

AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES *trnH-psbA* Y *matK* DE DIFERENTES ESPECIES DE LOS GENEROS *AGAVE SP.*, *BEAUCARNEA SP.* Y *NOLINA SP.*

Chávaro Ortiz, R.M. ⁽¹⁾; Alvarado A.M. ⁽²⁾; Hernández Sandoval, L.G. ⁽²⁾

⁽¹⁾Facultad de Química

⁽²⁾Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

Se extrajo ADN total de diferentes especies de los géneros *Agave*, *Beaucarnea* y *Nolina*, posteriormente se probó el contenido de ADN total mediante electroforesis en gel de agarosa, a partir de esta información se decidió que muestras eran viables para hacer su amplificación y al termino del trabajo se amplificaron 23 secuencias (17 *trnH* y 6 *matK*). Después de cada amplificación se cargaba el gel de agarosa para asegurarse de que las muestras se habían amplificado con éxito. Los 23 productos de PCR obtenidos se colocaron en una placa específica para ser enviadas a la empresa que secuenciaría. Las secuencias que se obtengan serán analizadas posteriormente para obtener la filogenia de estas especies.

INTRODUCCIÓN

La historia evolutiva de un grupo de organismos se llama filogenia. Las genealogías de los organismos se representan como árboles filogenéticos, es decir, diagramas que rastrean las relaciones evolutivas de la manera más detallada en que estas puedan ser determinadas (Campbell y col, 2001).

Actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevos marcadores, de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo de los individuos, situación que ha permitido grandes avances en este tipo de estudios. Recientemente, se ha desarrollado una serie de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando un partidor, ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa. Esta reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde. Estos productos son polimórficos cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (Becerra y Paredes, 2000).

Se ha encontrado que los géneros *Agave*, *Beaucarnea* y *Nolina* son géneros cercanos pertenecientes al orden Asparagales, en estudios anteriores de análisis moleculares por el método de neighbor-joining (Eguiarte, 1995). Se ha hecho una evaluación amplia en laboratorios internacionales dentro de los marcadores a utilizar para análisis moleculares en filogenética, cuatro marcadores del cloroplasto han sido identificados como prometedores (Gernandt y col, 2009), incluyendo tres regiones codificantes altamente variables (*matK*, *rpoB* y *rpoCl*) y un espaciador intergénico (*trnH-psbA*).

METODOLOGÍA

1. Para la extracción del ADN total se utilizó nitrógeno líquido en la parte de lisis celular, los reactivos utilizados para preparar el buffer de extracción fueron: Tris-HCl, que mantiene la solución estable; NaCl, forma una capa iónica suave que recubre el ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación; EDTA, quita cationes de la solución y desestabiliza la membrana celular, a la vez inhibe las ADNasas y CTAB.

- Una vez hecha la extracción se corrió un gel de agarosa para ver el contenido de ADN y las muestras que si tuvieron ADN se les agregó 2 μ L de RNAsa y se calentaron a 37 °C por 20 min.
- Después de someter las muestras al tratamiento mencionado anteriormente, se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante esta reacción se trabajó con la Taq Platinum de Invitrogen, y los reactivos utilizados fueron los mismos para las dos regiones (trnH y matK) exceptuando los primers (Tabla 1).
- En el caso de matK se probaron tres juegos de primers para esta región: AF K-BR, K-BF K-CR, K-CF 8R, que ya habían sido probados en estudios anteriores (Ito y col, 1999).

TABLA 1. Volumen de reactivos para obtención de 40 μ L de producto de PCR.

trnH	(1 X)	matK	(1 X)
Buffer PCR 10X	4	Buffer PCR 10X	4
MgCl ₂	1.6	MgCl ₂	1.6
dNTP's	0.8	dNTP's	0.8
trnH-forward	0.8	matK-forward	0.8
trnH-reverse	0.8	matK-reverse	0.8
Taq Platinum	0.2	Taq Platinum	0.2
H ₂ O	25.8	H ₂ O	25.8
Templado	6	Templado	6
Vol. Total	40	Vol. Total	40

Nota: En el caso de la región matK, los juegos de *primers* que se utilizaron fueron: AF K-BR, K-BF K-CR, K-CF 8R, en el volumen mencionado.

