

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA
BIOTECNOLÓGICA



**“ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE
ADN Y UN SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN PCR-SSR PARA
Oenothera rosea (CHUPA SANGRE), *Oenothera multicaulis* (CHUPA
SANGRE DE PUNA) y *Oenothera tetraptera* (CHUPA SANGRE
GIGANTE)”**

Tesis Presentada por el Bachiller:

Miguel Angel Taboada Rosell

Para optar por el título profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Cinthia Córdoba Barrios

Arequipa - Perú

2013

PRESENTACIÓN

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas.

Señor Director del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica.

Señores Miembros del Jurado Dictaminador de la Tesis

De conformidad con las disposiciones del Reglamento de Grados y Títulos del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica, pongo a vuestra consideración el presente trabajo de investigación titulado:

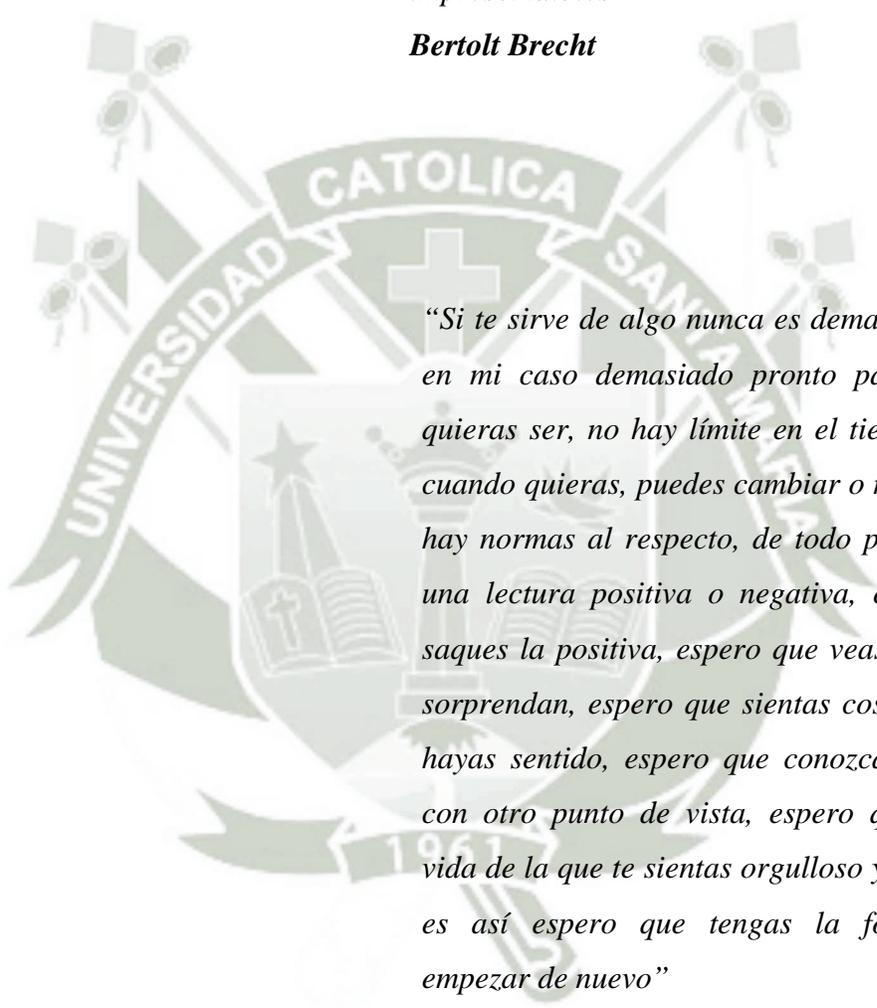
ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN Y UN SISTEMA DE AMPLIFICACIÓN PCR-SSR PARA *Oenothera rosea* (CHUPA SANGRE), *Oenothera multicaulis* (CHUPA SANGRE DE PUNA) y *Oenothera tetraptera* (CHUPA SANGRE GIGANTE).

El trabajo de investigación fue realizado aplicando los conocimientos adquiridos durante mi formación universitaria, el mismo que al ser aprobado me permitirá optar por el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo.

Arequipa, 30 de Marzo del 2013

*“Hay hombres que luchan un día y son buenos.
Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay
quienes luchan muchos años y son muy buenos.
Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los
imprescindibles”*

Bertolt Brecht



*“Si te sirve de algo nunca es demasiado tarde, o
en mi caso demasiado pronto para ser quien
quieras ser, no hay límite en el tiempo, empieza
cuando quieras, puedes cambiar o no hacerlo, no
hay normas al respecto, de todo podemos sacar
una lectura positiva o negativa, espero que tú
saques la positiva, espero que veas cosas que te
sorprendan, espero que sientas cosas que nunca
hayas sentido, espero que conozcas a personas
con otro punto de vista, espero que vivas una
vida de la que te sientas orgulloso y si vez que no
es así espero que tengas la fortaleza para
empezar de nuevo”*

***“El curioso caso de Benjamin Button” - Eric
Roth***

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser el gran amigo con el que siempre se puede confiar, por la fortaleza espiritual que me da día a día, por guiarme por el camino del bien y siempre ayudarme a cumplir mis sueños.

A mi Patrón San Antonio Abad como le digo de cariño “mi viejo querido”, por haberme llevado por el camino de la fe, por demostrarme con sus enseñanzas que siempre hay que ser humilde, solidario y trabajador, por darme la oportunidad de seguirlo por más de 10 años y por interceder con Dios en todas mis peticiones y cuidarme siempre.

A mi abuelito Lorenzo, que sé que me está mirando y cuidando desde el cielo, por todos los momentos vividos, por engreírme todos los años que pudo estar a mi lado y por haberme enseñado hasta sus últimos días que con esfuerzo todo lo puedes lograr en la vida.

A mis padres Froilán y Dina, por darme la vida, por todos los esfuerzos que hicieron para verme profesional y por hacer de mí una buena persona con principios y valores.

A mis Tías René y Miguelina, que son como mis abuelitas por siempre haber estado en todos mis triunfos, por todo el apoyo brindado en estos años universitarios y por su amor infinito.

A mi hermana Katerin, por ser una gran hermana y haber sido el gran apoyo que siempre estuvo en todos los momentos.

A Joshelyn, mi mejor amiga y la mejor socia, por siempre haber estado a mi lado desde los inicios de mis estudios universitarios, por haber celebrado siempre mis triunfos y haberme dado las fuerzas cuando tenía que pararme de las caídas, por sus consejos, por creer siempre en mí y por todo los momentos vividos en estos 7 años.

Al Sr. Walter Zavala y Marina Mengoa, por todo el apoyo prestado, su estimado y el gran cariño que me tienen.

A todo el equipo de la SUDIRGEB, por su amistad, los buenos momentos pasados y el apoyo brindado para la ejecución del presente trabajo.

Al Dr. Jorge Benavides, asesor externo de este trabajo, por a ver confiado en mí permitiéndome formar parte de este equipo de trabajo y por sus valiosas contribuciones.

A la Ing. Cinthia Cordova, asesor interno de este trabajo, por la confianza, el aprecio y la motivación a lo largo de todos estos años, por sus valiosos consejos, su permanente buena disposición y sus enseñanzas.

A los miembros del jurado: al Dr. Fredy Zegarra, al Blgo. Iván Paz, a la Q.F. Fernando Torres por sus valiosos aportes, por compartir sus conocimientos, por su comprensión, por la buena voluntad y disposición, muchas gracias.

A los Biólogos Carlos Alvarado, Fernando Serna y Adriana Vallejo, por sus valiosos consejos, aportes y enseñanzas.

A Ricardo Lengua, por todo el apoyo brindado en el presente trabajo, por su gran amistad y todo lo enseñado.

A todos mis amigos de la universidad y en especial a David, Gabriel, Gabriela, Keny, María Alejandra, Pamela, Andrea Lucia, por compartir conmigo cada etapa universitaria, por su amistad y su apoyo.

A mi hermanos Mario Alberto, Héctor, Oswaldo y Fredy, por tener su amistad por más de 15 años, por haber crecido juntos compartiendo cada etapa de mi vida, por todos los momentos pasados, por estar ahí siempre en los momentos difíciles y por saber que siempre estaremos para apoyarnos.

Gracias por todo, que Dios los bendiga y la Santísima Virgen María los cuide siempre!

INDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| RESUMEN | xv |
| ABSTRACT | xvii |
| ABREVIATURAS | xix |
| CAPÍTULO I: GENERALIDADES | 0 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.2 HIPÓTESIS | 2 |
| 1.3 OBJETIVOS | 3 |
| 1.3.1 Objetivo General | 3 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos | 3 |
| 1.4 JUSTIFICACIÓN | 3 |
| 1.5 VARIABLES | 4 |
| 1.5.1 Variables Independientes | 4 |
| 1.5.2 Variables Dependientes | 5 |
| 1.6 ANTECEDENTES | 5 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO | 7 |
| 2.1. OENOTHERA | 8 |
| 2.1.1 Generalidades | 8 |
| 2.1.2 Clasificación | 8 |
| 2.1.3 Distribución | 9 |
| 2.1.4 Hábitat | 13 |

| | | |
|---|---|----|
| 2.1.5 | Composición Fitoquímica..... | 13 |
| 2.1.6 | Taxonomía..... | 16 |
| 2.1.7 | Especies de <i>Oenothera</i> más conocidas..... | 17 |
| 2.1.8 | Especies de <i>Oenothera</i> nativas del Perú..... | 20 |
| 2.1.9 | Características del Cultivo..... | 22 |
| 2.1.10 | Usos | 25 |
| 2.2. | ANÁLISIS MOLECULAR..... | 30 |
| 2.2.1. | Recolección de material genético. | 30 |
| 2.2.2. | Extracción de ADN..... | 31 |
| 2.2.3. | Determinación y cuantificación de la calidad del ADN..... | 46 |
| 2.2.4. | Protocolos de extracción comerciales | 49 |
| 2.2.5. | Electroforesis..... | 50 |
| 2.2.6. | Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)..... | 51 |
| 2.2.7. | Marcadores Moleculares..... | 55 |
| 2.2.7.1. | Marcadores Moleculares microsatélites (SSR) | 56 |
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOS..... | | 62 |
| 3.1. | CAMPO DE VERIFICACIÓN..... | 63 |
| 3.1.1. | Lugar de ejecución | 63 |
| 3.1.2. | Ubicación espacial | 63 |
| 3.1.3. | Unidades de estudio | 63 |
| 3.2. | MATERIALES..... | 63 |
| 3.2.1 | Material biológico..... | 63 |
| 3.2.2 | Material de laboratorio | 64 |
| 3.2.3 | Software..... | 67 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL | 67 |
| 3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL | 69 |
| 3.4.1 Recolección de las muestras..... | 69 |
| 3.4.2 Extracción de ADN..... | 72 |
| 3.4.3 Evaluación de la concentración, pureza y calidad del ADN genómico aislado. 78 | |
| 3.4.4 Estandarización de primers microsatélites (SSR). | 82 |
| 3.5. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA | 87 |
| 3.6. METODOLOGÍA PARA ANÁLISIS COSTO..... | 88 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES | 89 |
| 4.1 RESULTADOS Y DISCUSIONES | 90 |
| 4.1.1. Recolección de muestras | 90 |
| 4.1.2. Extracción de ADN..... | 98 |
| 4.1.3. Evaluación de la calidad del ADN genómico. | 116 |
| 4.1.4. Estandarización de primers microsatélites (SSR). | 122 |
| 4.1.5. Análisis de costos. | 127 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 130 |
| 5.1 CONCLUSIONES | 131 |
| 5.2 RECOMENDACIONES | 132 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 133 |
| ANEXOS | 154 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Distribución de cultivos de <i>Oenothera</i> en el mundo..... | 10 |
| Figura 2. Distribución de cultivos de <i>Oenothera</i> en América Latina..... | 11 |
| Figura 3. Distribución de cultivos de <i>Oenothera</i> en el Perú. | 12 |
| Figura 4. Distribución de especies de <i>Oenothera</i> del Perú por departamentos. | 13 |
| Figura 5. Estructura química de compuestos encontrados en semillas de <i>Oenothera</i> | 14 |
| Figura 6. Estructura química de compuestos encontrados en hojas de <i>Oenothera</i> | 15 |
| Figura 7. Estructura química de compuestos encontrados en raíces de <i>Oenothera</i> | 16 |
| Figura 8. Diagrama de Flujo correspondiente al diseño experimental para extracción de ADN de tres especies de <i>Oenothera</i> | 68 |
| Figura 9. Efecto de la conservación para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> | 93 |
| Figura 10. Efecto de la conservación para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera multicaulis</i> | 96 |
| Figura 11. Efecto de la conservación para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera tetraptera</i> | 98 |
| Figura 12. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de <i>Oenothera rosea</i> para cada tratamiento de extracción. | 101 |
| Figura 13. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de <i>Oenothera multicaulis</i> para cada tratamiento de extracción. ... | 109 |
| Figura 14. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de <i>Oenothera tetraptera</i> para cada tratamiento de extracción. | 114 |
| Figura 15. Amplificación con gradiente de temperatura para el primer SSR Oenbi2tri2. | 117 |
| Figura 16. Amplificación de muestras de <i>Oenothera rosea</i> con el primer SSR Oenbi2tri2, para la determinación de la calidad de ADN de los diferentes tratamientos seleccionados..... | 118 |

