoría y lo más importante la admiración que me genera para poder avanzar en mi carrera profesional.

A todos mis profesores del departamento de Fitomejoramiento en especial al Dr. José Espinoza, al Dr. Manuel Reyna, a la Dra. Rosalinda Mendoza y al Dr. Humberto de León por la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación en el área del Fitomejoramiento.

A mis asesores seleccionados para el apoyo de esta tesis a la Dra. June Simpson, al Dr. Adalberto Benavides, a la Dra. Francisca Hdz., al Dr. Raúl Rdz. y al Dr. Octavio Mtz. por la aportación de ideas en base a su experiencia para los resultados de esta investigación, así como por la revisión de dicho escrito.

Gracias al Biól. Fernando Hernández, a Katy, a Mayra y a Emi. Por el tiempo y amabilidad en mi estancia en el Cinvestav. Al Biól. Fernando, quien fue mi *sensei* en marcadores genéticos, por su gran ayuda en la realización del trabajo experimental,

gracias por toda la atención y sobre todo el conocimiento traspasado en el área molecular y por la amenidad en mi estancia.

A mis compañeros de generación Eva Arenas, Inés Rodríguez, Juan y Rosendo Hernández por esos gratos momentos, sesiones de estudio y sobre todo por las idas de colecta a campo para el muestreo de esta investigación.

A Juan Hdz., Dulce Mendoza y Martha Gómez por haberme auxiliado con sus consejos técnicos en las extracciones de DNA, gran ayuda y agilidad en mi trabajo de campo y laboratorio.

Al trabajador de campo el Sr. Miguel Rodríguez, por haberme apoyado en el trabajo de campo para la realización de la tesis.

A mis grandes amigas, Carmen Mendez, Eddna Garcia y todas las BM's Regina, Juliana, Liz, Marisol e Irma por su amistad a lo largo de casi toda la década pasada, por siempre estar al pendiente.

Al LANGEBIO y CINVESTAV Irapuato por brindarme el espacio, instrumentos y equipo para la realización de esta investigación.

Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado al proyecto (CB-2010-01,000000000154682) de investigación del cual derivo esta tesis.

¡Gracias, totales!

*A Sebastián*

**ESTUDIO COMPARATIVO DE MARCADORES MOLECULARES Y VALORES C  
DE DNA ENTRE PLANTAS ESTAMINADAS Y PISTILADAS DE SOTOL  
(*Dasyllirion cedrosanum*)**

**POR**

**YADHIRA DEL CARMEN ORTIZ COVARRUBIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. 2013**

**Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés**

**RESUMEN**

En la presente investigación se realizó un estudio a nivel molecular a fin de buscar marcadores AFLP asociadas a la diferenciación sexual temprana en sotol (*Dasyllirion cedrosanum*) y comparar por citometría de flujo cantidades de DNA por célula entre los dos sexos de la misma especie. Se realizó un muestreo aleatorio de plantas identificadas como macho y hembra en dos localidades del Desierto Chihuahuense (Buenavista, Coahuila y Providencia, Zacatecas). Para el análisis de AFLP, se aisló DNA de las plantas seleccionadas por el método de López *et al.* (1995) y se formaron 4 compuestos de 10 individuos cada uno, dos compuestos con hembras y dos con machos. Un total de 40 combinaciones de iniciadores fueron utilizados para la selección de los marcadores AFLP candidatos bajo el protocolo “IRDye Fluorescent AFLP Kit for Large Plant Genome Analysis”, el cual usa dos colorantes fluorescentes

(700 y 800 nm). Posteriormente, se analizaron 78 plantas individuales (40 machos y 38 hembras) con las combinaciones seleccionadas: M-AGG+E-ACC, M-AGG+E-AGG y M-CTG+E-AAC. En cuanto al valor C, se comparó el contenido de DNA por célula entre sexos del sotol. Las muestras frescas fueron tomadas de 10 plantas machos y 10 hembras sotol plenamente identificadas como tal de la región de Providencia. Se extrajeron los núcleos y se tiñeron bajo el protocolo del kit Cystain UV precise P-05-5002. Para el estudio de AFLP los resultados mostraron geles con bandas polimórficas entre sexos que se codificaron binariamente y se analizaron estadísticamente a través del *coeficiente de correlación para caracteres categóricos*, como medida de asociación. Se detectaron asociaciones significativas mediante la prueba de chi cuadrada, estas bandas mostraron estar asociadas positivamente al género masculino de la especie. Para el análisis comparativo del contenido de DNA, no se encontraron diferencias significativas entre los picos de fluorescencia entre sexos. Sin embargo, se encontró una alta variación dentro de sexos que puede ser causado por metilación y/o pigmentos, lo cual requiere validar estas medidas con otro citómetro de flujo.

**Palabra clave:** *Dasyllirion cedrosanum*, sotol, dioecia, marcadores AFLP, contenido de DNA.

## ABSTRACT

In this this research a molecular study was carried out to look for AFLP markers for early sex detection in sotol (*Dasyllirion cedrosanum*), and to compare through flow cytometry the DNA content between sexes of the same species. A random sampling was performed with plants identified either as males or females in two locations of the Chihuahuan Desert (Buenavista, Coahuila and Providencia, Zacatecas). For the AFLP analysis, DNA was isolated from the selected plants with the López et al. (1995) method, and four bulks of 10 individuals, two of them made of males and two of females, were prepared. A total of 40 primer combinations were used for AFLP candidate marker selection through the “IRDye Fluorescent AFLP Kit for Large Plant Genome Analysis” protocol, which uses two fluorescent dyes (700 and 800 nm). Afterwards, 78 individual plants were assayed (40 males and 38 females) with the selected combinations: M-AGG+E-ACC, M-AGG+E- AGG y M-CTG+E-AAC. As for the C value, DNA content per cell was compared between sexes in the sotol plants. Fresh samples were taken from 10 male and 10 female plants thoroughly identified in the Providencia location. Nuclei were extracted and stained with the Cystain UV precise protocol. For the AFLP study, the results showed gels with polymorphic bands that were binarily coded, and statistically analyzed with a correlation coefficient for categorical data, as an association measure. Significant associations were detected through chi square tests, were bands were positively associated to the male gender. For the comparative analysis of DNA content, significant differences were found in the fluorescence peaks between sexes. However, a high variation was found within sexes, that can be caused by methylation

and pigment artifacts, being necessary to validate these measures in another flow cytometer.

**Key words:** *Dasyilirion cedrosanum*, sotol, dioecy, AFLP markers, DNA content.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
HIPÓTESIS .....	4
OBJETIVOS .....	5
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
II.1 SOTOL (DASYLIRION CEDROSANUM).....	6
II.2 MORFOLOGÍA FLORAL Y ANATOMÍA .....	7
II.3 EVOLUCIÓN DE LA DIOECIA.....	9
II.4 SISTEMAS DE DETERMINACIÓN SEXUAL.....	10
II.5 TEORÍAS SOBRE LA APARICIÓN DE LA DIOECIA .....	12
II.6 MARCADORES MOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN DEL SEXO .....	15
II.7 POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP) .....	17
II.8 CITOMETRÍA DE FLUJO .....	19
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
III.1 LOCALIDADES .....	21
III.2 MATERIAL VEGETAL .....	21
III.3 EXTRACCIÓN DE DNA.....	22
III.4 FORMACIÓN DE COMPUESTOS .....	24
III.5 MARCADORES MOLECULARES TIPO AFLP .....	24
III.6 ANÁLISIS COMPARATIVO DE VALORES C DE DNA .....	29
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	31
IV.1 CALIDAD EN EXTRACCIÓN DE DNA.....	31
IV.2 ENSAYO DE AFLPS.....	32
IV.3 ENSAYO DE VALOR C DNA .....	34
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	43
<b>VI. LITERATURA CITADA</b> .....	44

## ÍNDICE CUADROS

CUADRO 1. COORDENADAS DE LAS DOS LOCALIDADES SELECCIONADAS PARA MUESTREO.....	21
CUADRO 2. RELACIÓN DE PLANTAS ETIQUETADAS Y COLECTADAS.....	22
CUADRO 3. COMBINACIÓN DE INICIADORES EXPERIMENTADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN SELECTIVA. .....	26
CUADRO 4. VALIDACIÓN CON INICIADORES CANDIDATOS DEL ANÁLISIS DE COMPUESTOS.....	28
CUADRO 5. MEDIAS DE ABSORBANCIA (A260/280) PROMEDIO PARA LAS POBLACIONES DE PROVIDENCIA Y BUENAVISTA.....	31
CUADRO 6. TABLA DE CONTINGENCIA DE LOS 4 POLIMORFISMO ENCONTRADOS CON 3 COMBINACIONES DE INICIADORES.....	34
CUADRO 7. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE CORRELACIÓN Y CHI CUADRADA PARA LOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS CON 3 COMBINACIONES DE INICIADORES.....	36
CUADRO 8. DATOS DE FLUORESCENCIA POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN PLANTAS HEMBRA Y MACHO DE SOTOL.....	42

## ÍNDICE FIGURAS

FIGURA 1. DETALLE DE HOJAS DE LA PLANTA DE SOTOL D. CEDROSANUM .....	7
FIGURA 10. HISTOGRAMAS PARA CANTIDADES DE DNA POR CÉLULA EN PLANTAS HEMBRA Y MACHO DE D. CEDROSANUM.....	8
FIGURA 2. PLANTA SILVESTRE DE SOTOL (D. CEDROSANUM) CON INFLORESCENCIA.....	9
FIGURA 3. DETALLE DE LA INFLORESCENCIA FEMENINA (A) Y MASCULINA (B) DE D. CEDROSANUM....	17
FIGURA 4. ILUSTRACIÓN ESQUEMATIZADA DEL ANÁLISIS DE AFLP.....	32
FIGURA 5. MUESTRAS REPRESENTATIVAS DE LA CALIDAD DE DNA DE LA REGIÓN DE PROVIDENCIA EN GEL DE AGAROSA.....	33
FIGURA 6. GELES DE POLIACRILAMIDA CON MARCADORES AFLP. LOCALIDAD = PROVIDENCIA. M = MARCADOR DE PESO MOLECULAR. A. PRUEBAS CON CUATRO COMPUESTOS. COMBINACIONES DE INICIADORES EN: PANEL A = M-CTG+E-AAC, PANEL B = M-CTG+E-ACC, PANEL C = M-CTG+E-ACA, PANEL D = M-CTG+E-AAG. ....	37
FIGURA 7. GEL DE POLIACRILAMIDA CON MARCADORES AFLP. PANEL HEMBRA: 18 CARRILES CON DNA DE PLANTAS INDIVIDUALES. PANEL MACHO: 20 CARRILES CON DNA DE PLANTAS INDIVIDUALES. COMBINACIÓN DE INICIADORES M-AGG+E-ACC A 700 NM.....	38
FIGURA 8. GEL DE POLIACRILAMIDA CON MARCADORES AFLP. PANEL HEMBRA: 18 PLANTAS INDIVIDUALES. PANEL MACHO: 20 PLANTAS INDIVIDUALES. COMBINACIÓN DE INICIADORES M-AGG+E-AGG A 800 NM.....	39
FIGURA 9. GEL DE POLIACRILAMIDA CON MARCADORES AFLP. COMBINACIÓN DE INICIADORES M-CTG+E-AAC. A. VALIDACIÓN CON PLANTAS INDIVIDUALES DE LAS REGIÓN DE PROVIDENCIA. POLIMORFISMO CON DIFERENCIAS ENTRE MACHOS Y HEMBRAS A 323 Y 410 PB.....	40