- Para cada una de las dos regiones que se amplificaron se utilizó un programa diferente en el termociclador. En el caso de trnH el programa fue: 95° C por 3 min, 35 ciclos (95° C por 1 min / 50° C por 1 min / 72° C por 1 min), 72° C por 5 min. Para matK el programa utilizado fue: 96° C por 3 min, 35 ciclos (94° C por 45 seg / 56° C por 1 min / 72° C por 1 min), 72° C por 5 min.

RESULTADOS

Las muestras de extracción de ADN fueron probadas en el gel de electroforesis las que tenían contenido de ADN fueron las que se amplificaron.

Se obtuvieron 23 secuencias amplificadas, de las cuales 17 fueron de la región trnH y seis de la región matK (Tabla 2).

TABLA 2. Especies de las cuales se obtuvo producto de PCR y región obtenida.

Productos de PCR		
	matK	
trnH	K-BF	K-CF
psbA	K-CR	8R

<i>A. haynaldii</i>		
<i>A. heteracantha</i>		
<i>A. paucifolia</i>		
<i>A. salmiana</i>		
<i>B. compacta</i>		<i>B. compacta</i>
<i>B. goldmanii</i>		<i>B. goldmanii</i>
<i>B. gracilis</i>		<i>B. gracilis</i>
<i>B. purpusi</i>		<i>B. purpusi</i>
<i>B. recurvata</i>	<i>B. recurvata</i>	<i>B. recurvata</i>
<i>N. beldingi</i>		
<i>N. durangensis</i>		
<i>N. elegans</i>		
<i>N. humilis</i>		
<i>N. juncea</i>		
<i>N. micrantha</i>		
<i>N. microcarpa</i>		
<i>N. parviflora</i>		

Nota: El género *Beaucarnea* fue el único que se amplificó para las tres regiones de matK ya mencionadas, la región AF K-BR no fue posible obtenerla para ninguna especie de *Beaucarnea*, la región K-BF K-CR solo amplificó para *B. recurvata*, y en el caso de la región K-CF 8R amplificaron todas las especies *Beaucarnea* que se probaron.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las muestras obtenidas fueron colocadas en una placa específica para ser enviadas a Macrogen en Korea, se espera que las muestras sean secuenciadas para su posterior análisis con el fin de obtener un árbol filogenético de estas especies.

En el caso de la región matK como podemos ver en la figura, esta se divide en tres secuencias, AF K-BR, K-BF K-CR, K-CF 8R, solo se obtuvo *B. recurvata* para la secuencia K-BF K-CR, se cree que esto fue debido a la temperatura de anillamiento pero no se probó mas debido a problemas con el termociclador y a falta de tiempo.

B. compacta, *B. goldmanii*, *B. gracilis*, *B. purpusi* y *B. recurvata* se obtuvieron para la región K-CF 8R, en este caso se obtuvieron todas las muestras que se probaron.

Para matK solo se probó el género *Beaucarnea* ya que era el de interés para esta región.

Los géneros *Agave* y *Nolina* no se probaron para la región matK

CONCLUSIONES

Se logró obtener un buen número de muestras de interés, aunque en el caso de *Beaucarnea* falta trabajo por realizar, ya que no fue posible amplificar las tres secuencias de la región matK que se querían.

Todos los productos de PCR que se seleccionaron para ser secuenciados cumplieron con la cantidad necesario de ADN, esto se pudo observar en las bandas de electroforesis, las muestras que si amplificaron pero tuvieron una baja concentración fueron descartadas.

Una vez que se obtengan las secuencias por parte de la empresa Macrogen, será necesario analizar éstas para obtener la filogenia de estos géneros, y poder determinar su parentesco,

aunque ya es conocido que los tres generos con los que se trabajó (*Agave*, *Beaucarnea* y *Nolina*) pertenecen al mismo orden. Sin embargo, con este trabajo se espera obtener la filogenia de estos géneros pero al nivel de algunas especies que los conforman.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Becerra V. y Paredes M., “Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética”, Agricultura técnica, 60, 270-281, **2000**.

Campbell N.A., “Biología. Conceptos y Relaciones”, Pearson Educación, México, **2001**.

Eguiarte L. E., “Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledóneas”, Bol. Soc. Bot., 56, 45-56, **1995**.

Gernandt D., “Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México”, Proyecto, **2009**.

Ito M., “Phylogenetic relationships of amarylidaceae based on matK sequence data”, J. Plant. Res., 112, 207-216, **1999**.