| | |
|---|-----|
| Figura 17. Amplificación de muestras de <i>Oenothera multicaulis</i> con el primer SSR Oenbi2tri2, para la determinación de la calidad de ADN de los diferentes tratamientos seleccionados..... | 120 |
| Figura 18. Amplificación de muestras de <i>Oenothera tetraptera</i> con el primer SSR Oenbi2tri2, para la determinación de la calidad de ADN de los diferentes tratamientos seleccionados..... | 121 |
| Figura 19. Gradientes de temperatura para los primer microsatélites (SSR) del género <i>Oenothera</i> | 125 |
| Figura 20. Gradientes de temperatura para los primer microsatélites (SSR) del género <i>Oenothera</i> | 126 |
| Figura 21. Especies de <i>Oenothera</i> seleccionadas y recolectadas..... | 155 |
| Figura 22. Ejemplar de <i>Oenothera rosea</i> del Herbarium Arequipensis – Husa..... | 156 |
| Figura 23. Ejemplar de <i>Oenothera multicaulis</i> del Herbarium Arequipensis – Husa.. | 157 |
| Figura 24. Ejemplar de <i>Oenothera tetraptera</i> del Herbarium Arequipensis – Husa.... | 158 |
| Figura 25. Método de conservación con silica gel..... | 159 |
| Figura 26. Método de conservación en fresco,..... | 160 |
| Figura 27. Método de extracción con ADNeasy Plant mini Kit (Qiagen)..... | 161 |
| Figura 28. Metodología de extracción para la técnica de extracción 1..... | 164 |
| Figura 29. Metodología de extracción para la técnica de extracción 2..... | 166 |
| Figura 30. Metodología de extracción para la técnica de extracción 3..... | 169 |
| Figura 31. Metodología de uso del Nanodrop 2000 para el análisis de calidad de concentración de ADN..... | 170 |
| Figura 32. Metodología con geles de agarosa al 1% para el análisis de calidad de concentración de ADN..... | 172 |
| Figura 33. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> con respecto a la conservación..... | 178 |
| Figura 34. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> con respecto a la conservación..... | 180 |

Figura 35. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* con respecto a la conservación. 182

Figura 36. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* respecto a la técnica de extracción..... 184

Figura 37. Geles de agarosa *Oenothera multicaulis* respecto a la técnica de extracción. 185

Figura 38. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* respecto a la técnica de extracción..... 187

Figura 39. Geles de agarosa de *Oenothera multicaulis* respecto a la técnica de extracción. 188

Figura 40. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* respecto a la técnica de extracción. 190

Figura 41. Geles de agarosa de *Oenothera tetraptera* respecto a la técnica de extracción. 191

INDICE DE TABLAS

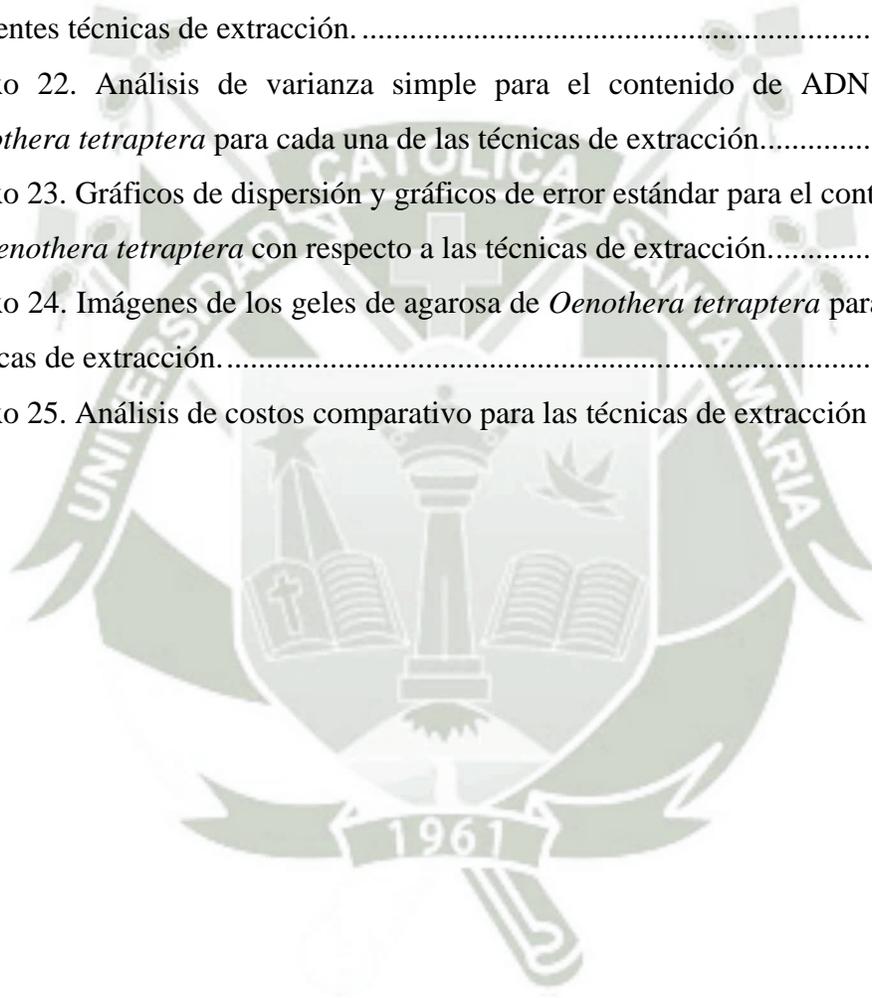
| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Clasificación Taxonómica de <i>Oenothera</i> | 9 |
| Tabla 2. Denominaciones comunes y poco comunes de <i>Oenothera Biennis</i> | 18 |
| Tabla 3. Denominaciones comunes y poco comunes de <i>Oenothera rosea</i> | 20 |
| Tabla 4. Denominaciones comunes y poco comunes de <i>Oenothera multicaulis</i> | 21 |
| Tabla 5. Denominaciones comunes y poco comunes de <i>Oenothera tetraptera</i> | 22 |
| Tabla 6. Detergentes y denaturadores comunes usados en la extracción de ADN..... | 37 |
| Tabla 7. Enzimas comunes usadas en la lisis de células y membranas. | 38 |
| Tabla 8. Reactivo que son utilizados en el buffer de extracción para remover inhibidores. | 42 |
| Tabla 9. Concentración de sales recomendadas para usar en la precipitación con alcohol. | 45 |
| Tabla 10. Marcadores moleculares microsatélites (SSR) para el género <i>Oenothera</i> | 85 |
| Tabla 11. Contenido de ADN genómico (ng/ul) de <i>Oenothera rosea</i> con respecto a la conservación. | 92 |
| Tabla 12. Contenido de ADN genómico (ng/ul) de <i>Oenothera multicaulis</i> con respecto a la conservación. | 95 |
| Tabla 13. Contenido de ADN genómico (ng/ul) de <i>Oenothera tetraptera</i> con respecto a la conservación. | 97 |
| Tabla 14. Contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de <i>Oenothera rosea</i> para cada tratamiento de extracción..... | 100 |
| Tabla 15. Contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de <i>Oenothera multicaulis</i> para cada tratamiento de extracción..... | 108 |
| Tabla 16. Contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de <i>Oenothera tetraptera</i> para cada tratamiento de extracción. | 113 |
| Tabla 17. Estandarización de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para el género <i>Oenothera</i> | 124 |
| Tabla 18. Análisis de costos comparativo para las técnicas de extracción evaluadas. . | 128 |
| Tabla 19. Lista de reactivos necesarios para la técnica de extracción 1 con CTAB. ... | 162 |

| | |
|--|-----|
| Tabla 20. Lista de reactivos para la preparación de las soluciones de EDTA y Tris-base. | 163 |
| Tabla 21. Lista de reactivos necesarios para la técnica de extracción 2 con CTAB. | 165 |
| Tabla 22. Lista de reactivos necesarios para la técnica de extracción 3 con CTAB. .. | 167 |
| Tabla 23. Reactivos y concentraciones usadas para el buffer TBE 10X..... | 171 |
| Tabla 24. Reactivos y concentraciones usadas para la reacción de PCR. | 173 |
| Tabla 25. Base de datos para cada una de las técnicas de extracción con respecto a <i>Oenothera rosea</i> | 174 |
| Tabla 26. Base de datos para cada una de las técnicas de extracción con respecto a <i>Oenothera multicaulis</i> | 175 |
| Tabla 27. Base de datos para cada una de las técnicas de extracción con respecto a <i>Oenothera tetraptera</i> | 176 |
| Tabla 28. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> para cada una de las técnicas de conservación. | 177 |
| Tabla 29. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera</i> <i>multicaulis</i> para cada una de las técnicas de conservación. | 179 |
| Tabla 30. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera</i> <i>tetraptera</i> para cada una de las técnicas de conservación. | 181 |
| Tabla 31. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> para cada una de las técnicas de extracción..... | 183 |
| Tabla 32. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera</i> <i>multicaulis</i> para cada una de las técnicas de extracción..... | 186 |
| Tabla 33. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera</i> <i>tetraptera</i> para cada una de las técnicas de extracción..... | 189 |
| Tabla 34. Análisis presupuestal de costos por reactivos para cada técnica de extracción 1. | 192 |
| Tabla 35. Análisis presupuestal de costos por reactivos para cada técnica de extracción 2. | 193 |
| Tabla 36. Análisis presupuestal de costos por reactivos para cada técnica de extracción 3. | 194 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo 1. Especies recolectadas de <i>Oenothera</i> | 155 |
| Anexo 2. Métodos de conservación de material vegetal. | 159 |
| Anexo 3. Protocolo de extracción comercial DNeasy Plant mini Kit. | 161 |
| Anexo 4. Protocolo de extracción experimental con CTAB 1. | 162 |
| Anexo 5. Protocolo de extracción experimental con CTAB 2. | 165 |
| Anexo 6. Protocolo de extracción experimental con CTAB 3. | 167 |
| Anexo 7. Análisis de calidad y concentración de ADN. | 170 |
| Anexo 8. Amplificación de marcadores microsatélites (SSR) específicos para <i>Oenothera</i> | 173 |
| Anexo 9. Bases de datos para cada una de las técnicas de extracción evaluadas con respecto a las tres especies de <i>Oenothera</i> | 174 |
| Anexo 10. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> para cada una de las técnicas de conservación..... | 177 |
| Anexo 11. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de <i>Oenothera rosea</i> con respecto a las técnicas de conservación. | 178 |
| Anexo 12. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera multicaulis</i> para cada una de las técnicas de conservación. | 179 |
| Anexo 13. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de <i>Oenothera multicaulis</i> con respecto a las técnicas de conservación. | 180 |
| Anexo 14. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera tetraptera</i> para cada una de las técnicas de conservación. | 181 |
| Anexo 15. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de <i>Oenothera tetraptera</i> con respecto a las técnicas de conservación. | 182 |
| Anexo 16. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera rosea</i> para cada una de las técnicas de extracción..... | 183 |
| Anexo 17. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de <i>Oenothera rosea</i> con respecto a las técnicas de extracción..... | 184 |

| | |
|---|-----|
| Anexo 18. Imágenes de los geles de agarosa de <i>Oenothera rosea</i> para las diferentes técnicas de extracción..... | 185 |
| Anexo 19. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera multicaulis</i> para cada una de las técnicas de extracción..... | 186 |
| Anexo 20. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de <i>Oenothera multicaulis</i> con respecto a las técnicas de extracción..... | 187 |
| Anexo 21. Imágenes de los geles de agarosa de <i>Oenothera multicaulis</i> para las diferentes técnicas de extracción..... | 188 |
| Anexo 22. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de <i>Oenothera tetraptera</i> para cada una de las técnicas de extracción..... | 189 |
| Anexo 23. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de <i>Oenothera tetraptera</i> con respecto a las técnicas de extracción..... | 190 |
| Anexo 24. Imágenes de los geles de agarosa de <i>Oenothera tetraptera</i> para las diferentes técnicas de extracción..... | 191 |
| Anexo 25. Análisis de costos comparativo para las técnicas de extracción evaluadas. | 192 |