## I. INTRODUCCIÓN

El Desierto Chihuahuense posee una flora extensa, de la cual se conoce la taxonomía y filogenia de la mayoría de las especies, pero se ignora en gran medida la genética, el comportamiento fisiológico y reproductivo de una considerable parte de ellas. Muchas de estas plantas tienen una importancia económica, ya que de ellas se derivan productos alimenticios, farmacéuticos o textiles, de las que con un manejo racional se puede sacar provecho evitando la sobre-explotación cuando la recolección se basa en poblaciones naturales. Es el caso de *Dasyilirion cedrosanum*, planta en la que se centra esta investigación. El sotol (*D. cedrosanum*) es una planta silvestre monocotiledónea que pertenece a la familia *Asparagaceae* (ITIS, 2011). Cuenta con múltiples hojas espinadas en el filo, y toman forma de cuchara cerca del punto de emergencia del tallo (piña), el cual no rebasa el metro y medio de alto. Alrededor del décimo año de vida madura sexualmente, con la emergencia de una inflorescencia o escapo que llega a medir hasta 4 metros de alto, con estructuras paniculadas y racemosas, protegidas por brácteas. Estas inflorescencias secundarias que nacen a lo largo del escapo, generan un solo tipo de florecillas masculinas y femeninas por individuo, por lo cual es una planta dioica funcionalmente.

Con la fermentación de su tallo o piña se produce una bebida alcohólica conocida como sotol, en un proceso parecido a la producción del tequila. Normalmente esta

producción se realiza de manera artesanal en fábricas familiares de algunos pueblos del norte de México, a partir de materia prima recolectada directamente de plantas silvestres. Asimismo, en Chihuahua existe una empresa dedicada a la producción y exportación de esta bebida que usa de igual manera plantas silvestres extraídas del campo.

El sotol es una planta dioica, y se asume que desciende de plantas hermafroditas, ya que se observan estaminoides en plantas pisitladas y vestigios de carpelos en plantas estaminadas (Bogler, 1990). En la literatura se encuentra que menos del 6% de las angiospermas son de este tipo de reproducción sexual y que son de reciente evolución. Actualmente hay investigaciones encaminadas a la comprensión de los mecanismos genéticos y moleculares responsables de la determinación del sexo y están siendo descubiertos marcadores moleculares de sexo en plantas con y sin cromosomas sexuales heteromórficos, en varias especies de plantas dioicas. Entre ellas se encuentra la papaya (*Carica papaya*), el espárrago (*Asparagus officinalis*) y *Silene latifolia*, lo cual ayuda a la comprensión del mecanismos sexual y sus consecuencias en el desarrollo vegetal. Entender la determinación del sexo en *D. cedrosanum* inicialmente ayudaría a ampliar el conocimiento sobre la dioecia así como descubrir si molecular y genéticamente se encuentran diferencias entre ambos sexos del sotol e identificar tempranamente el sexo de las plantas de una forma rápida y en etapas tempranas de su desarrollo. Aún más importante, el conocimiento de la determinación del sexo aportaría datos valiosos para la comprensión básica del

organismo y la creación de programas de selección para aplicarlos en el manejo sustentable de las poblaciones.

## HIPÓTESIS

1. No existe variación alguna entre las cantidades de DNA de plantas macho y hembra de sotol (*D. cedrosanum*).
2. Hay diferencias genéticas entre plantas masculinas y femeninas de sotol que pueden distinguirse a través de bandas electroforéticas polimórficas de DNA.

## **OBJETIVOS**

1. Comparar a través de citometría de flujo las cantidades de DNA por célula entre plantas masculinas y femeninas de sotol.
2. Buscar marcadores AFLP candidatos para identificación sexual temprana en sotol.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### II.1 Sotol (*Dasyliirion cedrosanum*)

De las 16 especies de plantas del género *Dasyliirion*, comúnmente llamadas sotol, que han sido identificadas en México, solo tres de ellas son las que más se han explotado económicamente: *D. durangense*, *D. cedrosanum* (Figura 1) y *D. wheeleri*. Con ellas se elabora una bebida alcohólica a partir de la fermentación de carbohidratos en la piña de la planta (Contreras y Ortega, 2005), aunque también se han usado como alimento y ornamentos. Las plantas son obtenidas mayormente de poblaciones naturales en lugar de cultivadas de la zona con denominación de origen para la bebida desde el año 2002 y abarca los estados de Coahuila, Durango y Chihuahua (SCFI, 2004).

La elaboración del sotol, licor que se fabrica a partir del cocimiento y fermentación de las piñas de las plantas, es uno de los productos derivados del género *Dasyliirion*. Durante muchos años el procedimiento de recolección de plantas de poblaciones naturales ha tenido la capacidad de suministrar la materia prima para la industria que tradicionalmente fue artesanal y en los últimos años se ha industrializado con procesos semejantes de la producción del tequila. Aún cuando hay poblaciones naturales extensas y no se encuentra en peligro de extinción, es importante que la

colecta se practique de manera sustentable de tal forma que no se afecte al ecosistema (Olivas *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Detalle de hojas de la planta de sotol *D. cedrosanum* (Foto: Yadhira Ortiz Covarrubias. Buenavista, Saltillo, Coah.).

## II.2 Morfología floral y anatomía

Los miembros de la especie de *D. cedrosanum* son plantas con tallos cortos (menores a 1.5 m) con hojas largas y caídas, en forma de cuchara desde la base, de color verde brillante y espinas curvadas.



**Figura 2.** Planta silvestre de sotol (*D. cedrosanum*) con inflorescencia (Foto: Yadhira Ortiz Covarrubias. Buenavista, Saltillo, Coah.).

Las flores de *D. cedrosanum* nacen en una inflorescencia de 2 a 4 m de largo a menudo teñidas de rosa, en panículas bracteadas y estrechas, los tépalos varían de colores que pueden ser de color verde, morado o blanquecinos (Figura 2). Se conoce

que es una planta dioica, con flores unisexuales funcionalmente. La flor femenina contiene tres carpelos fusionados con estigmas lobulados y 6 estaminodios vestigiales, mientras que las flores estaminadas tienen un gineceo vestigial y de igual manera seis estambres pero estos sí están desarrollados (Bogler, 1994) (Figura 3). Un estaminodio es un estambre estéril que mantiene características similares a un estambre perfecto; como en las angiospermas, un estambre funcional se divide en dos partes, el filamento y la antera, con diferencia en tamaño y forma con los estaminodios. En algunas especies, los estaminodios de una flor se transforman y cumplen alguna necesidad biológica (Decraene y Smets, 2001).



**Figura 3.** Detalle de la inflorescencia femenina (A) y masculina (B) de *D. cedrosanum* (Foto: Yadhira Ortiz Covarrubias. Buenavista, Saltillo, Coah.).

### II.3 Evolución de la dioecia

Las especies vegetales presentan diversos fenotipos sexuales, entre los que se encuentran las que tienen los dos tipos de órganos sexuales en un único individuo

(monoicas), los que tienen una combinación de ambas estructuras (androdioicas y ginodioicas) y las que presentan los dos sexos en individuos por separado (dioicas). En las angiospermas la incidencia de dioecia es infrecuente; solo ocurre en el 4-6% de las especies (Renner y Ricklefs, 1995). Una gran proporción de las especies dioicas son polinizadas por animales (zoófilas), aunque muchas de ellas son polinizadas también por el viento (anemófilas).

#### **II.4 Sistemas de determinación sexual**

Poco se conoce sobre la base genética de la dioecia en plantas, de reciente evolución, a diferencia de los animales donde los cromosomas sexuales han evolucionado independientemente hasta presentar formas heteromórficas. Solo algunas especies dioicas como *Silene*, *Rumex* y *Humulus* permiten identificar su sexo citológicamente ya que contienen cromosomas sexuales heteromórficos (Negrutiu *et al.*, 2001; Giraldo *et al.*, 2004). En especial, dentro del género *Silene* se encuentran especies de distintos sistemas reproductivos (hermafroditismo, ginodioecia, androdioecia, monoecia, dioecia). Estos estadios evolutivos aportan datos para encontrar el origen de la dioecia (Filatov y Charlesworth, 2002).

La hipótesis más aceptada acerca del origen y la evolución de los cromosomas sexuales propone que éstos han aparecido varias veces en la evolución a partir de una pareja de autosomas, tanto en animales como en plantas (Muller, 1918). Según Charlesworth (2002) se necesitan de al menos dos sucesos evolutivos para el

cambio del hermafroditismo a la dioecia. La mutación a esterilidad masculina en los hermafroditas ocasionaría la sola producción de óvulos; en caso contrario, la mutación supresora de los caracteres femeninos finalizaría con la aparición del género masculino o la producción absoluta de polen. En individuos unisexuales, los vestigios estaminoides en flores femeninas y carpeloides en estructuras masculinas, sugieren una evolución directa vía hermafroditismo siendo este el camino menos frecuente para el desarrollo de la dioecia (Darwin, 1877; Renner, 1995). La ocurrencia más probable es la mutación hacia la esterilidad masculina, la cual originaría una condición conocida como ginodioecia, en donde se encuentra individuos femeninos y hermafroditas.

El siguiente paso, conducente al definitivo establecimiento de los dos sexos implicaría una serie de reestructuraciones cromosómicas que tienen como resultado la acumulación de los genes determinantes del sexo en una pequeña región del genoma. Una vez que han aparecido machos y hembras, la evolución favorecería un ligamiento más estrecho de estos nuevos loci, hecho que dificulta la acción de la recombinación. La supresión subsecuente en recombinación de regiones específicas cromosómicas (locus y alrededor de la región determinantes del sexo) es pues un fenómeno fundamental en la evolución generalizado en individuos de reproducción sexual. Este evento evita la aparición de genotipos que no son adaptativos implicados en la determinación del sexo, como ejemplo los organismos portadores de las mutaciones de esterilidad tanto femenina como masculina (Moore y Ming, 2007). La labilidad de la expresión sexual de las plantas y la aparición ocasional de

hermafroditas en especies de plantas predominantemente dioica son fenómenos que merecen una investigación científica, ya que pueden generar consecuencias considerables con respecto a la evolución y la ecología.

