



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE YUCATÁN

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

TL
1353
2004

**"APLICACIÓN DE
MARCADORES MOLECULARES SRAP'S
EN ACHIOTE (*B. orellana*)"**

TESIS

PRESENTADA POR:

RUBY ALEJANDRA VALDEZ OJEDA

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE:

QUÍMICO INDUSTRIAL

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO
2004**

CONTENIDO

RESUMEN	i
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	3
II.1. Generalidades de <i>Bixa orellana</i> (L).	3
II.1.1. Características botánicas.	3
II.1.1.1. Clasificación taxonómica.	3
II.1.1.2. Descripción biológica.	4
II.1.1.3. Propagación del cultivo.	5
II.1.2. Composición química.	6
II.1.3. Usos y aplicaciones de <i>B. orellana</i> .	7
II.1.4. Comercialización.	8
II.2. Diferenciación fenotípica y estudios moleculares en <i>B. orellana</i> .	8
II.2.1. Diferenciación fenotípica.	8
II.2.2. Estudios moleculares.	9
II.3. Análisis del genoma.	10
II.3.1. Marcadores moleculares.	10
II.3.1.1 Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP's).	11
II.3.1.2 Aplicación de marcadores moleculares.	13
II.3.2. Extracción del ADN genómico.	13
II.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	14
II.3.4. Métodos de detección de fragmentos amplificados.	16
III. OBJETIVOS.	18
III.1. Objetivo general.	18
III.2. Objetivos particulares.	18

IV. METODOLOGÍA.	19
IV.1. Esquema general de trabajo.	19
IV.2. Lugar de experimentación.	20
IV.3. Material vegetal.	20
IV.3.1. Selección y procesamiento del material vegetal.	20
IV.4. Extracción del ADN genómico.	20
IV.5. Determinación de la calidad del ADN genómico.	24
IV.6. Selección del método de extracción del ADN genómico.	25
IV.7. Polimorfismo Amplificado de Secuencia Relacionada (SRAP's).	25
IV.7.1. Marcaje radiactivo y condiciones de trabajo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	25
IV.7.2. Selección de la condición de trabajo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	28
IV.8. Separación de los fragmentos amplificados por PCR.	28
IV.8.1. Electroforesis.	28
IV.8.2. Preparación y revelado del filme.	29
IV.9. Determinación de la calidad de los cebadores y del ADN genómico (fluoróros infrarrojos).	29
IV.10. Evaluación preliminar del polimorfismo generado mediante SRAP's (tinción con plata).	30
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	32
V.1. Selección del método de extracción de ADN genómico.	32
V.2. Selección de la condición de trabajo para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	38
V.3. Determinación de la calidad de los cebadores y del ADN genómico (fluoróros infrarrojos).	39
V.4. Evaluación preliminar del polimorfismo generado mediante SRAP's (tinción con plata).	40

VI. CONCLUSIONES.	47
VII. RECOMENDACIONES.	48
VIII. REFERENCIAS.	49
IX. ANEXOS.	56
IX.1. Determinaciones de calidad.	56
IX.2. Preparación de soluciones.	56
IX.3. Método de extracción de ADN genómico seleccionado.	57
X. GLOSARIO.	58

RESUMEN

Bixa orellana es una planta tropical de gran valor agronómico debido a su alto contenido de bixina, pigmento carotenoide, ampliamente utilizado en la industria alimentaria. Durante décadas, su cultivo se ha basado en observaciones fenotípicas de campo debido a que no se ha caracterizado ni estudiado la variabilidad genética de los distintos cultivares de *B. orellana*. En el presente trabajo, se establecieron las bases moleculares mediante el empleo del marcador molecular SRAP's, en cuatro fenotipos de *B. orellana*: peruana verde, peruana roja, criolla y olimpo, para efecto del estudio posterior de la caracterización y variabilidad genética.

El establecimiento de SRAP's en *B. orellana*, incluyó la extracción del ADN genómico mediante diferentes metodologías, seleccionando el método Porebski *et al.*, 1997, para la extracción del ADN genómico libre de polisacáridos, polifenoles, ARN y otros contaminantes, a razón de la integridad, rango de A₂₆₀/A₂₈₀ y disponibilidad a la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los rendimientos obtenidos mediante esta metodología fueron considerablemente altos: 74.75, 50.12, 88.88, 54.50 µg / 500 mg de tejido, para peruana verde, peruana roja, criolla y olimpo, respectivamente. El ADN genómico extraído de los cuatro fenotipos se sometió a la reacción en cadena de la polimerasa para su amplificación, encontrando un mayor número de bandas al incrementar la concentración de MgCl₂ y *Taq* polimerasa en la mezcla de reacción PCR.

Respecto a las bandas polimórficas, éstas fueron detectadas mediante marcaje radiactivo, fluoróforos infrarrojos y tinción con plata. Los métodos empleados mostraron igual sensibilidad a la detección. Sin embargo, importantes diferencias en la simplicidad de la ejecución fueron observadas. El método de tinción con plata combinó en su procedimiento, a diferencia de los otros, facilidad de ejecución; así como bajo costo y mejor peligrosidad del material requerido.

La evaluación del número de bandas polimórficas se llevó a cabo, identificando su ausencia o presencia en la amplificación realizada mediante la combinación de los cebadores empleados en la metodología SRAP's. El mayor número de las bandas polimórficas detectadas resultó de la combinación del cebador 1 “en-sentido” y el cebador 4 “contra-sentido”. Respecto a los fenotipos empleados, criolla y olimpo, promovieron la generación de un mayor número de bandas en comparación con peruana verde y roja.