RESUMEN

Algunas especies del género *Oenothera*, comúnmente conocidas en Perú como “Yawar Chon’qa” o “Chupa Sangre”, destacan por sus propiedades medicinales anti-inflamatorias, conferidas por el alto contenido de principios activos que poseen. Estudios a nivel molecular son necesarios para determinar la influencia que dichos principios activos tienen en la salud; sin embargo, la extracción y amplificación del ADN de esta especie aún presentan varias limitaciones debido a su alto contenido de polifenoles y polisacáridos, y a los elevados costos que representan la compra de kits comerciales, siendo este paso imprescindible para realizar estudios moleculares. Esta investigación tuvo por objetivo la estandarización de una técnica de extracción de ADN y un sistema de amplificación PCR-SSR para *Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis* y *Oenothera tetráptera*. Se evaluó el efecto de diferentes técnicas de conservación del material vegetal y de extracción de ADN. La técnica de conservación en fresco, que almacena el material vegetal entre -70°C y -80°C sin ningún reactivo de conservación, preservó mejor la integridad de las tres especies estudiadas. Mediante la amplificación de primers microsatélites (SSR) se demostró que los mejores resultados respecto a concentración, pureza y calidad del ADN extraído se obtuvieron con la técnica de extracción N° 3, la cual utiliza dos concentraciones de CTAB (2X y 10X) y evita el uso

de nitrógeno líquido en la trituración. La técnica estandarizada en este trabajo representa una alternativa rápida, eficiente y económica, permitiendo una óptima extracción y disminuyendo los costos hasta en 46.11% en comparación con el kit comercial usado como control. Asimismo, se llevó a cabo la estandarización de nueve pares de primers microsatélites (SSR) para las tres especies de *Oenothera* estudiadas. Así de este modo el trabajo sienta las bases para futuras investigaciones en genética poblacional y estudios a nivel molecular para especies del género *Oenothera* y a su vez, para otras especies que presenten altos contenidos de metabolitos secundarios.



ABSTRACT

Some species of the genus *Oenothera*, commonly known as “Yawar Chon'qa” or “Chupa Sangre” in Peru, are well recognized because of its inflammatory medicinal properties, conferred by the high content of active compounds they possess. Molecular studies are needed to determine the influence that these active compounds have on the health; however, the extraction and amplification of the ADN of this species still have several limitations due to its high content of polyphenols and polysaccharides, and also due to the high costs of the commercial kits, since this step essential for molecular studies. This research aimed at the standardization of ADN extraction technique and PCR-SSR amplification system for *Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis* and *Oenothera tetraptera*. The effect of different conservation techniques and ADN extraction was evaluated. Fresh preservation technique, which stores the plant material between -70 and -80 °C without any reagent conservation, better preserved the integrity of all the studied species. According to the microsatellite primers amplification, it was demonstrated that the best results related to the extracted ADN concentration, purity and quality were obtained with extraction technique N° 3, which uses two different concentrations of CTAB (2X and 10X) and avoids the use of liquid nitrogen for the grinding. The standardized technique in this research represents a fast, efficient and economical alternative to obtain an optimum extraction and reduce the costs by up to

46.11% compared with the commercial kit used as control. Furthermore, the standardization of nine microsatellite primer pairs (SSR) was conducted for the three studied *Oenothera* species. This work provides the basis for future research on population genetics and molecular studies of the species of the genus *Oenothera* and also for other species with high levels of secondary metabolites.



ABREVIATURAS

| | |
|---------|---------------------------------|
| °C: | Grados centígrados |
| µl: | Microlitro |
| µmol: | Micromol |
| Abs: | Absorbancia |
| ANOVA: | Análisis de Varianza |
| aprox.: | Aproximadamente |
| EE: | Error estándar de la media |
| gr: | Gramo |
| mg. | Miligramo |
| kg: | Kilogramo |
| L: | Litro |
| M: | Molar |
| MilliQ: | Agua ultra-pura |
| min.: | Minuto |
| ml: | Mililitro |
| mM: | Milimolar |
| msnm: | Metros sobre el nivel del mar |
| pH: | Potencial de Hidrogeniones |
| RPM: | Revoluciones por minuto |
| ha: | Hectárea. |
| cm.: | Centímetros |
| PGE1: | Prostaglandina E1 |
| AINEs: | Antiinflamatorios no esteroides |
| GLA: | Ácido gamma linolénico. |
| Ta: | Temperatura de anilamiento. |
| ADN: | Ácido Desoxirribonucleico. |

| | |
|-------|--|
| CTAB: | Bromuro de hexadeciltrimetilamonio. |
| NaCl: | Cloruro de Sodio |
| SSR: | Marcadores moleculares microsatélites. |
| PCR: | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| ARN: | Ácido ribonucleico. |
| UV: | Ultravioleta. |
| GPS: | Sistema de posicionamiento global. |
| PVP: | Polivinilpirrolidona. |
| NaOH: | Hidróxido de Sodio. |
| HCl: | Ácido clorhídrico. |
| EDTA: | Ácido etilendiaminotetraacético |





CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales desde tiempos remotos son empleadas para aliviar los males que aquejan a la humanidad, por lo cual consideradas un recurso, cuyas parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de algunas afecciones. Por esto las plantas medicinales no constituyen una casualidad, sino que fueron una creación para el bien del hombre y que estos medios tan sencillos y naturales son usados con fe por nuestros antepasados desde hace miles de años.

Hoy en día la medicina tradicional ha tomado una gran importancia como una forma alternativa para poder tratar las diferentes enfermedades que aquejan a nuestra sociedad, es por eso, que ahora la ciencia estudia diferentes plantas medicinales para poder obtener información importante para el descubrimiento de nuevos tratamientos y medicamentos. En América y en especial en el Perú que es un país megadiverso, poseen un banco de plantas medicinales que no han sido investigadas aun y en cuyos principios activos podría encontrarse tratamientos para enfermedades actuales o venideras.

Es por todo esto, que la medicina moderna, está realizando investigación en diferentes especies medicinales nativas, para la identificación de los principales principios activos de cada una de estas especies y la evaluación de su actividad medicinal. Dentro de esto los estudios moleculares, realizan trabajos para la identificación de los genes involucrados en las rutas metabólicas que sintetizan dichos principios activos, siendo estos estudios muchas veces dificultosos y costosos, ya que se requieren de métodos muy complicados para poder realizar la extracción del material genético a ser evaluado, lo que en nuestro país muchas veces imposibilita a los investigadores para poder realizar trabajos a este nivel.

Una de estas plantas medicinales oriundas del Perú es el género *Oenothera*, que en nuestro país es comúnmente conocida como “Chupa Sangre” ó “Yawar Chon’qa”, pertenece a la familia de las Onagraceae, teniendo aproximadamente 125 especies

de hierbas anuales, bienales y perennes a nivel mundial. En el Perú existen varias de estas especies en diferentes regiones y altitudes, las cuales son usadas por sus propiedades medicinales para contrarrestar diferentes enfermedades, siendo importante por su gran aporte como fármaco natural.

Ya que los estudios moleculares son esenciales para analizar el perfil químico de las plantas medicinales (Jude, et al., 2009 y Tan et al., 2009), la extracción de ADN es el primer y principal paso para realizar estudios en la biotecnología molecular.

Por lo tanto, algunas plantas medicinales que habitan en zonas con alta elevación geográfica como es el caso del género Yawar Chon'qa (*Oenothera*), poseen altos contenidos de metabolitos secundarios, que dificultan la extracción del ADN para la realización de estudios moleculares, es por eso que se usan métodos de extracción muy tediosos y costosos, debido a que no existe un método de extracción alternativo que sea rápido, a bajo costo y con un alto rendimiento de extracción.

1.2 HIPÓTESIS

Dado que la extracción de ADN en plantas medicinales es complicada y costosa por la presencia de metabolitos secundarios tales como polifenoles, polisacáridos, etc.; que sintetizan e impiden la realización de análisis moleculares en dichas plantas, es probable, que mediante la modificación de protocolos de extracción de ADN tradicionales se pueda obtener un protocolo rápido, de bajo costo y alto rendimiento, para la extracción de especies de *Oenothera*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Realizar la estandarización de una técnica de extracción de ADN y un sistema de amplificación PCR-SSR para *Oenothera rosea* (Chupa sangre), *Oenothera multicaulis* (Chupa sangre de puna) y *Oenothera tetraptera* (Chupa sangre gigante).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la conservación del material vegetal para la extracción de ADN de las tres especies de *Oenothera* a estudiar.
- Estandarizar una metodología para la extracción de ADN de las muestras recolectadas.
- Evaluar por medio de una amplificación por PCR la calidad de ADN obtenido por las técnicas de extracción.
- Estandarizar un sistema de amplificación para marcadores moleculares microsatélites (SSR) específicos de *Oenothera*.
- Realizar un análisis de costos para determinar el método de extracción más económico y de alta eficiencia.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Desde hace miles de años, las sociedades han empleado las plantas medicinales con múltiples fines, que van desde tratamiento de belleza, terapéuticos y medicinales (Mann, 1995), por lo que en la actualidad la investigación en el campo de la Fitoterapia y la Medicina Tradicional son temáticas importantes en el Perú, país de inmensa riqueza en plantas medicinales, tanto domesticadas como silvestres con

potencial farmacológico. Hay muchas otras especies de plantas domésticas que aún no han sido estudiadas y que pueden tener un potencial fitoterapéutico a futuro, (Mendiola, 2009).

Las plantas medicinales elaboran en su metabolismo una serie de sustancias que van a tener diferentes intereses en función de su utilidad, a estas se les denomina principios activos los cuales son en general metabolitos secundarios, encontrando dentro de estas al género *Oenothera*.

Dentro de la familia de las Onagraceae, la *Oenothera* es considerada un género de vital importancia ya que se tiene evidencia de sus grandes virtudes medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades degenerativas (esclerosis múltiple, artritis reumatoide, esquizofrenia, diabetes, Osteoporosis, Asma, etc.), menopausia y otros, (Natural Standard Monografía, 2010), siendo comprobados científicamente algunos de los tratamientos mencionados.

Por todo lo indicado, se considera que estandarizar el protocolo de extracción de ADN para el género *Oenothera*, es un paso fundamental para poder realizar estudios moleculares en esta especie que posee propiedades medicinales beneficiosas, realizando con esta investigación un trabajo de ciencia básica con la finalidad de impulsar con esta investigación futuros trabajos en ciencia aplicada con esta especie.

1.5 VARIABLES

1.5.1 Variables Independientes

- Genotipo de *Oenothera*. (*Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis* y *Oenothera tetraptera*)
- Conservación del material vegetal (Conservación con silica gel y Conservación en fresco).

- Técnicas de extracción de ADN.
- Protocolos de amplificación (PCR).

1.5.2 Variables Dependientes

- Concentración de material genético (ADN) (ng/ul).
- Calidad del material genético (ADN) (Relación de absorbancia 260/280 y 260/230).