Dentro del reino vegetal, se encuentran especies que se encuentran en diferente etapa evolutiva de su sistema reproductivo. *Asparagus officinalis* L. es una especie ampliamente estudiada que representa la aparición muy primitiva de sus cromosomas sexuales. Es una planta dioica con  $2n = 20$  y con cromosomas sexuales no diferenciados. Marziani *et al.* (1999) han descrito una región en el par de cromosomas V (homomórfica) del cariotipo, que es determinante del sexo. Es un mecanismo basado en la existencia de dos genes reguladores que se han señalado como “male activator” (gen M, que da lugar a individuos macho) y “female supresor” (gen F, que cuando se presenta en homocigosis da lugar a individuos hembra). Los machos son por tanto, heterocigotos MF/mf, mientras que las hembras presentan el genotipo mf/mf.

## **II.5 Teorías sobre la aparición de la dioecia**

Se cuenta actualmente con investigaciones encaminadas a la comprensión del mecanismo genético y molecular responsable de la determinación del sexo en varias especies de plantas dioicas, lo cual da una perspectiva evolutiva. Bawa (1980) establece que la evolución de la dioecia no solo se debe a la presión selectiva que favorece la fertilización cruzada, sino que factores ecológicos como la asignación de

recursos para las funciones masculinas y femeninas, selección sexual, dispersión de semillas, polinización y depredación pueden influir en la evolución de la dioecia.

Algunos otros investigadores han propuesto que la principal fuerza selectiva responsable de la evolución de la dioecia es el incremento de la fertilización cruzada con antecesores auto-compatibles (Charlesworth y Charlesworth, 1978).

No es factible concluir *a priori* que la determinación del sexo se basa en la carga genética del individuo en organismos que no poseen un cromosoma morfológicamente diferenciado entre machos y hembras, ya que se conocen especies de plantas que son capaces de alterar su estado sexual en respuesta a cambios en el entorno ambiental y / o cambios en el tamaño o la edad. Freeman *et al.* (1980) sugieren que la labilidad de la expresión sexual probablemente tiene valor de supervivencia, por lo que beneficia en una parte significativa a las hembras al asumir el costo de la producción de frutos en ambientes desfavorables y demuestran que la expresión sexual lábil mejorará la contribución genética de un individuo a la siguiente generación.

Como se ha mencionado anteriormente, las bases genéticas de la determinación del sexo así como su expresión, pueden ser controladas por cromosomas sexuales. Sin embargo, este control genético de la expresión sexual no parece ser suficientemente fuerte para vencer totalmente los efectos y modificaciones epigenética de la expresión sexual (Lloyd, 1975). Por ejemplo, en *Cannabis sativa*, dioica,  $2n = 22$ , con cromosomas sexuales heteromórficos, a pesar de que sus primordios florales no presentan vestigios del órgano sexual contrario, la aplicación de hormonas revierte

su sexo o simplemente aparecen flores hermafroditas, lo cual indica que estos primordios florales son bipotentes (Mohan Ram y Nath, 1964).

Más modelos de plantas con influencias epigenéticas específicamente ambientales se revisaron por Freeman *et al.* (1980) quienes realizaron una búsqueda bibliográfica de especies dioicas y hermafroditas con inconsistencias en la determinación de su sexo. Estos autores mencionan que algunas variables ambientales predisponen a las plantas individuales de expresión sexual lábil hacia la feminidad como *Catsetum expansum* Rchbif y *C. macrocarpum* L. Estas dos especies se transforman a causa de la alta intensidad de luz. *Cannabis sativa*, cambia de macho a hembra a causa de fotoperiodos cortos y *Acer negundo* L., *Cannabis sativa* L., *Carica papaya* L., *Cleome spinosa* Jacq., *Cucumis sativa* L., *Mercurialis annua* L. y *Morus alba* L. a causa de traumatismos. Otras variables ambientales favorecen la masculinidad; por ejemplo *Atriplex eanescens* Pursh. y *Cyeas cireinalis* L. viran con clima frío, *Cannabis sativa* cambia su sexo a macho en fotoperiodos largos y las altas temperaturas hacen que *Carica papaya* L. vire su sexo a la masculinidad. La regulación génica como otra causa epigenética incluye la acetilación de las histonas nucleosómicas y la metilación del ADN como determinantes de sexo. En la especie *Melandrium album* el cromosomas X de las hembras se encuentra hipermetilado para su inactivación. Janoušek (1996) aplicó en los individuos macho de la especie, tratamientos con 5-azacitidina un compuesto que disminuye la metilación del ADN, logrando la conversión a individuos hermafroditas, lo que sugiere según el investigador el probable surgimiento del dioicismo en esta especie.

## II.6 Marcadores moleculares en la determinación del sexo

Varios investigadores han buscado segmentos de DNA con marcadores moleculares que sean responsables de la definición del sexo en las plantas dioicas o polígamas. Se tienen especies modelos como por ejemplo papaya, esparrago y *Silene*. (Galli *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 2011; Deputy *et al.*, 2002; Giraldo *et al.*, 2004; Korpelainen *et al.*, 2008; Chaves-bedoya *et al.*, 2009).

Sondur *et al.* (1996) propusieron un modelo de tipo sexual para papaya (*Carica papaya*) basada en alelos alternativos de un gen que codifica un factor de actuación trans. En el estudio de la determinación de sexo en papaya, se han determinado 3 tipos de alelos SEX1-M (macho), SEX1-H (hermafrodita) y sex1-f (hembra) en los que la expresión del alelo SEX1-M induce partes florales masculinas, con la inhibición de desarrollo carpelar. Contrariamente en hembra, el alelo sex1-f es incapaz de inducir estructuras masculinas. Empero, la letalidad de los alelos homocigotos SEX1-M o SEX1-H se podría deber a una función adicional, presente solo en el alelo sex1-f o en algún gen estrechamente vinculado a este. No se descarta una mutación letal estrechamente vinculada a los alelos SEX1-M o SEX1-H.

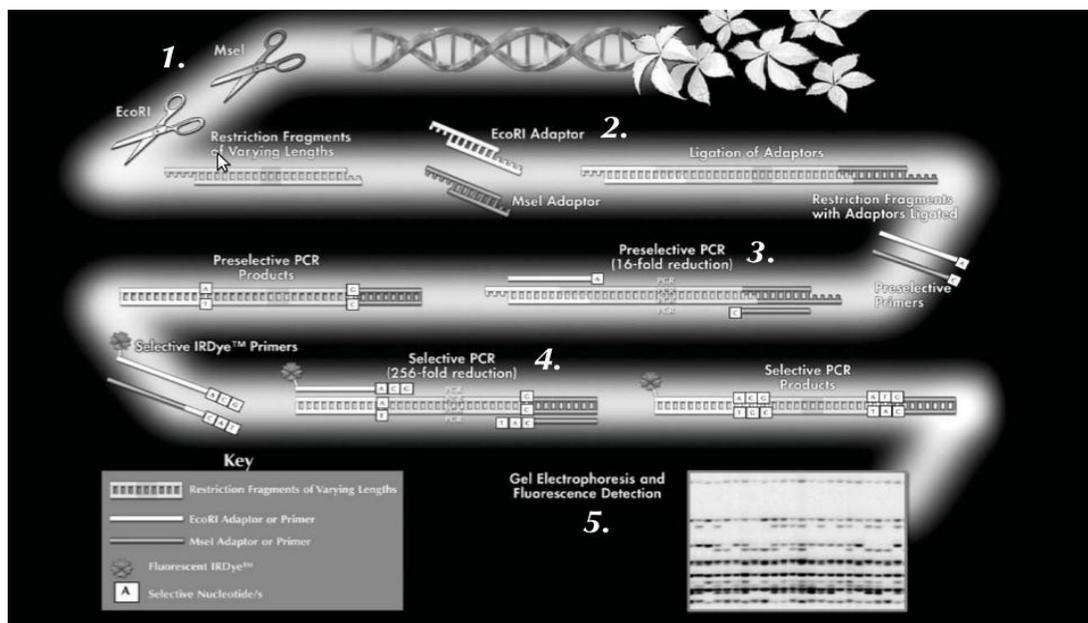
Deputy *et al.* (2002) probaron con 500 iniciadores para RAPD y encontraron productos polimórficos asociados al gen sex1 en papaya. Se clonaron y secuenciaron tres de estas bandas para el diseño posterior de marcadores molecular tipo SCAR. Obtuvieron tres marcadores moleculares, de los cuales W11 y T12 se presentaron solo en plantas hermafrodita o macho, pero no en plantas hembras. Mientras que T1 amplificó en todas las plantas, por lo que se usó como control.

Chaves-Bedoya y Pulido (2009) encontraron marcadores moleculares tipo RAPD específicos para plantas de papaya colombianas RAPD OP-A1, OP-P11 y OP-L1. Asimismo, observaron que marcadores moleculares citados en literatura no permitieron la diferenciación sexual en los genotipos colombianos y se concluyó que la precisión de los marcadores es variable entre los genotipos. Mencionan que posiblemente es debido a la acumulación de secuencias repetitivas y duplicación de genes resultado de la interacción del genotipo con el ambiente.

Korpelainen *et al.* (2008) mencionan que la mayoría de las plantas dioicas no presentan dimorfismo sexual perceptible antes de su madurez sexual por lo cual se están desarrollando marcadores genéticos para la determinación del sexo. Para *Pseudocalliergon* trabajaron con ISSR (inter secuencia de repetición simple) y encontraron una banda polimórfica presente en hembras, de una longitud de 159 pb que se clonó y secuenció, para el diseño posterior de iniciadores que permitieran su amplificación. El método de “sequence-walking” se utilizó para caracterizar la misma región en los individuos masculinos. Mencionan que la corta longitud del producto de amplificación es una ventaja para productos satisfactorios de PCR y observaron que la cantidad de variación en la región de DNA compartido por ambos sexos fue relativamente alta. Al igual que en papaya, este conocimiento representa para los agricultores la oportunidad para poder establecer cultivos diseñados en cuanto al espacio y productividad, en términos de elegir el sexo de mayor provecho para su rentabilidad y comercio.

## II.7 Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Los organismos vivos están expuestos a sufrir mutaciones y como consecuencia, van surgiendo diferencias entre individuos, lo que a nivel molecular repercute en una variación génica o polimorfismo (Frankham, 2003). La técnica de AFLP (Vos *et al.*, 1995) es una importante herramienta para la detección de estos polimorfismos existentes entre individuos. Básicamente es la digestión del DNA genómico mediante enzimas de restricción y la subsecuente amplificación de algunos de esos fragmentos mediante la reacción de la cadena de polimerasa, con oligos selectivos como se muestra en la Figura 4. Estos iniciadores contienen una extensión de 1 a 3 nucleótidos en el extremo 3' y una marca fluorescente para la detección del producto amplificado en gel de poliacrilamida; se observa el polimorfismo como presencia o ausencia de la banda, con un aproximado patrón de bandeo de 50 a 100 fragmentos.