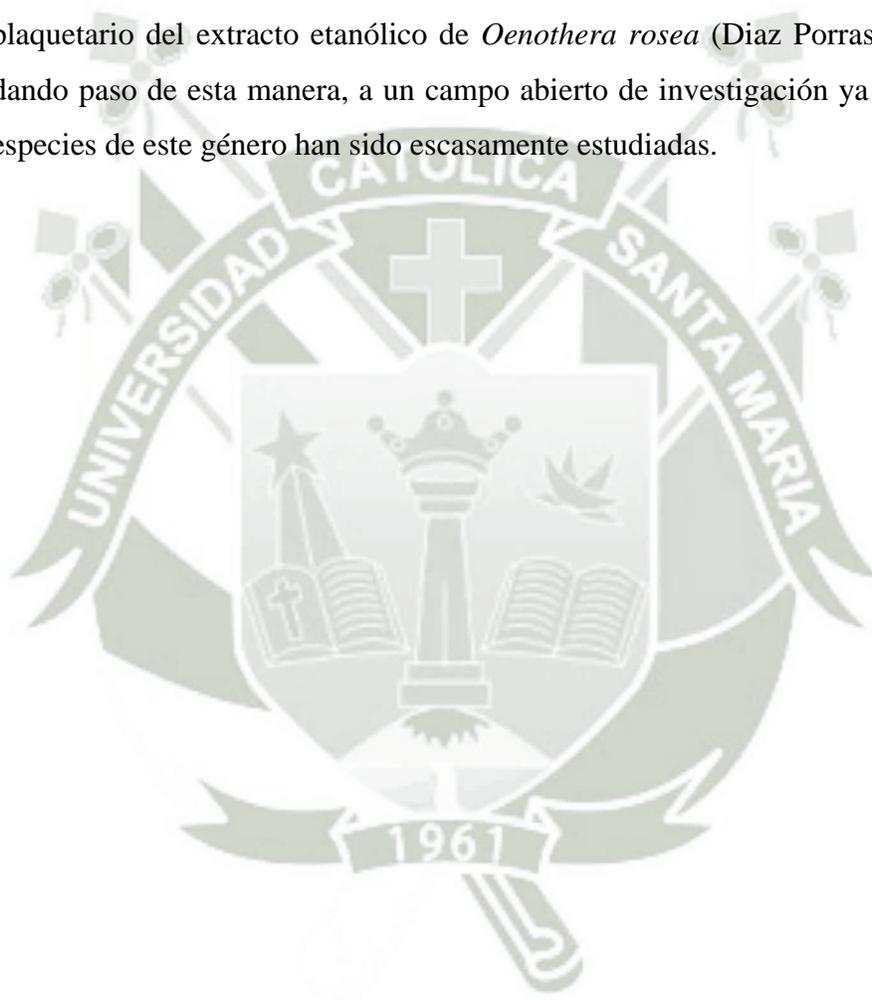
1.6 ANTECEDENTES

La *Oenothera* comúnmente llamada Yawar Chon'qa (Yawar ch'onqa que en español significa chupa sangre), que pertenece a la familia de las onagraceae, es una especie que ha sido usada desde nuestros antepasados ya que sus plantas y sus semillas fueron utilizadas en infusión en agua caliente para curar heridas, problemas cutáneos, enfermedades severas e incluso el asma.

La *Oenothera* de la familia de las Onograceae, se encuentra registrada en el "Missouri Botanical Garden" que cuenta con una identificación botánica de diversas especies de este género distribuidas en el mundo, permitiendo establecer un número de 29 especies que habitan en el territorio peruano, (Missouri Botanical Garden, 2013). Entre las especies más estudiadas de este género, se encuentran *Oenothera biennis* con hábitat en los Estados Unidos, Canadá, México, etc. (USDA NRCS National Data Center, 2001) y *Oenothera Rosea* con hábitat en Estados Unidos, Canadá, México, Perú, entre otros (Missouri Botanical Garden, 2013).

Teniendo adicionalmente estudios moleculares, de aislamiento y de caracterización de microsatélites en *Oenothera biennis*, para lo cual se han desarrollado nueve microsatélites para *Oenothera biennis*, (Larson, Bogdanowicz, Agrawal, Johnson,

& Harrison, 2008) , así como también un sistema de marcadores moleculares para la genética de *Oenothera*, (Rauwolf, Golczyk, et al., 2008), del mismo modo se han encontrado resultados muy favorables de su acción anti-inflamatoria en los extractos metabólicos de *Oenothera Rosea*, (Marquez Flores, et al., 2009), efecto favorable para el tratamiento de Artritis Reumatoidea de *Oenothera biennis* (Soeken, et al., 2002), actividades anti-tumorales en los contenidos fenólicos de ácido fólico de *Oenothera biennis* (Pellegrina, et al., 2005) , y efecto antiagregante plaquetario del extracto etanólico de *Oenothera rosea* (Diaz Porras, et al., 2011), dando paso de esta manera, a un campo abierto de investigación ya que las demás especies de este género han sido escasamente estudiadas.





CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. *OENOTHERA*

2.1.1 Generalidades

La familia de las onagráceas comprende unas 700 especies de plantas anuales esparcidas en todo el mundo, son plantas dicotiledóneas, dialipétalas; siendo principalmente hierbas, pero también hay arbustos y árboles. Esta comprendido por 20 géneros; los más importantes son: *Fuchsia*, *Oenothera*, *Circacea*, *Epilobium* y *Ludwigia* (Salerno, 2011).

Oenothera, comúnmente llamada onagra, es un género de aproximadamente 125 especies de hierbas anuales, bienales y perennes, llamada erróneamente primula, por confusión con el inglés “primrose”. La planta y sus semillas han sido usadas por los indios americanos durante siglos. Usaban la planta como infusión en agua caliente para curar heridas, problemas cutáneos e incluso el asma (Salerno, 2011).

Algunas especies de *Oenothera*, se pueden encontrar en cualquier corriente, suelo seco, jardín bien drenado, en un espacio abierto que es soleado a parcialmente sombreados. Muchos son bastante resistentes a la sequía (Missouri Botanical Garden, 2013).

2.1.2 Clasificación

Oenothera es uno de los géneros más grandes de la familia de las *Onagráceas*, que presenta 125 especies distribuidas por todo el mundo (Missouri Botanical Garden, 2013). La clasificación taxonómica se encuentra detallada en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Oenothera*.

| Clasificación Taxonómica para <i>Oenothera</i> | | |
|---|---|------------------|
| Reino | : | Plantae |
| Subreino | : | Tracheobionta |
| Superdivisión de plantas vasculares | : | Spermatophyta |
| División | : | Magnoliophyta |
| Clase | : | Magnolopsida |
| Subclase de dicotiledóneas | : | Rosidae |
| Orden | : | Myrtales |
| Familia | : | Onagraceae |
| Género | : | <i>Oenothera</i> |

Fuente: (Missouri Botanical Garden, 2013)

2.1.3 Distribución

Oenothera es un género de especies anuales, bienales y perennes, plantas con flores herbáceas, encontradas en América del norte y del sur, Europa, Oceanía, África y Asia (Missouri Botanical Garden, 2013). Un número de miembros permanentes del género son comúnmente encontrados en América del norte, América del Sur y en algunos lugares de Europa, en climas templados; la podemos encontrar a finales de primavera hasta principios del verano. En la Figura 1 puede observarse la distribución de esta especie en el mundo.

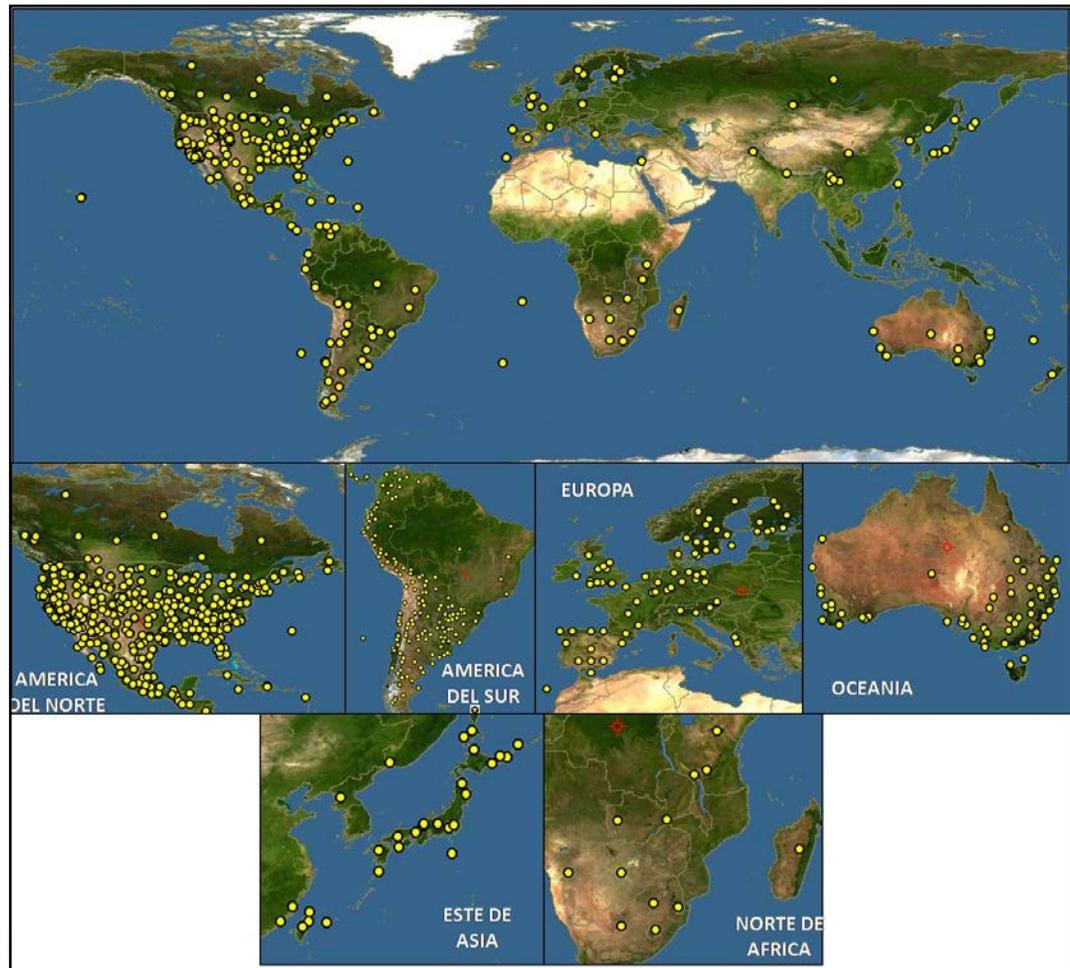


Figura 1. Distribución de cultivos de *Oenothera* en el mundo.

Fuente: (Discover Life, 2013)

2.1.3.1 Distribución en América Latina.

Oenothera se encuentra distribuido muy ampliamente en todo América Latina, encontrándose en América del norte en todo Estados Unidos y México, siendo las más importantes *Oenothera bienis*, *Oenothera rosea*, *Oenothera caespitosa*, *Oenothera berlandierii* y *Oenothera stubbei*, del mismo modo se encuentra distribuido en América del Sur encontrando especies de *Oenothera* en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Chile,

Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil, siendo las especies más importantes *Oenothera biennis*, *Oenothera rosea* (Missouri Botanical Garden, 2013). En la Figura 2 puede observarse la distribución de esta especie en América Latina.

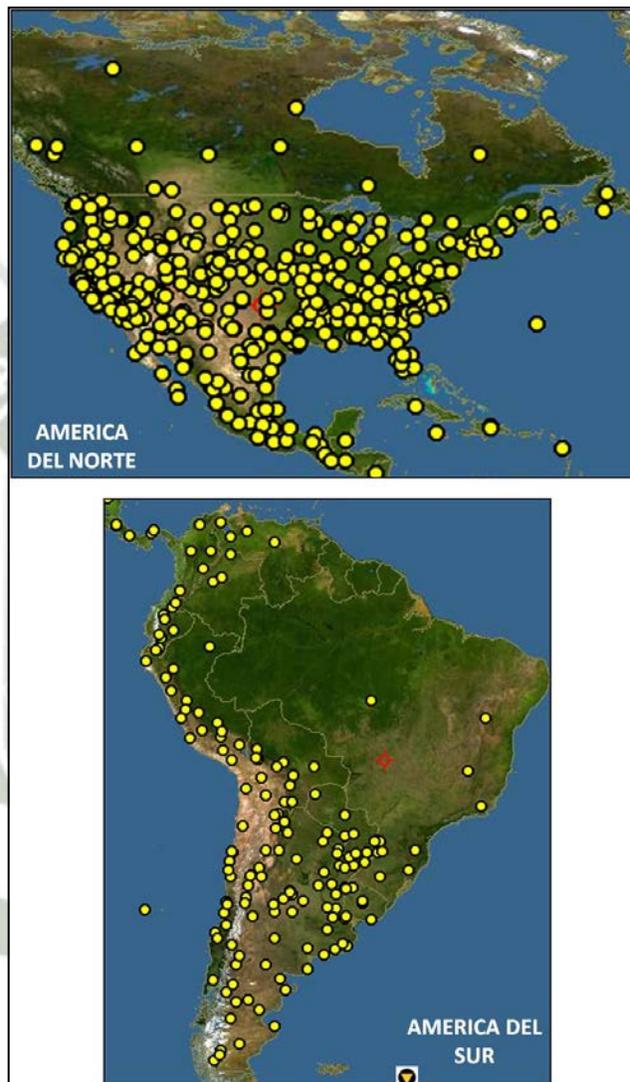


Figura 2. Distribución de cultivos de *Oenothera* en América Latina.

Fuente: (Discover Life, 2013)

2.1.3.2 Distribución en el Perú.

Oenothera se encuentra 19 especies las cuales se encuentran distribuidas en varios departamentos del Perú, encontrándose en mayor volumen en Puno, Lima, Cusco y Arequipa; entre las especies encontrados tenemos *Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis*, *Oenothera tetraptera*, *Oenothera verisicolor*, *Oenothera nana*, entre otras. (Missouri Botanical Garden, 2013), En la Figura 3 y 4 se puede observar la distribución de esta especie en Perú.

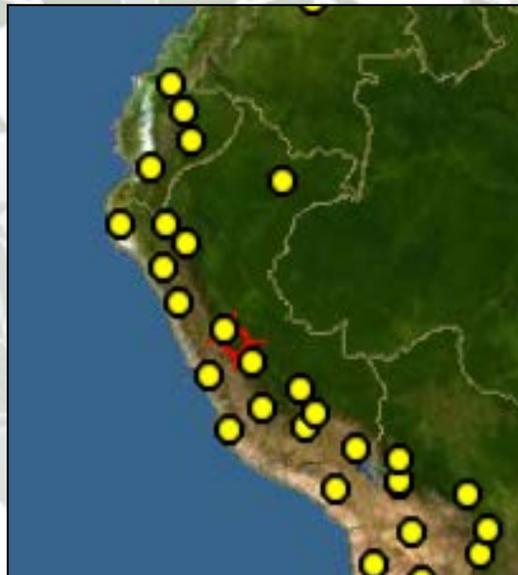


Figura 3. Distribución de cultivos de *Oenothera* en el Perú.

Fuente: (Discover Life, 2013)

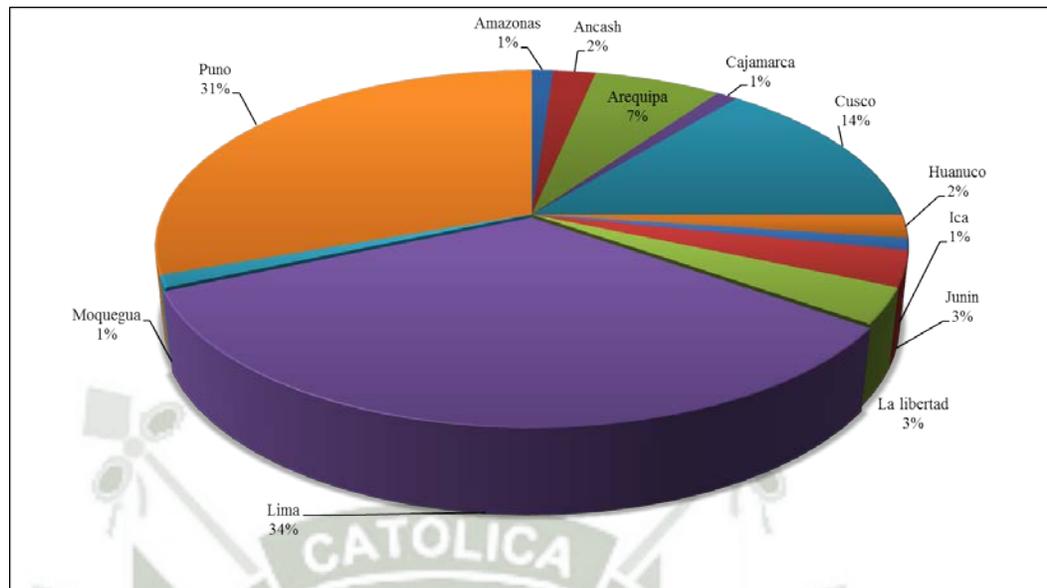


Figura 4. Distribución de especies de *Oenothera* del Perú por departamentos.

Fuentes: (Missouri Botanical Garden, 2013 y Microsoft Excel 2010)

2.1.4 Hábitat

Oenothera, es una planta no muy exigente para crecer, es decir, que aparece en forma silvestre junto a rutas, caminos y cultivos. Crece en terrenos baldíos, suelos arenosos, pedregosos, y secos con abundante sol y bosques abiertos, (Missouri Botanical Garden, 2013).

2.1.5 Composición Fitoquímica.

2.1.5.1 Semillas

Contienen ácido linoleico (ácido cis-linoleico) (65–80%) y ácido gamma linolénico (GLA, cis-g-linolénico) (8–14%), ambos ácidos grasos esenciales debido a que nuestro organismo no es capaz de producirlos y es por eso que deben estar incluidos en la alimentación diaria. También ácido oleico (6–

11%), ácido palmítico (7–10%) y ácido estéarico (1.5–3.5%), ácido aspártico y glutámico. Otros constituyentes incluyen esteroides, como campesterol y beta sitosterol, y alcoholes triterpénicos. En la Figura 5 se puede ver las estructuras químicas de estos compuestos.

En 1 ml. de aceite, también contienen aminoácidos (arginina , cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, prolina, lisina, treonina, tirosina y valina), minerales (potasio, magnesio, manganeso, cobre, boro, hierro, nitrógeno, zinc, calcio y fósforo) y fibra (celulosa y lignina) encontramos entre 80 y 100 mg de GLA, (Salerno, 2011).

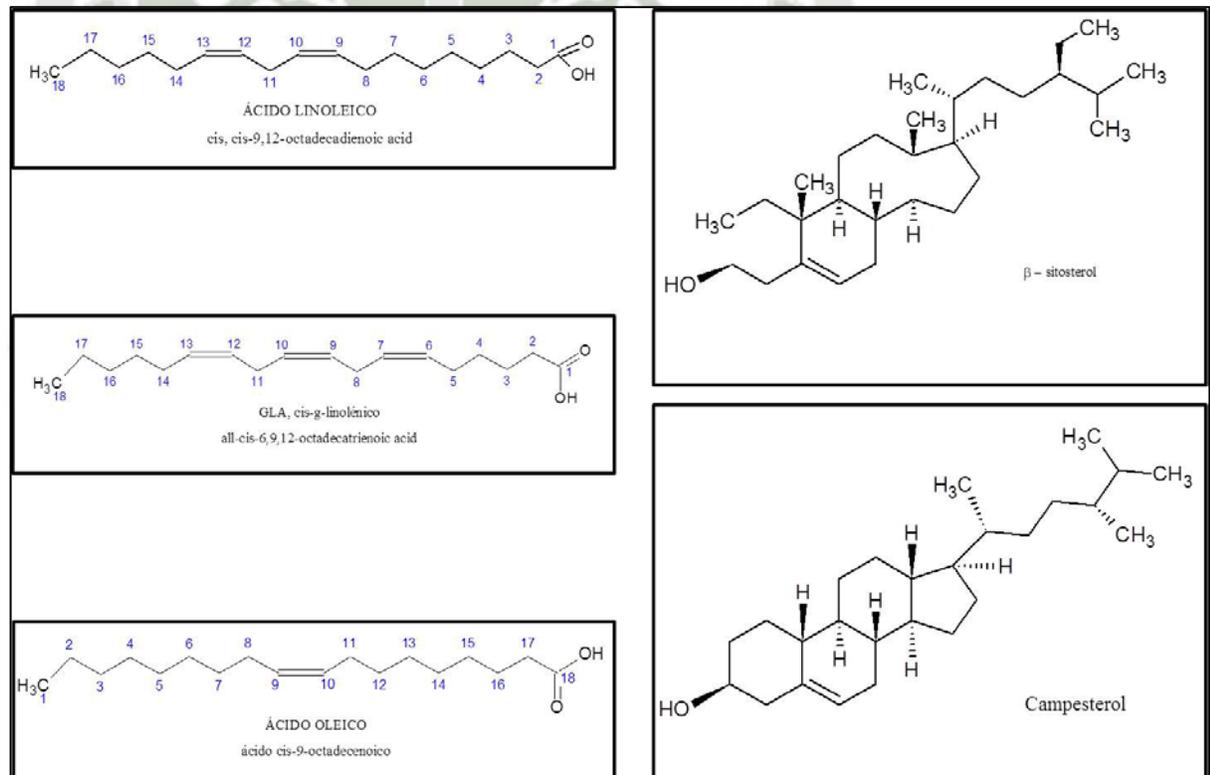


Figura 5. Estructura química de compuestos encontrados en semillas de *Oenothera*.

Fuente: (Salerno, 2011; NCBI, 2013 y ABC-Labs, 2012)

2.1.5.2 Hojas

Contienen ácido cafeico, elágico y p-cumárico; vitamina C; calcio, fósforo y fibra (celulosa y lignina). La parte aérea contiene flavonoides, alcaloides, quinonas, saponinas, fenoles, y taninos, (Salerno, 2011; Gonzales Bellido, et al., 2001; Diaz Porras, et al., 2011). En la Figura 6 se puede ver las estructuras químicas de estos compuestos.

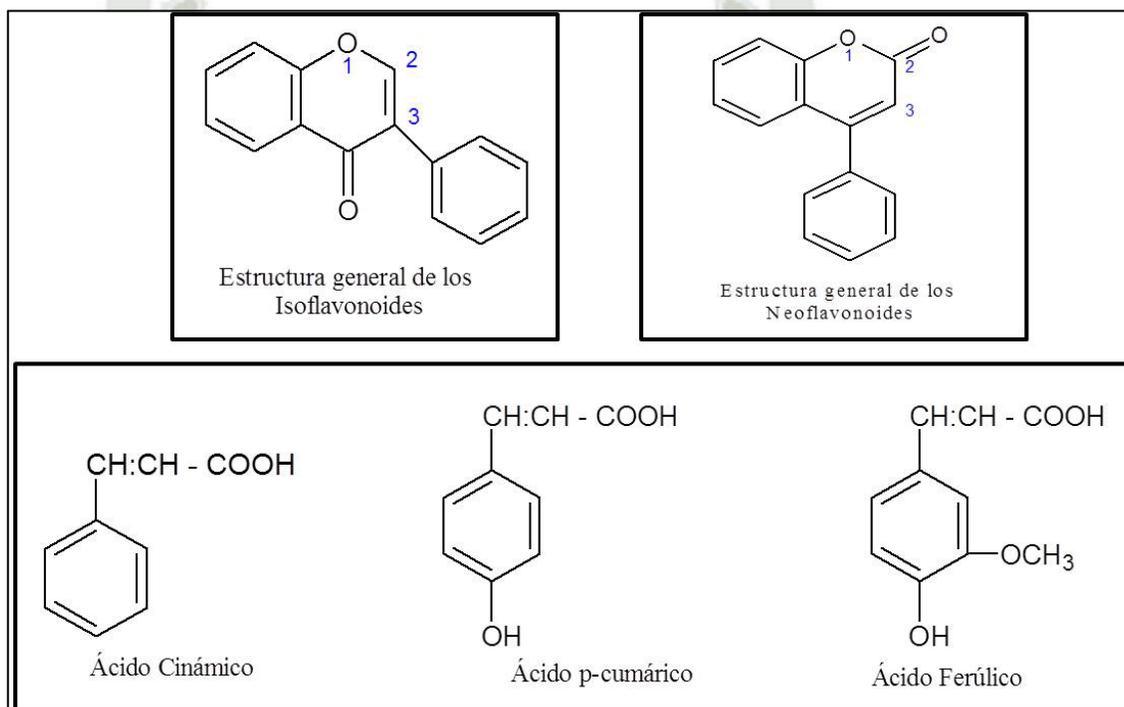


Figura 6. Estructura química de compuestos encontrados en hojas de *Oenothera*.