**Figura 4.** Ilustración esquematizada del análisis de AFLP (imagen tomada del manual LICOR “IRDye Fluorescent AFLP Protocol for Large Plant Genome Analysis”).

Esta herramienta se ha utilizado a lo largo de la última década para el análisis de genomas ya que posee un alto poder de detección de la variación genética. El uso de estos marcadores no requiere de usar secuencia conocidas del genoma, ya que la técnica amplifica fragmentos de manera aleatoria. La cantidad de fragmentos observados en una reacción pueden ser seleccionados a partir de iniciadores específicos o selectivos.

Además de la aplicación que se le ha dado para la detección de la variación genética, diversas investigaciones se han realizado para la identificación temprana de sexo en especies de plantas de importante nivel comercial. Es el caso de Giraldo *et al.* (2004) que trabajaron con marcadores tipo AFLP con 64 combinaciones de iniciadores y de los cuales encontraron que las combinaciones E-AAC+ M-CAA y E-ACC+M-CAT detectaron diferencias específicas entre machos y hembras de borojó (*Borojoa patinoi*). El polimorfismo mostró ausencia de la banda en individuos hembra y presencia de bandas en individuos macho con una longitud aproximada de los fragmentos de 290 pb. El borojó es una especie originaria de Colombia que produce un fruto (baya) que es de importancia económica debido a sus propiedades nutraceuticas. De igual forma Wang *et al.* (2011) trabajaron con *Eucommia ulmoides* Oliv. especie dioica de gran importancia económica. En esta especie, el sexo femenino es deseable por su alto grado de producción, en comparación con los individuos machos. Experimentaron con un total de 64 combinaciones de iniciadores de marcadores AFLP. La combinación que marcó el polimorfismo fue E-ACA/M-CTT tanto en la prueba de compuestos como en la validación, la cual produjo una banda a

350 bp presente en machos. Posteriormente se clonó y secuenció, obteniendo un marcador SCAR (región amplificada caracterizada por secuencia) de 247 pb. Este tipo de marcador resultó costeable para la determinación temprana del sexo en esta especie. Además se comprobó que el uso de compuestos es un método eficiente en la búsqueda de marcadores diferenciales, ya que se ahorra en tiempo y reactivos.

## II.8 Citometría de flujo

El análisis con citometría de flujo del contenido de DNA nuclear es una importante herramienta utilizada en muchas áreas de las ciencias biológicas. Las aplicaciones van desde el conocimiento del nivel de ploidía, la estimación del tamaño del genoma nuclear y su composición de base. Adicionalmente, este conocimiento permite la realización de estudios comparativos, como por ejemplo, estudios de la variación del contenido en DNA a lo largo de la evolución de las plantas; así también, el uso de esta tecnología más específicamente, puede ser aplicado para buscar diferencias en el contenido de DNA en plantas de origen dioico. Tal es el caso de *Melandrium album* y *M. rubrum* que cuenta con cromosomas sexuales heteromórficos X pequeño y Y grande, lo que resulta en una diferencia en el contenido de DNA nuclear entre las hembras ( $2n = 24, XX$ ) y los machos ( $2n = 24, XY$ ). Dolezel *et al.* (1995) reportaron una diferencia entre el contenido genético de estas especies que aunque es muy pequeña (3.7%), indirectamente han podido estimar esta diferencia usando un estándar de referencia interna y comparando los valores resultantes. Concluyeron que mientras la diferencia en el contenido fuese suficientemente alta, el sexo pudiera

ser diagnosticado directamente, es decir, después de análisis simultáneo de núcleos aislados a partir de dos individuos (uno individuo de sexo conocidos y uno con sexo desconocido). Esto siempre y cuando no exista un %CV mayor de 3% para poder discriminar entre los picos de la gráfica.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Localidades

Se seleccionó una localidad del estado de Coahuila (Buenavista) y otra de Zacatecas (Providencia) para la toma de muestras vegetales, donde se encontraron poblaciones de *D. cedrosanum* en plena madurez sexual que se distinguieron por los escapos florales. En el Cuadro 1 se anotan las coordenadas de dichas localidades.

**Cuadro 1.** Coordenadas de las dos localidades seleccionadas para muestreo.

Localidades	Latitud	Longitud	Altitud (m)
<i>Buenavista</i>	25°20.947'	101°1.669'	1786
<i>Providencia</i>	24°42.99'	101°30.116'	1970

#### III.2 Material vegetal

En las localidades anteriormente descritas se etiquetaron plantas plenamente identificadas por su sexo, ya que estas contaban con escapo floral. Posteriormente

se hizo una selección aleatoria de las plantas etiquetadas con el comando *sample* sin remplazo del lenguaje y ambiente estadístico R (R Development Core Team, 2011) y se recolectaron hojas (Cuadro 2). Las muestras de hojas de sotol ya recolectadas se dejaron secar a media sombra para su consecuente tratado en el laboratorio.

**Cuadro 2.** Relación de plantas etiquetadas y colectadas.

Localidad	Etiquetadas H/M	Colectadas H/M
Buenavista	66/49	25/25
Providencia	66/32	25/25

Hembra= H, Macho=M

### III.3 Extracción de DNA

Se aisló DNA de hojas secas de plantas silvestres de *D. cedrosanum* en el Laboratorio de Análisis de Genomas (UAAAN) y en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, por medio de el método de López *et al.* (1995). El procedimiento involucra el rompimiento de la pared celular, pulverizando 20mg de tejido y usando nitrógeno líquido. En seguida, para destruir las membranas celulares (de manera que el DNA, proteínas, enzimas, carbohidratos, queden disponible) se agregaron 600 µl de Buffer de Lisis (Tris-HCl 100mM a pH=8, NaCl 20nM, EDTA 20mM y N-Lauril-sarcosina al 7%) a un tubo Eppendorf de 2ml, así como el tejido molido y 5 µl de RNAsa (10mg/ml). Se mezcló hasta humedecer el polvo y se dejó reposar por 10min aproximadamente; el EDTA (agente quelante) se empleó para

proteger el DNA de la acción de enzimas nucleasas capturando los iones magnesio y evitando que actúen como cofactores de las nucleasas; el NaCl se emplea para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afectan la pureza del DNA, pudiendo inhibir la actividad de algunas enzimas. Posteriormente se agregaron 600µl de fenol (equilibrado con tris), se agitó en vortex y se centrifugó por 20min a 4°C y 12,000rpm. Se retomó la fase acuosa y transfirió a otro tubo. Se precipitó el DNA con 600µl isopropanol frío vaciando sobre este el sobrenadante que viene de la incubación. Se dejaron los tubos a -20°C por media hora aproximadamente hasta observar el DNA en forma de madeja. Se colectó la madeja con un gancho de pipeta Pasteur estéril (flameada con OH). Se desprendió la madeja del gancho y se depositó en un tubo Eppendorf para su posterior lavado con alcohol grado 96. Se dejó secar por 10min aproximadamente. Se resuspendió en 50µl de TE 1% en un tubo de 1.5ml. Se guardó a 4°C. Se cuantificó y evaluó su calidad midiendo espectrofotométricamente la absorbancia a 260nm (A260) y a 280nm (A280), usando un Nanodrop ND-1000 y un volumen de 1µl de muestra sin diluir, ya que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260nm mientras que las proteínas lo tienen a 280nm; obteniendo el cociente de ambas absorbancias (A260/280) se puede saber si el DNA genómico extraído está puro o contaminado con restos de proteínas; por medio de electroforesis en gel de agarosa se corroboró la integridad del DNA. Para este último paso se disolvió en 100 ml de TAE 10x, 1g de agarosa en polvo, se calentó en microondas por alrededor de 90s o hasta que se observó completamente homogénea la mezcla. En seguida, se agregaron 10µl de gel red agitando para su incorporación. Esta mezcla se vertió en la placa de corrida colocando el peine en la

parte superior del aparato electroforético, eliminando burbujas y se dejó enfriar por 20min. Al pasar del tiempo señalado, se cargaron 5µl de la muestra + 2µl de buffer de carga, por cada pozo y se corrió el gel a un voltaje de 70volt durante 1h. Al término se fotografió el gel en un digitalizador de imágenes.

#### **III.4 Formación de compuestos**

Ya evaluada la calidad, integridad y cantidad de las muestras de DNA, se seleccionaron las mejores. Se combinaron cantidades equivalentes de 20 plantas macho y de 20 plantas hembra, ajustadas aproximadamente a 100ng/µl para formar 4 compuestos de 10 individuos cada uno, de la localidad de Providencia.

#### **III.5 Marcadores moleculares tipo AFLP**

Para iniciar los ensayos de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados, solo se empleó la localidad de Providencia Zac., a fin de buscar los iniciadores con los que se hiciera visible el polimorfismo para el resto de las muestras a analizar. Sobre estas mezclas de DNA (4 compuestos- 2 machos y 2 hembras) se aplicó la técnica de AFLPs con 40 combinaciones de iniciadores a través del protocolo "IRDye Flourecent AFLP Kit for Large Plant Genome Analysis", el cual usa dos colorantes fluorescentes (700 y 800nm). El procedimiento involucró digestión de DNA con 2 enzimas EcoR1 y Mse1 de corte raro y frecuente respectivamente, para generar

pequeños fragmentos de DNA; se incubó agregando DNA [100ng/μl] 9μl, 5x buffer de reacción 2.5μl, EcoR1/Mse1 1.0μl durante 2h a 37°C y 15min a 70°C en el termociclador, para inactivar enzimas se empleó la última temperatura. Posteriormente se hizo la ligación de adaptadores en los fragmentos de DNA cortados, a fin de generar los templates para la amplificación; se agregó adaptador mix 12.0μl y T4 DNA ligasa 0.5μl incubándose a 20°C por 2h. Después de la incubación se hizo una dilución 1:10 (10μl de R/C + 90μl de TE buffer) el resto (15μl) se almaceno a -20°C. En seguida se hizo una amplificación de PCR preselectiva con 2 iniciadores (de un nucleótido) complementarios al adaptador ligado anteriormente, se emplean para amplificar regiones flanqueantes que contienen el sitio de unión del iniciador y el sitio de restricción; consistió en mezclar 2.5μl de la dilución 1:10 R/L, 2.5μl de PCR reacción 10x, 0.5μl de Taq DNA polimerasa y 20μl de Mix Pream AFLP's y se amplificaron en termociclador a 94°C-30s, 56°C-1min, 72°C-1min, 4°C-∞. Se hizo del DNA amplificado una dilución 1:40 (5μl de DNA pre amplificado + 195μl de agua ultra pura. Se almacenó el DNA total (pre-amplificación template mix) a -20°C. Por último, se hizo la amplificación selectiva con 13 iniciadores (5 Mse I y 8 EcoR1) de 3 nucleótidos en 40 combinaciones para amplificar regiones de templates pre-amplificados. Los iniciadores usados fueron 5 Mse1: M-CAG, M-CAT, M-CTG, M-CTA Y M-CTT; y 8 iniciadores EcoR1: E-AAC, E-AAG, E-ACA, E-ACC de 700nm y E-ACG, E-ACT, E-AGC, E-AGG de 800nm. Las combinaciones se muestran en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Combinación de iniciadores experimentados para la amplificación selectiva.