Fuente: (Salerno, 2011; NCBI, 2013 y ABC-Labs, 2012)

2.1.5.2 Raíz

Contienen taninos, constituidos por ácido gálico principalmente, (Salerno, 2011). En la Figura 7 se puede ver las estructuras químicas de estos compuestos.

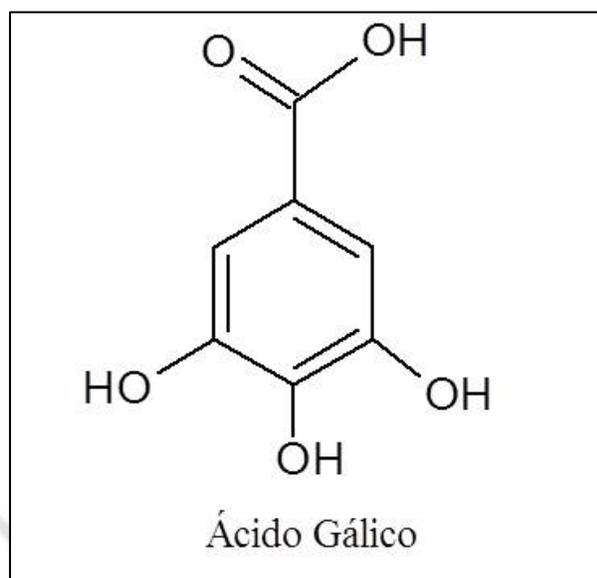


Figura 7. Estructura química de compuestos encontrados en raíces de *Oenothera*.

Fuente: (Salerno, 2011; NCBI, 2013 y ABC-Labs, 2012)

2.1.6 Taxonomía

Las especies varían en tamaño, desde pequeñas plantas alpinas de 10 cm de alto (por ejemplo, *stubbei* O. de México). Las hojas forman una roseta en la base a nivel del suelo y en espiral hasta la floración los tallos, las hojas son dentadas o profundamente lobuladas (pinnatífidas). Las flores se abren por la tarde, y son de color amarillo en la mayoría de las especies, pero blanco, morado, rosa o rojo en unos pocos. La mayoría de las especies nativas del desierto son de color blanco. La fragancia mechones por la noche-primavera de *Oenothera caespitosa*, una especie del suroeste, en primer lugar flores blancas, pero se vuelve de color rosa magenta o la luz (Berkeley, et al., 2013).

2.1.7 Especies de *Oenothera* más conocidas

Existe una especie que es ampliamente estudiada llamada *Oenothera Biennis* conocida como Onagra y *Oenothera Rosea* conocida como Chupa sangre o Hierba del golpe.

2.1.6.1 *Oenothera biennis* (Onagra).

La *Oenothera Biennis* L. u onagra común, es una especie botánica de planta herbácea bienal de 0,5 a 1 m de altura, perteneciente a la familia de las onagráceas, es nativa de Sudamérica y una planta de jardín muy popular, que se ha naturalizado en Norteamérica, ciertas partes de Europa y Asia. En la Tabla 2 se presenta una lista de denominación incluyendo las menos comunes.

Sus flores amarillo pálido se abren durante la tarde, de ahí su denominación de “onagra vespertina”. De las semillas de la onagra, tras una primera presión en frío, se obtiene un escaso y valioso aceite extremadamente rico en ácidos grasos esenciales (AGE). La onagra contiene principalmente ácido linoléico y ácido gamma-linolénico (AGL). Dichos ácidos grasos se denominan esenciales porque nuestro cuerpo no es capaz de producirlos por sí mismo, por lo que necesariamente deben ser incluidos cada día en la alimentación. El aceite de esta planta se utiliza como analgésico durante la menstruación (eficacia, sin efectos secundarios adversos, de la onagra en el tratamiento del síndrome premenstrual) (Salerno, 2011).

Tabla 2. Denominaciones comunes y poco comunes de *Oenothera Biennis*

| NOMBRE | IDIOMA | REGIÓN/PAÍS |
|------------------|------------|---------------------------------|
| Evening primrose | Ingles | Estados Unidos, Europa y Asia |
| Onagra | Castellano | España, Estados unidos, México. |
| Prímula | Castellano | México, Estados Unidos |
| Enothera | Castellano | España |
| Hierba del Asno | Castellano | México, España |
| Hierba del Vino | Castellano | España |
| Enotera grona | Catalan | España |
| Herba do Asno | Gallego | España |
| Erramoa | Vasco | España |
| Canárias | Portugués | Portugal |
| Erva-dos-Burros | Portugués | Portugal |
| Zacora - zacora | Portugués | Portugal |

Fuentes: (Missouri Botanical Garden, 2013; Real Jardín Botánico de Madrid, 2010 y National Institute for Enviromental Studies, Japan, 2011)

2.1.6.2 *Oenothera rosea* (Chupasangre)

Oenothera rosea l'Hér. ex Ait., Crece en lugares abiertos y alterados, desde el nivel del mar desde los 700 m de altitud. Probablemente de origen en Mesoamérica; distribuido en América desde el suroeste de Estados Unidos hasta Perú y Argentina, con una distribución secundaria en Europa, Asia, África y Oceanía (CONABIO, 2009). En la Tabla 3 se presenta una lista de denominaciones incluyendo las menos comunes.

Como requerimientos ecológicos crece a plena luz pero soporta sombra, con una temperatura de piso colino principalmente, suelos húmedos y

secos (indicador de sequedad moderada), en suelos débilmente ácidos pH 5.4 - 7.5 y suelos ricos en nitrógeno (Asturnatura, 2013)

Planta anual o perenne de vida corta, con tallos erectos o procumbentes, que alcanza los 50 cm. de altura y cubiertos por un pilosidad adpresa. Las hojas alternas de 2 - 5 x 1 - 2 cm. son de obianceoladas a estrechamente ovadas y las inferiores de sinuado - dentadas a pinnatífidas; carecen de estipulas en base. Las flores se reúnen en una inflorescencia bracteada, y se mantienen erectas durante el botón; son actinomorfas y tetrámeras.

El tubo del hipanto, de 0.4 - 0.8 cm. está bien desarrollado; es cilíndrico y caduco. El cáliz está formado por 4 sépalos de 0.5 - 0.8 mm. de color verdoso, no persistentes, que están erectos en el botón floral. La corola tiene 4 pétalos purpúreos de 0.5 - 1 cm. el androceo consta de 8 estambres con lo filamentos de hasta 6 mm y el gineceo de un ovario de 1 - 1.5 cm. tetralocular, del que surge un estilo de hasta 1.2 cm que finaliza en un estigma cuadrífido, con lóbulos lineares que está rodeado por las anteras en la floración. El fruto es un capsula de 1.5 - 2.5 cm. claviforme que tiene 4 alas y 4 nervios engrosados alternos; en su interior hay varias semillas sin anillo de pelos, de contorno elíptico o redondeado, (CONABIO, 2009).

Tabla 3. Denominaciones comunes y poco comunes de *Oenothera rosea*.

| NOMBRE | IDIOMA | REGIÓN/PAÍS |
|-----------------------|---------|--------------------------------------|
| Rose evening primrose | Ingles | Estado Unidos, Europa, Asia, Oceanía |
| Pink evening primrose | Ingles | Estado Unidos, Europa, Asia, Oceanía |
| Chupa sangre | Español | Perú |
| Yawar ch'onqa | Quechua | Perú |
| Yerba del cólico | Español | México |
| Yerba del golpe | Español | México, Argentina. |
| Otomi | Español | México |
| Tenek | Español | México |
| Tepehua | Español | México |
| Agua de azahar | Español | México |

Fuentes: (Missouri Botanical Garden, 2013 y CONABIO, 2009)

2.1.8 Especies de *Oenothera* nativas del Perú

2.1.8.1 *Oenothera multicaulis* (Chupasangre de Puna)

Oenothera multicaulis se encuentra distribuido por varios países de América del sur, en zonas con altitudes entre los 3000 a 4000 m.s.n.m., que aparece entre los meses de diciembre a marzo (Missouri Botanical Garden, 2013). En la Tabla 4 se presenta una lista de denominaciones incluyendo las menos comunes.

Hierba anual o perenne, cespitoso (periachoso), tallo ascendente tendido a veces más leñosos hacia la base. Hojas en roseta oblanceoladas de 1-5 cm de largo y 5-25 mm de ancho, angosta a la base, peciolo acanalado, largos la pubescencia suave, hojas enteras o sub enteras, como también son más o menos ovaladas y sésiles al tallo. Flores solitarias, sésiles, axilares, amarillas. Semillas numerosas parduscas de 1-5 mm de longitud

y 0,6mm de diámetro. Esta especie fue determinada por Ruiz & Pavón. (Gonzales Bellido, et al. 2001).

Tabla 4. Denominaciones comunes y poco comunes de *Oenothera multicaulis*.

| NOMBRE | IDIOMA | REGIÓN/PAÍS |
|-----------------------|---------|-------------|
| Yawar chon'qa de Puna | Quechua | Perú |
| Chupa sangre de Puna | Español | Perú |
| Saya-Saya | Quechua | Perú |
| Yawar ch'onqa | Quechua | Perú |

Fuentes: (Missouri Botanical Garden, 2013 y CONABIO, 2009)

2.1.8.2 *Oenothera tetraptera* (Chupasangre Gigante)

Oenothera tetraptera se encuentra distribuida desde los Estados Unidos hasta Colombia, Venezuela y Perú, presenta flores blancas o rosadas grandes, florece de marzo a octubre. En la Tabla 5 se presenta una lista de denominación incluyendo las menos comunes.

Es una hierba perenne, con roseta basal juvenil, después con tallo medio y ramas ascendentes, algo leñosa en la base, erecta o recostada pero con las puntas ascendentes, con pelillos tanto recostados como algo erectos, aproximadamente tiene un tamaño de 50 cm de largo y su tallo es único o saliendo varios desde la base, simple o ramificado, cilíndrico, verde y con pelos, posee hojas basales sésiles, oblanceoladas de 2.5 a 5 cm. de largo y 0.8 a 1.2 cm. de ancho, ápice agudo, borde entero, sinuoso o irregularmente dentado; las caulinares alternas, oblongo-lanceoladas, lineares, oblongas, a veces elípticas o lirado-pinnatífidas, de 3 a 7 cm. De

largo y 1.5 a 2 cm. de ancho, ápice y borde como el de las hojas de la roseta; generalmente con pelillos en ambas caras, con pecíolos muy cortos; las flores son de simetría radial, tetrámeras, hipantio clavado de 0.5 a 0.7 cm. de largo, cubierto de pelos; 4 sépalos angostos, rojizos, frecuentemente doblados hacia atrás, 4 pétalos de 2 a 3 cm. de largo, blanquecinos o rosados, cuando están secos varían de color (rosa, rojo, guinda o morado), 8 estambres estilo dividido en 4 ramas; el fruto y semilla es una cápsula globosa, largamente pedicelada (pedicelo de hasta 4 cm. de largo), con alas, de hasta 1.5 cm. de largo y hasta 1 cm. de ancho, con pelos erectos principalmente en las nervaduras y las alas, semillas numerosas, claviformes, de contorno obovado, superficie punticulada de color café-naranja a café (CONABIO, 2009).

Tabla 5. Denominaciones comunes y poco comunes de *Oenothera tetraptera*.

| NOMBRE | IDIOMA | REGIÓN/PAÍS |
|----------------------------|---------|----------------|
| Yawar chon'qa gigante | Quechua | Perú |
| Four-wing evening primrose | Ingles | Estados Unidos |
| Chupa sangre de gigante | Español | Perú |
| Hierba del golpe | Español | México |
| Linda tarde grande | Español | México |

Fuentes: (Missouri Botanical Garden, 2013 y CONABIO, 2009)

2.1.9 Características del Cultivo

Crece mejor en suelos bien drenados, muy soleados. Pueden cultivarse fácilmente a partir de las semillas; las semillas están maduras cuando la cápsula se abre.

Para asegurar una plantación se debe mezclar las semillas con una pequeña cantidad de arena antes de sembrar. Las semillas usualmente germinan dentro de las 4 semanas, luego la planta generalmente se “auto siembra”. Dado que esta planta puede convertirse en maleza o invasiva en algunas regiones o hábitats y puede desplazar otra vegetación deseable si no es manejada adecuadamente, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) recomienda tener cuidado al cultivar porque se convirtió en invasiva en muchas partes del mundo.

La *Oenothera Biennis*, conocida como onagra tienen un gran potencial para ser cultivo comercial, teniendo como desventajas la inflorescencia indeterminada, alta rotura de semillas durante la maduración y ciclo de vida, que pueden resultar un impedimento. Especialmente la rotura de semillas hace difícil determinar el mejor momento para la cosecha de onagra porque mientras nuevas flores siguen produciendo en la parte superior de la planta, las que están en la base sobre maduran, por lo cual si se espera hasta que la planta produzca las capsulas finales se pierden las semillas de la parte más baja de la planta. Para obtener alto rendimiento en semillas y buena calidad del aceite, es esencial saber cuándo es el momento exacto para la cosecha, (Salerno, 2011).

Dado que la gran mayoría de plantas con beneficios medicinales y comerciales son bianuales con un ciclo de vida relativamente largo, se han estudiado cultivos con menor vernalización, que permita sembrar en primavera y cosechar en otoño, con un tiempo menor de crecimiento y así menores costos de producción. Algunos estudios demostraron que el porcentaje de ácido gamma linolénico de las semillas es similar en onagras de primavera y otoño, (Honermeier, et al., 2005).

El momento de cosecha y la defoliación pro-cosecha tienen influencia en la madurez de las semillas, por lo tanto el potencial de germinación de las semillas podría estar afectado por los diferentes métodos de cosecha. Su ciclo de vida necesita dos estaciones para el crecimiento. Dependiendo de la región y las

condiciones climáticas hay dos momentos de sembrado: uno en otoño y el otro en primavera. En China, de acuerdo a la localidad, las semillas de *Oenothera Biennis* se siembran entre mediados de marzo y mediados de abril, en primavera y entre mediados de agosto y mediados de septiembre en otoño, (Deng, et al., 2001).

En Alemania, sin embargo, un estudio mostró que fines de julio hasta mediados de agosto es el momento recomendable para sembrar *Oenotheras* de primavera. De acuerdo al momento de siembra, las plántulas emergen luego de 19 a 40 días en primavera y de 5 a 15 días en otoño, (Honermeier, et al., 2005).

Aunque la planta florece desde junio a septiembre, las sembradas en otoño florecen antes que las sembradas en primavera. Dependiendo del momento de siembra, el periodo total de crecimiento de las planta sembrada en primavera es de 160 - 200 días; para las plantas sembradas en otoño aumenta a 390 - 400 días. En comparación con los cultivos de otoño, los de primavera más rápidamente se adaptan a la rotación de cultivos y resultan en costos de inversión más bajos, (Ghasemnezhad, 2007).

Otros investigadores, evaluaron si distintas condiciones de crecimiento pueden afectar el rendimiento de semillas (promedio 286 – 3750 Kg. Ha.⁻¹) y la calidad de las plantas, si la distancia entre hileras de sembrado afecta el desarrollo de estas plantas y si el aporte de nitrógeno es efectivo para aumentar la producción de semillas y concluyeron que puede sembrarse también en tierras bajas, irrigadas y con alto rendimiento, que la dosis óptima de nitrógeno y espaciado entre sembrados para mayor cosecha y mejor calidad fueron 120 Kg. Ha.⁻¹ y 40 cm. Respectivamente; sin embargo el aumento en las dosis de nitrógeno afecto el contenido de ácido gamma-linolenico (pekerroúlu et al., 2006). Otras publicaciones también declaran que moderadas dosis de nitrógeno tienden a producir alta calidad y cantidad de semillas, (Honermeier, et al., 2008).

2.1.10 Usos

2.1.8.1 Usos en la medicina

Oenothera es una de las especies que es usada tradicionalmente por las poblaciones quechuas, para diversas patologías, heridas y golpes; ellos lo consumen hirviendo las hojas, flores, tallos o la planta entera, para colocar ungüentos o tomar en forma de mates. En el mundo medicinal tenemos como las especies más conocidas a *Oenothera rosea* y *Oenothera biennis*, las cuales son utilizadas en forma de aceites y extractos metanólicos y acuosos de semillas y hojas.

Varios investigadores demostraron que el uso oral de los aceites de *Oenothera biennis* (Aceite de Primula u Onagra) sirve para tratar dermatitis atópica, en este estudio se investigó el uso oral de capsulas de aceite de onagra, versus capsulas de girasol como placebo durante 5 meses, luego del cual el 96% de los pacientes que recibieron capsulas de aceite de onagra mostraron mejorías, sin reportar efectos adversos, demostrando de este modo que el uso del aceite de onagra es efectivo y seguro en el manejo de la dermatitis atópica, (Senapati, et al., 2008).

Investigaciones preliminares para acné y psoriasis no indican beneficio alguno con el aceite de onagra, sin embargo podría ser de utilidad ya que aumenta de PGE1 en pérdida de los metabolitos del ácido araquidónico vía lipooxigenasa, que son agentes involucrados en las reacciones inflamatorias de la piel vinculadas a las patologías como la psoriasis y el acné, (Berbis, et al., 1999), de este modo reduciría la necesidad de empleo de agentes antihistaminicos, antibióticos y corticoides. Además de su uso interno, utilizar aceite de onagra como aceite de masaje ayuda al restablecimiento más rápido de la piel irritada, por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes usado externamente sobre la piel fortalece la salud y la

elasticidad de las células de la piel, siendo adecuado para situaciones en las que la piel se encuentra inflamada.

Se conoce que el aceite de onagra ayuda a mantener la elasticidad de la piel y la secreción sebácea; dado que los ácidos omega 6 tienen un rol importante en mantener la integridad epidérmica, interviniendo en la cohesión del estrato córneo y previniendo la pérdida de agua transepidérmica, contribuye a evitar la formación de arrugas por su acción hidratante, aunque no hay suficientes estudios que avalen este usos (Salerno, 2011).

Se ha descrito que el uso de aceite de onagra es efectivo para ser usado para tratar la esclerodermia que solo era tratada con corticoides, inmunomodulares y AINEs, (Gaby, 2006). Del mismo modo el uso oral de aceite de onagra aplicada en la piel afectada por el síndrome de Raynaud reduce el entumecimiento y alivia el dolor de las zonas afectadas.

Se ha visto que el aceite de onagra podría ser utilizado para el síndrome de Sjögren ya que regula la secreción de las glándulas lagrimales y salivales y en el caso de la piel es favorable el uso tópico, se ha observado mejorías clínicas en pacientes tratados, (Oxholm, et al., 1986).

Se ha demostrado que el aceite de onagra sirve para el tratamiento en mujeres con mastalgia obteniendo resultados parecidos a los tratamientos con bromocriptina y otros medicamentos recetados, por lo que es adecuado el uso en paciente con síntomas leves o que requieren terapias prolongadas, (Pye, et al., 1985), sin embargo un metanálisis realizado mostro que el aceite de onagra no ofrece ventajas sobre el placebo en el alivio del dolor (Srivastava, Mansel, Arvind, Prasad, Dhar, & Chabra, 2007), por lo que aun falta realizar mas investigaciones para comprobar su efectividad.

Para la menopausia se ha reportado los efectos de aceite de onagra sobre los trastornos de la menopausia, aunque muchos estudios han resultado positivos también se han reportado estudios negativos sobre el efecto del aceite. Un estudio realizado en el 2005 se analizaron 19 pacientes con remedios botánicos como el aceite de onagra, el dong quai y ginseng, mostrando resultados negativos, (Low Dog, 2005). En un informe más reciente, los investigadores declararon que no hay pruebas suficientes para poder determinar la efectividad clínica del aceite de onagra para la menopausia (National Institutes of Health, 2013).

Se ha visto que para la esclerosis múltiple se puede usar el aceite de onagra, ya que existe evidencia que modificando la ingesta de grasas de la dieta y suplementando con ácidos grasos poliinsaturados omega 6 puede influenciar el curso de la patología. Se ha reportado que esto produce una disminución en la concentración de ácido linolénico en los eritrocitos, y el interés específico en los ácidos grasos omega 3 sería por la modulación de las citoquinas, los suplementos dietarios pueden inducir una disminución en la severidad y frecuencia de recaídas, aunque la presencia de anticuerpos antifosfolípidicos en la esclerosis múltiple no estaría relacionado con los lípidos de la dieta, (Bourre, 2005).

El aceite de onagra demostró efectos inhibidores sobre el aumento de colesterol total, LDL y VLDL (Kim, et al., 2005); un estudio en ratas demostró que el aceite de onagra es más efectivo que el aceite de soja para la disminución del colesterol sérico (Sugano, et al., 1986). Otro estudio en conejos mostró que el aceite dado conjuntamente con dietas aterogénicas disminuye la agregación plaquetaria, (De La Cruz, et al., 1997). En otros estudios se estudió el efecto antiagregante plaquetario *in vivo* y fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton., demostrando el efecto antiagregante *in vivo* y el fibrinolítico *in vitro*

para el extracto etanólico de hojas de *Oenothera rosea*, (Díaz Porras, et al., 2011).

Existen evidencias preliminares de que el aceite de onagra puede reducir la presión arterial, hace más de dos décadas investigadores alemanes encontraron que el pre-tratamiento con aceite de onagra disminuyó la reactividad vascular a estímulos vasopresores de renina y angiotensina II e incremento la actividad de prostaciclina vasculares en un estudio realizado en ratas, (Schölkens, et al., 1982). Del mismo modo otro estudio mostró la eficacia para prevenir la pre-eclampsia en mujeres embarazadas, (D'Almeida, et al., 1992). De todos modos se requieren más estudios para confirmar la utilidad de estos casos.

El aceite de onagra se utiliza para tratar el daño nervioso causado por la diabetes. No ayuda a controlar la diabetes en sí, pero puede ser útil para algunos síntomas de la enfermedad, tales como la neuropatía diabética: la pérdida de entumecimiento, hormigueo, dolor o pérdida total de la sensibilidad en los pies o las piernas, (National Institutes of Health, 2013). Según reportan investigadores, el estrés oxidativo y el metabolismo alterado de ácidos grasos en pacientes diabéticos llevan a la disminución en la perfusión sanguínea del tejido nervioso lo cual contribuye al desarrollo de la neuropatía diabética y el GLA aportado por el aceite de onagra mejorando la síntesis de eicosanoides vasodilatadores, corrigiendo el flujo sanguíneo y el déficit en la conducción nerviosa, los efectos de este ácido se ven marcadamente favorecidos cuando se administra en combinación con ascorbato como ascorbyl-GLA, (Cameron, et al. 1993).

Una novedosa formulación intravascular, meglumine con ácido gamma linolenico MeGLA, fue evaluada en un estudio fase II que involucro 30 pacientes con cáncer de vejiga superficial recurrente y los datos mostraron que MeGLA es segura y tolerada, con una tasa de respuesta favorable del

43%, (Harris, et al., 2002). También se desarrollaron estudios para evidenciar el efecto anti-tumoral de extractos fenólicos de *Oenothera Biennis*, encontrando buenos resultados (Pellegrina, et al., 2005).

Se realizaron estudios para ver el efecto del aceite de onagra frente a la artritis reumatoidea, demostrando que se ve un alivio potencial para el dolor, la rigidez matutina y el dolor articular, (NCCAM, 2005). Del mismo modo se ha sugerido que el aceite de onagra puede ser útil para el tratamiento o prevención de la osteoporosis, los resultados de un estudio controlado indican que los ácidos grasos poliinsaturados *n-3* aportados por fuentes vegetales pueden tener un efecto protector sobre el metabolismo del hueso, disminuyendo la resorción ósea en presencia de niveles constantes de formación del hueso, (Griel, et al., 2007).

Se ha reportado el uso de aceite de onagra para el déficit de atención e hiperactividad (ADHD) ya que los ácidos grasos esenciales son importantes para el funcionamiento normal del cerebro y el comportamiento. Estudios clínicos sugieren que los niveles de ácidos grasos esenciales omega 3 y 6 se encuentran alterados en niños con ADHD, encontraron que estos pacientes tienen niveles significativamente más bajos de ácidos docosahexanoico ácidos grasos totales omega 3 y 6, (Colter, et al., 2008).

Varios científicos investigaron el efecto antioxidante de los polifenoles, en un estudio en Canadá, se comprobó una fuerte actividad antioxidante de extractos fenólicos de onagra, siendo los principales antioxidantes presentes en las semillas de onagra son catequina y procianidina galato, (Shahidi, et al., 2007).