	M-CTG	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTT
E-ACG*	■	■	■	■	■
E-AGC*	■	■	■	■	■
E-ACT*	■	■	■	■	■
E-AGG*	■	■	■	■	■
E-AAC**	■	■	■	■	■
E-ACC**	■	■	■	■	■
E-ACA**	■	■	■	■	■
E-AAG**	■	■	■	■	■

M=Mse1, E=EcoR1, \*IRDye 700 nm, \*\*IRDye 800 nm.

Se hicieron cocteles con 2.0µl del DNA pre-amplificado (1:40), Mse1 (correspondiente) 2.0µl, EcoR1 marcado para 700nm 0.5µl, EcoR1 marcado para 800nm 0.5µl, H2O 4.8µl, buffer Taq 10x 1.21µl, Taq polimerasa 0.1µl. Las condiciones de PCR fueron: 94°C 5min, 94°C 30 s para la desnaturalización inicial, 65°C 30s. La temperatura de hibridación se redujo 0.7°C por ciclo durante los primeros 12 ciclos de 94°C-30s, 95°C-30s y 72°C-1min, otros 23 ciclos se realizaron a 94°C-30s, 56°C-30s y 72°C-1min y refrigerar a 4°C. Después se hicieron alícuotas de 3µl DNA segunda amplificación + 5µl de blue stop (que contiene xileno-cianol y azul de bromofenol), se mezcló, centrifugó y desnaturalizó por 3min a 94°C refrigerando a 4°C.

Finalmente los productos de la amplificación selectiva desnaturalizados, (2µl producto de la segunda amplificación selectiva y 3µl de blue stop a 94°C) se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida; el procedimiento fue el siguiente: para la preparación del gel de un espesor 0.25mm X 25cm de largo se añadió 20ml de acrilamida al 6.5%, 15µl de TEMED, adicionando 150µl de APS al 10% por las paredes y evitando así la formación de burbujas.

La solución se inyectó en medio de los vidrios de corrida de forma gradual y uniforme colocando en la parte superior el peine de dientes de tiburón de 48 cerdas. Al paso de una hora, la acrilamida polimerizó y se montó en el secuenciador automático LI-COR junto con las cámaras inferior y superior que contienen el buffer de corrida (TBE 1x = TBE 10X 100ml + 900ml de agua destilada). Se recorrió el gel durante 30min para posteriormente cargar 1µl de muestra desnaturalizada. Las imágenes de geles fueron analizadas con el software LI-COR SAGA MX versión 2.1.

Del análisis de compuestos descrito precedentemente, se seleccionaron las siguientes combinaciones de iniciadores M-AGG+E-ACC, M-AGG+E-AGG y M-CTG+E-AAC (Cuadro 4) que se validaron con las poblaciones de Buenavista y Providencia (esta región solo con la última combinación) aplicando de manera análoga la metodología de AFLP anteriormente descrita.

**Cuadro 4.** Validación con iniciadores candidatos del análisis de compuestos.

Población	700 nm	800 nm
Buenavista	M-AGG+E-ACC	M-AGG+E-AGG
Buenavista y Providencia	M-CTG+E-AAC	

Se procedió con la selección de los marcadores que presentaron probables bandas polimórficas, con la evaluación y codificación directa en la imagen del gel, 0, 1 y NA para la ausencia, presencia o dato perdido, respectivamente. Con esta última matriz, se estimó la magnitud con la que los dos fenómenos se relacionan estadísticamente, a través del coeficiente de correlación para caracteres categóricos (Ott, 1999) como medida de asociación con la siguiente fórmula:

$$\text{Coeficiente de correlación} = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) * n_1 - (n_1 + n_2) * (n_1 + n_3)}{\sqrt{(n_1 + n_2) * (n_3 + n_4) * (n_1 + n_3) * (n_2 + n_4)}}$$

Donde  $n_1$  es el número de machos con la banda presente,  $n_2$  es el número de hembras con banda presente,  $n_3$  es el número machos con ausencia de la banda y  $n_4$  es el número de hembras con ausencia de la banda. Las pruebas estadísticas se basaron en la prueba de chi cuadrada con 0.0005 como valor de p máximo para declaración de la significancia. El ambiente estadístico para los análisis se realizó en R (R Development Core Team, 2011).

### **III.6 Análisis comparativo de valores C de DNA**

Por citometría de flujo se compararon las cantidades de DNA por célula en plantas de ambos sexos del sotol. Se tomaron muestras de tejido de hoja madura de diez plantas plenamente identificadas como hembras y diez como machos de material vegetal colectado de la localidad de Providencia. El análisis se realizó en las instalaciones del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO). Se usó un kit de reactivos para la extracción y la tinción de DNA nuclear en planta, con el fin de determinar las variaciones del tamaño del genoma. El primer paso fue el rompimiento de tejido que se realizó de manera mecánica con ayuda de una navaja troceando aproximadamente 2g de tejido vegetal fresco disuelto en 500µl de tampón de extracción de núcleos (Cystain UV precise P. Partec, Münster, Germany) dentro de una caja petri desechable estéril dejándolo incubar por 6min, esto con el fin de separar las células del tejido. Una vez disgregadas, se le añadió 1500µl de buffer de tinción de DNA (Cystain UV precise P. Partec, Münster, Germany) este buffer de extracción de núcleos contiene el fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole), que tiñe el DNA y se dejó reposar por 3min. Las células teñidas suspendidas se recogieron con micropipeta suavemente y enseguida se filtró a través de una malla de nylon de 50µm, para eliminar el tejido y los fragmentos celulares. La suspensión se recogió en un tubo de ensayo para su posterior uso. Esto se realizó de manera separada para cada una de las 20 muestras para su posterior proceso en un citómetro de flujo, cuyo sistema UV permitió la generación de curvas de frecuencia para cantidades de DNA por célula de la siguiente manera, la

suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser) equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366nm de longitud de onda. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), mientras es iluminada por la luz ultravioleta; en respuesta, el fluorocromo DAPI fijado al DNA emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de DNA en el núcleo, que es reconocida y captada por un fotoreceptor y registrándose en el sistema informático que lleva incorporado el citómetro.

Las posiciones de los picos y los porcentajes de coeficientes de variación (CV) se calcularon usando el software Partec. Además, en el lenguaje y ambiente estadístico R (R Development Core Team, 2011) bajo el comando de *t.test* se realizó la comparación de medias para datos no apareados. El sistema se calibró previamente situando el pico correspondiente a un contenido de DNA sobre el valor 100 de la escala del eje de las abscisas.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1 Calidad en extracción de DNA

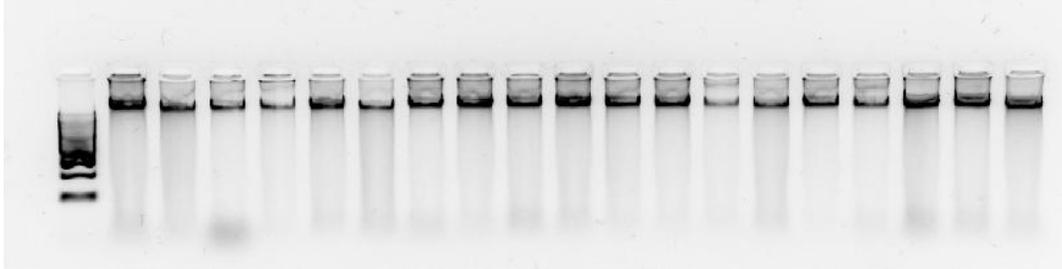
Para comprobar la pureza de las muestras de DNA extraídas se midió la absorbancia en un espectrofotómetro y se obtuvo un promedio de 1.76 A260/280 (Cuadro 5). La absorbancia ideal es de 1.8 a 2.0 A260/280 aun así, el promedio obtenido en este experimento es aceptable para las pruebas de AFLPs.

**Cuadro 5.** Medias de absorbancia (A260/280) promedio para las poblaciones de Providencia y Buenavista.

Medias de absorbancia	Machos	Hembras
Promedio	1.7628	1.768
Máx	1.91	2.16
Mín	1.47	1.51
Desviación estándar	0.0969	0.1237

Por otro lado, para corroborar la integridad del DNA extraído, es decir, no fragmentado, se corrió un gel para apreciar el grado de calidad.

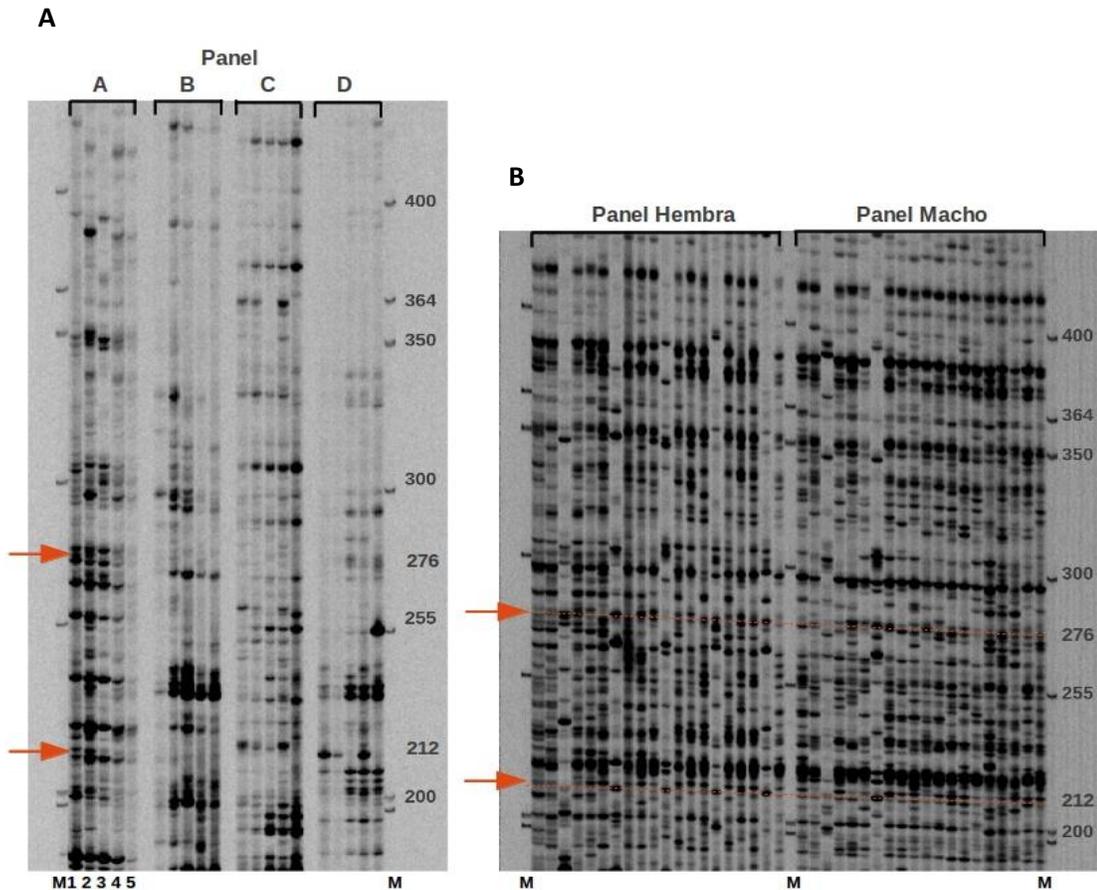
Se puede observar en la Figura 5 la formación de una banda nítida para cada muestra.



**Figura 5.** Muestras representativas de la calidad de DNA de la región de Providencia en gel de agarosa.

#### **IV.2 Ensayo de AFLPs**

De las 40 combinaciones de iniciadores probadas en los compuestos de 10 individuos para detectar el polimorfismo genómico entre machos y hembras, se encontraron iniciadores candidatos (Cuadro 6). En la Figura 6 se muestran los geles de la combinación MCTG-EAAC, el gel prueba de los compuestos (apartado A) y la validación con muestras individuales de la región de Providencia (apartado B). Como se observa en el panel A del gel de prueba, hay 2 polimorfismos a 212 y 275 pb. Estos se buscaron en el gel de validación, se les hizo un análisis de correlación y no fueron significativos los valores p de 0.290276 para la banda de 212 pb y 0.02205 para la banda a 275 pb. Sin embargo, se encontraron en el gel de validación otras bandas que si fueron significativas, por lo cual se reportan y se explican más adelante (Cuadro 6). Igualmente sucedió para las demás pruebas que se mencionan en seguida.



**Figura 6.** Geles de poliacrilamida con marcadores AFLP. Localidad = Providencia. M = marcador de peso molecular. **A.** Pruebas con cuatro compuestos. Combinaciones de iniciadores en: panel A = M-CTG+E-AAC, panel B = M-CTG+E-ACC, panel C = M-CTG+E-ACA, panel D = M-CTG+E-AAG. Carril 1 y 2: compuesto de 10 individuos hembra. Carril 3 y 4: compuesto de 10 individuos macho. Carril 5: control. Polimorfismo con diferencias entre machos y hembras a 212 y 275 pb (panel A). **B.** Gel de validación combinación M-CTG+E-AAC. Panel Hembra: 20 carriles con DNA de plantas individuales. Panel Macho: 20 carriles con DNA de plantas individuales de la región de Providencia. Polimorfismo a 212 y 275 pb.

Se hizo la validación con plantas individuales: 40 machos y 38 hembras de la región de Buenavista y Providencia (18 hembras y 20 machos; 20 hembras y 20 machos, respectivamente para cada localidad). Se muestran en las siguientes figuras las fotos de los geles de poliacrilamida en donde se corrieron las muestras de DNA de plantas

individuales para la validación con los iniciadores seleccionados. En la Figura 7 y 8 se muestra la combinación de iniciadores M-AGG+E-ACC a 700nm y M-AGG+E-AGG a 800nm respectivamente para la región de Buenavista y M-CTG+E-AAC a 700nm en la Figura 9 para las regiones de Buenavista y Providencia.

El polimorfismo fue variable con 50 a 100 fragmentos amplificados por combinación de iniciadores que se muestran en el Cuadro 6 y el tamaño de los marcadores AFLP osciló aproximadamente entre 50 a 500pb. Se optó por la recomendación descrita en el manual de LICOR y se ensayó con combinaciones de iniciadores descritos para el maíz (*Zea mays*).

**Cuadro 6.** Tabla de contingencia de los 4 polimorfismo encontrados con 3 combinaciones de iniciadores.

Población	Primers	Pb	Hembra		Macho		Bandas totales
			Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	
Providencia	M-CTG+E-AAC	323	8	5	15	2	86
		410	12	0	19	0	86
Buenavista	M-AGG+E-ACC	300	0	16	11	8	48
	M-AGG+E-AGG	364	2	16	13	6	107
	M-CTG+E-AAC	323	7	10	19	1	86
		410	0	17	12	6	86
Combinada	M-CTG+E-AAC	323	15	15	34	3	86
Combinada	M-CTG+E-AAC	410	13	17	30	6	86

Combinada= Buenavista y Providencia

De la misma manera, en el Cuadro 6 se presenta el conteo de las bandas presentes o ausentes dependiendo del peso molecular señalado (estos datos se usaron más adelante para la prueba de chi cuadrada). Para la combinación M-AGG+E-ACC se

encontró un polimorfismo que representa 11 bandas presentes en macho y cero presentes en hembra a 300pb (Figura 7); en la combinación de iniciadores de M-AGG+E-AGG se observaron 13 bandas presentes en macho y 2 presentes en hembra a 364pb (Figura 8); de la misma forma para la combinación M-CTG+E-AAC resultaron 19 bandas presentes en macho y 7 presentes en hembra a 323pb; cero bandas presentes en hembra y 12 bandas presentes en macho a 410pb esto para la región de Buenavista (Figura 9A); mientras que para la región de Providencia fueron 8 bandas presentes para macho y 15 para hembra a 323pb; y a 410pb se encontraron 19 bandas presentes para macho y 12 para hembra. (Figura 9B).

En el Cuadro 7 se exhiben las bandas que fueron significativas para la prueba de chi cuadrada de Pearson en la región de Buenavista asumiendo un valor p máximo de 0.0005. La banda de la combinación M-AGG+E-ACC a 300pb obtuvo un valor significativo de 0.000237411, M-AGG+E-AGG a 364pb un valor de 0.0003869259, la combinación M-CTG+E-AAC a 323pb fue significativo con 0.0003574157 y M-CTG+E-AAC a 410pb consiguió un valor de 0.0000328323. Estos resultados, apoyan el rechazo de la hipótesis nula de independencia entre bandas de macho y hembra de *D. cedrosanum*. Con estas inferencias podemos suponer que el gen o secuencia de nucleótidos presentes para la singularidad de sexos en *D. cedrosanum* pudieran estar en la vecindad de estos fragmentos. Aun así, es necesario probar con más iniciadores para detectar el fragmento diferencial preciso de los sexos en sotol tal como lo reportan Wang *et al.*, (2011) y Jung (1998). El no encontrar dicho fragmento exclusivo para macho o hembra, puede deberse a que la región del genoma que

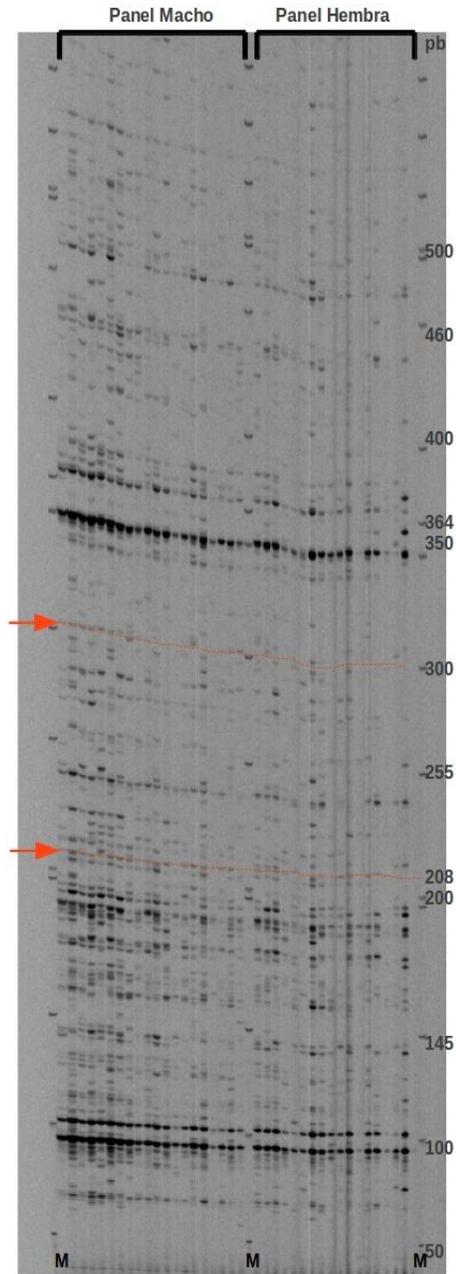
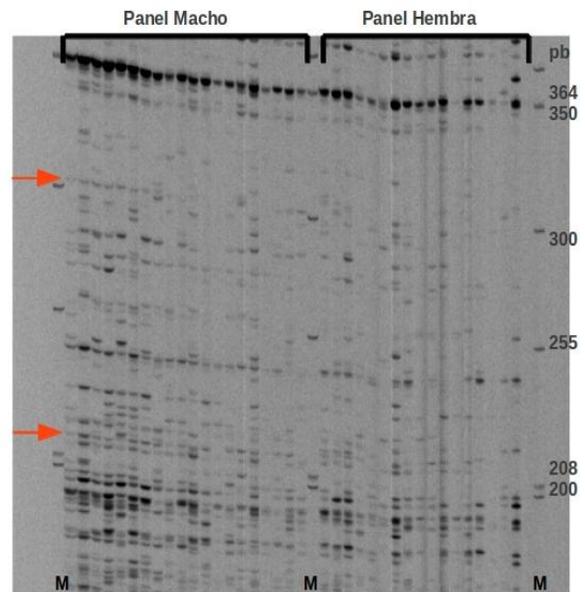
determina el sexo es muy pequeña lo que dificulta encontrarlo con el número de iniciadores con las que se experimentó.

En la validación con la combinación de iniciadores M-CTG+E-AAC en la región de Buenavista se obtuvo un resultado significativo para los marcadores a 323 y 410pb. Estos mismos marcadores se buscaron en la amplificación con la misma combinación de iniciadores de la región de Providencia. Se conjuntaron los datos, para hacer la prueba de chi cuadrada y el resultado fue 0.004679 y 0.0006824 respectivamente, por lo tanto, no significativo (Cuadro 7). Sin embargo, ya que el valor de P es bajo, se podría suponer que es una banda candidata a un nivel sugestivo. La validación solo se hizo para la combinación M-CTG+E-AAC en las dos poblaciones ya que hubo falta de iniciadores y tiempo para amplificar con las otras dos combinaciones en la región de Providencia.

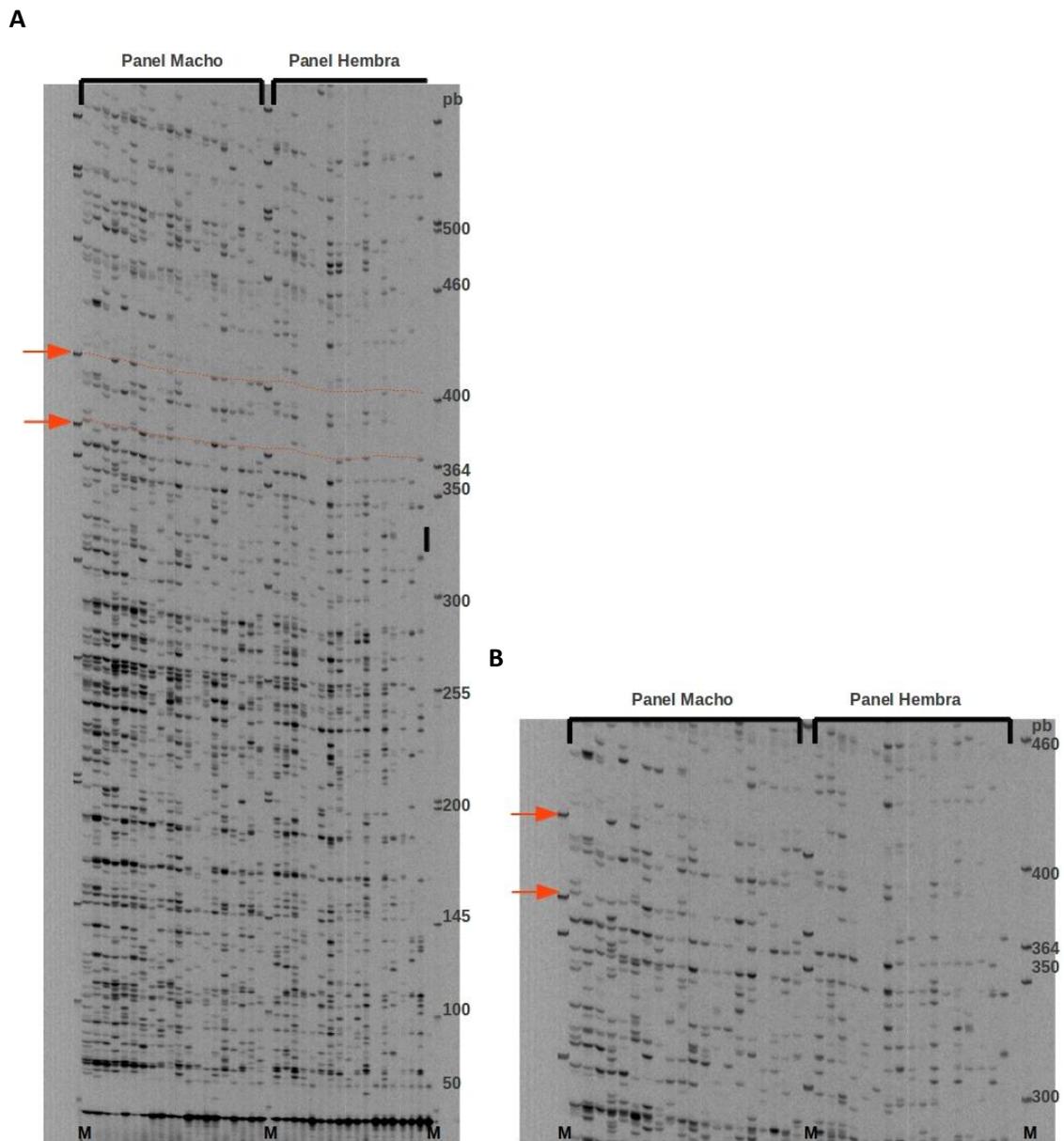
**Cuadro 7.** Resultados de las pruebas de correlación y chi cuadrada para los polimorfismos encontrados con 3 combinaciones de iniciadores.

Población	Primers	Pb	Correlación	Chi2
Providencia	M-CTG+E-AAC	323	0.3017184	0.1042045
	M-AGG+E-ACC	300	0.6212607	0.0002374511*
Buenavista	M-AGG+E-AGG	364	0.5834264	0.0003869259*
	M-CTG+E-AAC	323	0.5868520	0.0003574157*
		410	0.7019641	3.283232e-05*
Combinada	M-CTG+E-AAC	323	0.3535365	0.004679769
Combinada	M-CTG+E-AAC	410	0.4179975	0.000684214

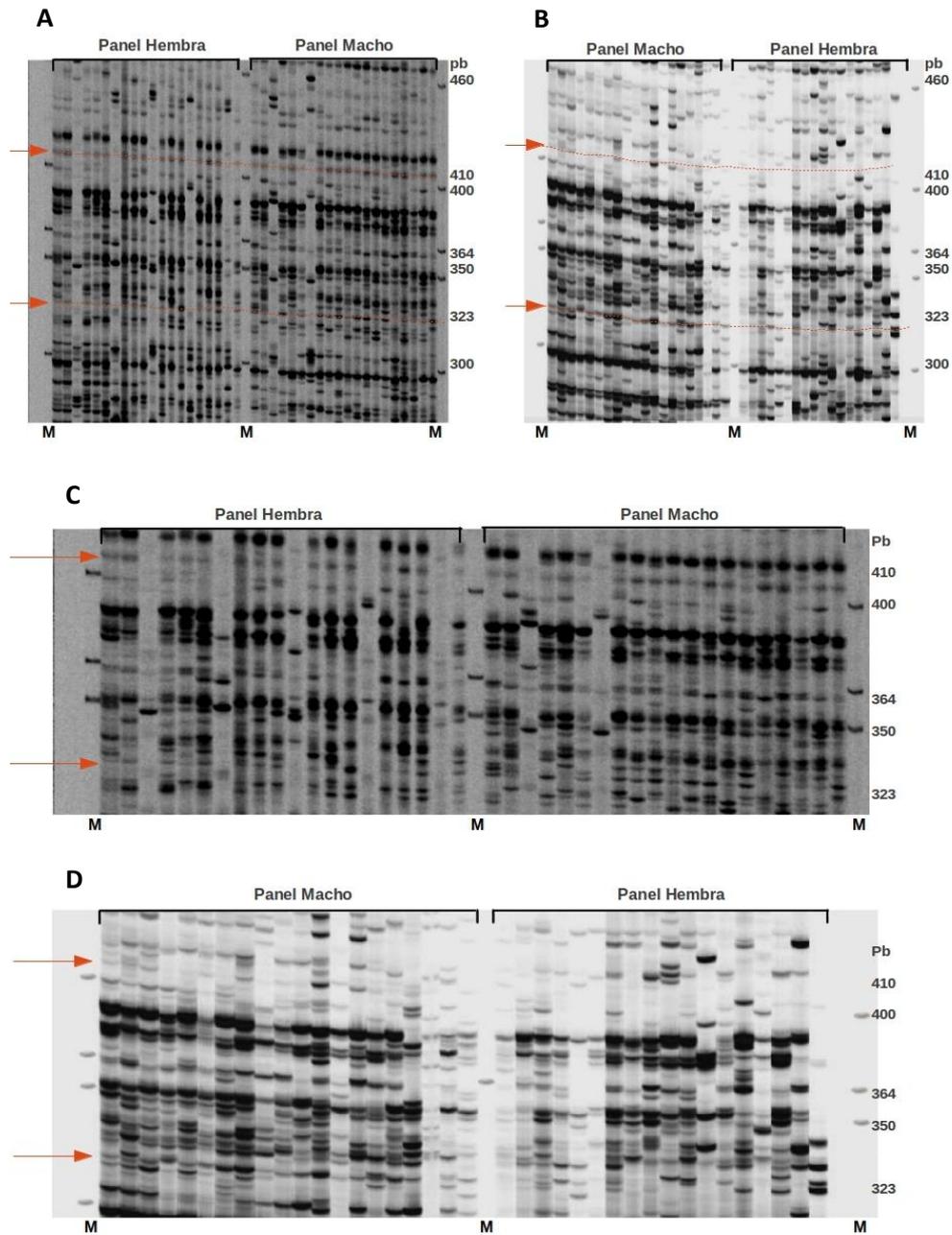
Combinada= Buenavista y Providencia, \* = valores significativos, chi2= chi cuadrada

**A****B**

**Figura 7.** Gel de poliacrilamida con marcadores AFLP. Panel Hembra: 18 carriles con DNA de plantas individuales. Panel Macho: 20 carriles con DNA de plantas individuales. Combinación de iniciadores M-AGG+E-ACC a 700 nm. M = marcador de peso molecular, pb = pares de bases **A.** Polimorfismo con diferencias significativas entre machos y hembras en la población de Buenavista 300 pb. Otro polimorfismo no significativo en 208 pb. **B.** Detalle ampliado del polimorfismo del apartado A.



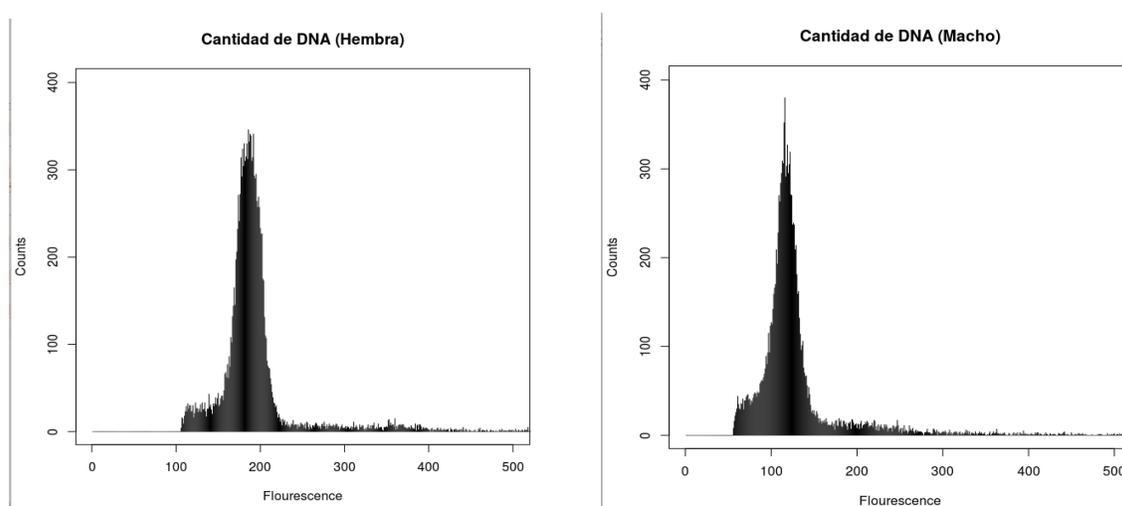
**Figura 8.** Gel de poliacrilamida con marcadores AFLP. Panel Hembra: 18 plantas individuales. Panel Macho: 20 plantas individuales. Combinación de iniciadores M-AGG+E-AGG a 800 nm. M = marcador de peso molecular, pb = pares de bases. **A.** Polimorfismo con diferencias significativas entre machos y hembras en la población de Buenavista a 364 pb. Otro polimorfismo no significativo a 400 pb. **B.** Detalle ampliado del polimorfismo del apartado A.



**Figura 9.** Gel de poliacrilamida con marcadores AFLP. Combinación de iniciadores M-CTG+E-AAC. M = marcador de peso molecular, pb = pares de bases. **A.** Validación con plantas individuales de las región de Providencia. Panel Hembra: 20 plantas individuales. Panel Macho: 20 plantas individuales. Polimorfismo con diferencias entre machos y hembras a 323 y 410 pb. **B.** Validación con plantas individuales de las región de Buenavista. Panel Hembra: 18 plantas individuales. Panel Macho: 20 plantas individuales. Polimorfismo con diferencias significativas entre machos y hembras a 323 y 410 pb. **C.** Detalle ampliado de bandeo polimorfo a 323 y 410 pb (apartado **A**). **D.** Detalle ampliado de bandeo polimorfo a 323 y 410 pb (apartado **B**).

### IV.3 Ensayo de valor C DNA

El gráfico resultante del análisis del contenido de DNA por célula ordena los datos según el contenido nuclear de DNA en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas (Figura 10). En los ejemplos de las curvas de frecuencias tanto del sexo femenino como el masculino, se observa la presencia de solo un pico, que se supone es de células en la fase G1 del ciclo mitótico de la hoja de la planta muestreada (Figura 10); la presencia de un solo pico se puede interpretar por el alto estado de madurez de la hoja tomada como muestra.



**Figura 10.** Histogramas para cantidades de DNA por célula en plantas hembra y macho de *D. cedrosanum*.

El análisis estadístico realizado con los resultados de valores para cada muestra arrojados por el software Partec, da un valor de promedio para hembras de 189.8117

y para machos de 158.6362. Asimismo, en el Cuadro 8 se muestran los porcentajes de coeficiente de variación para cada muestra, se encuentra un valor medio de 9.70 para hembras y 17.40 para machos. Se desarrolló una prueba de t de datos no apareados con las medias de cada muestra y se obtuvo un valor estadísticamente significativo de 0.003152 con lo cual, se rechaza la hipótesis nula de que la diferencia de medias entre contenidos nucleares de los dos sexos de sotol es igual a cero.

Sin embargo, los datos arrojados por el software Partec (Cuadro 8) para cada muestra individual, hacen ver que tanto las medias como los %CV son muy inconstante entre las muestras del mismo sexo. Por lo cual, este resultado debe ser validado con otro equipo de citometría.

Se esperaría poca variación entre los contenidos nucleares de los machos y las hembras de *D. cedrosanum* ya que estudios citológicos mencionan que es probable que no existan cromosomas sexuales diferenciados o heteromórficos (Henrandez-Quintero, 2013). Como ya se mencionó, la diferencia en los contenidos de DNA entre plantas pisitiladas y estaminadas se presenta más en plantas evolucionadas en cuanto a la morfología de sus cromosomas, es decir, con cromosomas sexuales heteromórficos. Sin embargo, cuando se hace el análisis con citómetro de flujo que funciona con luz ultravioleta además de hacer la medición en contenido de DNA por célula, genera fuentes de variación por la presencia de bases modificadas como la metilación. Esto generaría una posible causa de la diferencia entre la cantidad

medida de contenido nuclear en las células macho y hembra de la especie en cuestión.

**Cuadro 8.** Datos de fluorescencia por citometría de flujo en plantas hembra y macho de sotol.

Muestra	Media	CV%
<i>Hembras</i>		
01Pr	220,15	7.54
04Pr	145,54	11.49
06Pr	182.02	10.31
09Ph	148,56	11.95
11Pr	180.38	15.04
15Pr	184.94	7.98
17Pr	210.85	7.04
19Pr	189.65	9.62
21Pr	214.9	6.48
26Pr	200,59	8.49
30Pr	213,49	7.23
32Pr	186,67	13.34
<i>Machos</i>		
03Pr	150.5	14.43
07Pr	115.14	13.51
22Pr	156.29	6.44
23Pr	150.5	14.43
24Pr	142.75	12.54
27Pr	184.44	8.88
28Pr	150.3	31.53
33Pr	150.3	31.53
37Pr	170.82	10.26
38Pr	201.67	9.99
40Pr	189.22	35.29
43Pr	151.97	11.17
44Pr	148.37	26.31

%CV= Porcentaje coeficiente de variación.

## V. CONCLUSIONES

Se encontraron marcadores AFLPs candidatos para su asociación con el sexo de la planta en *D. cedrosanum*. Además se observó que en todas las asociaciones que fueron significativas, la presencia de la banda estuvo vinculada preferentemente al sexo masculino. Por otro lado, no se encontraron bandas exclusivas para alguno de los dos sexos.

Con respecto al análisis comparativo de DNA por citometría de flujo entre sexos, se encontraron diferencias significativas que deben ser validadas en otro citómetro por la alta variación que se observó dentro de sexos. Ya que la tecnología que se usó es sensible a la metilación, este puede ser un factor que esté ocasionando la variación tanto dentro como entre sexos.

## VI. LITERATURA CITADA

- Anderson, J. 2012. Does Insect Pollination Limit Seed Production in White Cockle (*Silene latifolia Poir.*). PhD dissertation. University of Saskatchewan.
- Bawa, K. S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Ann. Rev. Syst. II*: 15-40.
- Bogler, D. J. 1994. Taxonomy and Phylogeny of *Dasyliirion* (Nolinaceae). PhD dissertation. University of Texas. 307-340pp.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity (Edinb)*. 88: 94-101.
- Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am. Nat.* 112: 975-997.
- Chaves-bedoya, G. and M. Pulido. 2009. Marcadores RAPD para la identificación del sexo en papaya (*Carica papaya L.*) en Colombia. *Agro. Colomb.* 27: 145–149
- Contreras, D. C. y R. I. Ortega. 2005. *Bebidas y Regiones*. Editorial Plaza y Valdés. Primera edición. México DF.
- Darwin, C.R. 1877. *The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species*. John Murray. London.
- Decraene, L. P. R. and E. Smets. 2001. Staminodes: Their morphological and evolutionary significance. *The Bot. Rev.* 67: 351-402.

- Dellaporta, S. L. and A. Calderon-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *Plant cell*. 5: 1241–51.
- Deputy, J. C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt, *et al.* 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 107–11.
- Dolezel, J. and W. Gohde. 1995. Cytometry, Sex Determination in Dioecious Plants *Melandrium album* and *M. rubrum* Using High-Resolution Flow. *Cytometry*. 19: 103–106.
- Filatov, D. A., D. Charlesworth. 2002. Substitution rates in the X- and Y-linked genes of the plants, *Silene latifolia* and *S. dioica*. *Mol. Biol. Evol.* 19: 898–907.
- Frankham, R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comp. Rend. Biol.* 326: 22-29.
- Freeman D. C., K. T. Harper, E. L. Charnov. 1980. Sex Change in Plants: Old and New Observations and New Hypotheses. *Oecologia (Berl.)*. 47: 222-232.
- Galli, M. G., M. Bracale, A. Falavigna and C. Soave. 1988. Sexual differentiation in *Asparagus officinalis* L. *Sex. Plant Reprod.* 1: 202–207.
- Giraldo C. I., L. Reginfo, E. Aguilar, D. Gaviria, A. H. Alegria. 2004. Determinación del sexo en borojó (*Borojoa patinol*, Cuatrecasas) mediante marcadores moleculares. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6:9-14.
- Hernandez, Q. J. D. 2013. Estudio cromosómico y de la estructura de la proporción en los sexos en sotol (*Dasyilirion cedrosanum*). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 21-37pp.
- Hodgkin, J. 1990. Sex determination compared in *Drosophila* and *Ceanorhabditis*. *Nature*. 344: 721-728.

Integrated Taxonomic Information System. 2011. [http://www.itis.gov/about\\_itis.html](http://www.itis.gov/about_itis.html).

Janoušek, B., J. Siroky and B. Vyskot. 1996. Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. *Mol. Genet.* 250:483–490.

Jung, C. 1998. AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L. *Mol. Breed.* 4: 91–98.

Korpelainen, H., I. Bisang, L. Hedenäs and J. Kolehmainen. 2008. The first sex-specific molecular marker discovered in the moss *Pseudocalliergon trifarium*. *J. Hered.* 99: 581–7.

Lloyd, D. G. 1975. Breeding systems in *Cotula* L. III Dioecious populations. *New Phytol.* 74: 109-123.

López *et al.* 1995. Técnica de extracción de DNA. *Molec. Genomic. Genetic.* Modificado por Hernández, G. F. 2008. 247: 603-613

Marziani, G., E. Caporali and A. Spada. 1999. Search for genes involved in asparagus sex determination. In “Sex determination in plants” Ainsworth, C.C. (ed.), BIOS Scientific Publisher Ltd. Oxford. 149–162pp.

Moore, P. and R. Ming. 2007. Sex chromosomes in flowering plants. *Amer. J. of Bot.* 94: 141–150.

Mohan Ram, H.Y. and R. Nath. 1964. The morphology and embryology of *Cannabis sativa*. *Linn. Phytomorphology.* 14: 414-429.

Muller, H. J. 1914. A gene for the fourth chromosome of *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* 17: 325-336.

- Negrutiu, I., B. Vyskot, N. Barbacar, S. Georgiev and F. Moneger. 2001. Dioecious plants. A key to the early events of sex chromosome evolution. *Plant physiol.* 127: 11418-1424.
- Olivas, G. J., N. J. Anchondo, S. J. Hernández, A. C. Luján, V. J. Baca y S. J. Chacón. 2010. La industria del sotol en Chihuahua: hacia el uso sustentable de un importante recurso natural. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. México. 268 pp.
- Ott, J. 1999. Analysis of human genetic linkage. 3d ed. The Johns Hopkins University Press. New York.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Viena Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-Project.org>
- Renner, S. S. and R. E. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Am. J. Bot.* 82: 596-606.
- SCFI 2004. NORMA Oficial Mexicana NOM-159-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-Sotol-Especificaciones y métodos de prueba.
- Sondur S. N., R. M. Manshardt and J. I. Stiles. 1996. A genetic linkage map of papaya based on randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet.* 93: 547–553
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, A. Frijters and J. Pot. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research.* 23: 4407–4414.
- Wang, D. W., Y. Li and Z. Q. Li. 2011. Identification of a Male-Specific Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and a Sequence Characterized

Amplified Region (SCAR) Marker in *Eucommia ulmoides* Oliv. Int J Mol Sci. 12: 857–64.