También se han realizados estudios con *Oenothera rosea* para diferentes patologías. Se realizó investigaciones para determinar la actividad antibacterial de extractos de hojas de *Oenothera rosea*, concluyendo que estos extractos poseen actividad antibacterial para microorganismos

patógenos (E. Coli, Salmonella enteritidis, Vibrio Cholerae), (Gomez Flores, et al., 2012). Investigadores mexicanos evaluaron la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos y metanolicos de *Oenothera rosea* L'Hér.ex Ait en ratas, obteniendo que el extracto de *Oenothera rosea* produjo actividad antiinflamatoria y fueron consideradas no tóxicos, (Marquez Flores, et al., 2009). Se realizaron estudios con extractos de *Oenothera rosea* para ver el efecto para el tratamiento de golpes y heridas, dando resultados óptimos para el tratamiento, (Roersch Ph. D., 1993).

2.2. ANÁLISIS MOLECULAR

1.2.1. Recolección de material genético.

Las plantas se han utilizado para los estudios científicos hace siglos, utilizando diferentes métodos para la conversión de la información de los materiales vegetales, hoy en día con la creciente aplicación de datos moleculares se requiere métodos sistémicos de conservación con la intención de conservar las isoenzimas y ácidos nucleicos que se pueden recuperar (Aaron, et al., 1990).

Una de las consideraciones más importantes en cualquier procedimiento de extracción de ADN de plantas es la manera utilizada para coleccionar y preservar el tejido vegetal, ya que la condición fisiológica en especial, y no tanto el protocolo que se va utilizar determina la calidad del ADN. En la colecta se deben cumplir con algunas condiciones: el material debe ser lo más joven posible, no debe maltratarse, cortarse, ni pulverizarse. Con ellos se evita generar una mayor superficie expuesta al oxígeno y desencadenar proceso oxidativos de polifenoles (Couch et al., 1990 y Centro Internacional de la Papa, 1998).

El material fresco puede ser coleccionado y mantenido en hielo o en un frigorífico durante algunos días hasta ser procesado. Si fuera necesario un almacenamiento prologando, el material puede ser congelado a -20°C durante algunas semanas, o

-80°C indefinidamente y descongelado justo antes de la extracción (Ferreira et al., 1998).

1.2.2. Extracción de ADN.

El aislamiento de ADN genómico es un requerimiento fundamental para la realización de varios procesos análisis en biología molecular. Aunque la recolección adecuada y estabilización de las muestras es crucial, siendo la purificación del ADN a menudo el paso más importante para realizar análisis posteriores. Es por eso que la selección del método de extracción es uno de los pasos fundamentales para la realización de cualquier análisis molecular en tejidos vegetales, este protocolo debe ser aquel con el que se obtenga la mayor pureza del material genético, lo cual nos indica que todas las sustancias que pueden inhibir la amplificación fueron eliminadas. (Gankar, et al., 2006).

Las plantas que contienen materiales pegajosos y resinosos (plantas medicinales, fresa, frambuesa, etc.), resultan ser dificultosas en los procesos de extracción por la presencia de metabolitos secundarios como los polifenoles, taninos, polisacáridos, inhibidores de enzimas, estos son evidenciados fácilmente en el ADN por su aspecto viscoso, similar al pegamentos haciendo del ADN inmanejable al pipeteo y inamplificable en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), por la inhibición de la actividad de la Taq Polimerasa (Porebski, et al., 1997).

La eficiencia de la extracción está determinada por tres factores la cantidad de concentración, la pureza de la muestra y la integridad del ADN (Gankar, et al., 2006).

2.2.2.1 Pasos para el proceso de extracción de ADN

Una técnica de extracción de ADN tiene que conseguir un número específico de objetivos, expuesto a continuación. En la práctica, una técnica de extracción no puede consistir necesariamente en la ejecución secuencial de cada tarea, por ejemplo los tampones de extracción contienen comúnmente productos químicos de lisis así como productos químicos para quelar inhibidores, por lo que dependiendo del tipo de muestra y el análisis posterior se puede hacer mayor o menor énfasis en cada uno de los siguientes pasos según sea necesario.

2.2.2.1.1 Conservación de muestras.

Existen esencialmente dos tipos de conservación para realizar análisis con ácidos nucleicos que son en fresco y preservado. El ideal almacenamiento de ácidos nucleicos es naturalmente como tejidos fresco, pero si la extracción no se realiza inmediatamente, el tejido es rápidamente dañado por la endonucleasas, por lo que el uso de sistemas de congelamiento de los tejidos sólidos con nitrógeno líquido preserva también los ácidos nucleicos y pueden facilitar la disrupción del tejido y células, (Coleman, et al. 2006).

Conservación de tejidos frescos.

Las muestras en fresco pueden ser extraídas inmediatamente o almacenadas por horas o días a bajas temperaturas antes de la extracción. La refrigeración usualmente permite que la extracción se pueda realizar varios días después de la recolección, por otro parte el almacenamiento no debe permitir el crecimiento de hongos en estos tejidos. El alcohol puede ser usado para ayudar a preservar mas tejidos para el análisis. El análisis de tejidos frescos es probablemente la

mejor opción para la realizar extracciones de ADN en la mayoría de casos, (Robert, 2001).

Conservación de tejidos preservados.

El almacenamiento de tejidos seco es posible para muchos tipos de tejidos, siendo la forma más simple de muestreos de muchas hojas colocar las hojas frescas en una bolsa de papel con persevantes y almacenar en ambientes con aire acondicionado, estas condiciones producen la mejor calidad de muestras para herbarios y resultan también buenas para preservar el ADN. El análisis de las muestras secas puede ser útil cuando las muestras de un mismo estudio se recogerán durante un período prolongado permitiendo la extracción de ADN cuando el muestreo este completo, (Robert, 2001).

2.2.2.1.2. Preparación de las muestras

Una muestra puede beneficiarse de una serie de etapas preparativas antes de la lisis celular. Esto podría incluir la homogeneización, separación por centrifugación o un paso para reducir al mínimo los efectos de los contaminantes de la superficie, (Keer, et al., 2008).

Los factores que afectan la extracción de ADN debido a la preparación de la muestra son las siguientes:

Homogeneidad de la muestra

Es esencial que el material seleccionado para el análisis sea realmente representativa de la totalidad de la muestra con respecto tanto a la matriz y el analito (RSC, 1995), con el fin de lograr esto, puede ser necesario homogeneizar las muestras heterogéneas en un molino mezclador, licuadora o mortero con pilon antes del análisis. Alternativamente, un mínimo de muestras debe ser empleada para el

análisis, reduciendo de este modo la cantidad de errores de muestreo representativo que puede ocurrir si se ha realizado una selección heterogénea mucho más pequeño. La adherencia a tales criterios determinados empíricamente puede mejorar significativamente la reproducibilidad del rendimiento y la precisión en el análisis cuantitativo y evitar la posibilidad de resultados falsos negativos, (Keer, et al., 2008).

Superficie de área para la relación de fuerza de lisis.

Muestras voluminosos tales como tejidos animales pueden requerir ser fragmentados en segmentos más pequeños o de homogeneización con el fin de aumentar la eficiencia de la lisis celular. El fracaso para llevar a cabo esta medida o para llevarlo a cabo de una manera consistente puede resultar en bajos rendimientos o la no reproducibilidad del ADN (Keer, et al., 2008).

Celulas o acidos nucleicos adheridos al material de la matrix

Existen a veces requerimientos para eliminar las células de matrices complejas o núcleos de las células antes de la lisis celular o de membrana de esta manera los inhibidores presentes en la matriz celular se eliminan en el comienzo del análisis. Se debe tener precaución, con un porcentaje de células y ADN que pueden adherirse o ser atrapado dentro de la matrix, (Keer, et al., 2008).

Contaminación.

Deben extremarse las precauciones para garantizar que no se produzca la contaminación cruzada de las muestras durante las primeras etapas de análisis. Tales sucesos podrían ocurrir cuando se utiliza una batidora para homogeneizar múltiples muestras sin una limpieza adecuada entre los especímenes. Por otra parte, la producción de

partículas finas de polvo al moler materiales con nitrógeno líquido debe ser realizada usando guantes para evitar que los fluidos corporales o escamas de piel puedan ser inadvertidamente introducidos en una muestra y confundir el análisis, (Keer, et al., 2008).

2.2.2.1.3. Lisis de la membrana celular.

El paso de disrupción de la pared celular, membranas de organelas, y la liberación del ADN de la célula. Este puede ser logrado por tratamientos químicos (usualmente detergentes), mecánicos, enzimáticos, de microondas, de sonicación, calentamiento o enfriamiento, (Keer, et al. 2008).

Los factores que afectan las lisis de celular son identificados como los siguientes:

Inaccesibilidad de las células a las fuerzas de lisis.

Si las lisis células no se realiza usando enzimas o detergentes puede resultar ineficiente, reduciendo la muestra y productibilidad.

Tipo y cantidad de detergente o denaturante usado.

Existen diferentes tipos de detergentes y denaturantes adecuados para la lisis de células y membranas (Tabla 6). Generalmente los detergentes se unen a la membrana y lisan y solubilizan la membrana generando un complejo detergente – lípido – proteína. Varios factores pueden afectar la performance al incluir un detergente como son la temperatura, pH, la fuerza iónica, concentración de detergente, presencia de iones multivalentes y la presencia de aditivos orgánicos. Por lo tanto, si muchos de estos factores están alterados en un

protocolo estándar, el efecto de la actividad del detergente puede ser afectado, (Keer , et al. 2008).

Concentración y actividad de las enzimas líticas

Las enzimas también trabajan de manera óptima dentro de un rango específico de pH y temperaturas, por lo tanto pueden verse afectadas por la presencia de iones metálicos o agentes quelantes. Por lo tanto, la concentración de enzima utilizada debe ser determinada empíricamente, (Keer, et al. 2008). Las enzimas comunes que se utilizan en la lisis de células y la membrana se pueden ver en la Tabla 7.

Concentración de EDTA en el buffer de extracción.

La concentración de EDTA en el buffer de extracción debe ser optimizada minimizando la actividad endógena de ADNasa manteniendo así la integridad del ADN, el EDTA actúa como quelante de magnesio y es co-factor de otros cationes divalentes. Para muestras ricas en calcio se usa EGTA, que es un agente específico para el calcio y puede también ser añadido al tampón de extracción, (Keer, et al. 2008).

Concentración de sales en el buffer de extracción

Las sales isotónicas crea un entorno para estabilizar los ácidos nucleicos libres (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, 50 mM de tampón de fosfato, pH 7,4, NaCl al 0,9%), (Keer , et al. 2008).

Tabla 6. Detergentes y denaturadores comunes usados en la extracción de ADN.

| DETERGENTE DENATURADOR | DESCRIPCIÓN | CONCENTRACIÓN FINAL |
|----------------------------|--|--|
| CTAB | Detergente catiónico que solubiliza la membrana y forma un complejo con el ADN permitiendo la selectiva precipitación por concentraciones bajas de sales, <0.5 M. o adicionando isopropanol. Puede ser usado para plantas y matrices con alta cantidad de polisacáridos. | 1-2% (Vol/Vol) (puede precipitar a temperaturas menores a 15°C) |
| Isotiocianato de guanidina | Es un agente chaotropico o denaturante de proteínas el cual es usado a altas concentraciones de sales, inhibe nucleasas. | 4-5-M |
| Fenol | Denaturante de proteínas. Se añade AL extracto de ADN, colectando las proteínas en una fase orgánica, el ADN se mantiene en la fase acuosa. | Solución 1:1 |
| Sarkosyl | Detergente anionico usado en lugar del SDS debido a que el altamente soluble (el SDS es insoluble in altas concentraciones de sales) | 0.5 – 2.0 % (vol/vol) |
| SDS | El SDS (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>) es un detergente anionico y denaturante proteico. Desasocia complejos ADN – Proteína. Forma espuma cuando se agita. | 0.5-2.0% (vol/vol) |
| Triton-X | Detergente no iónico que solubiliza proteínas sin desnaturalizarlas. | 0.5% (vol/vol) |
| Tween | Detergente no iónico que solubiliza proteínas sin desnaturalizarlas. | 0.5% (vol/vol) |

Fuente: (Keer , et al. 2008).

Tabla 7. Enzimas comunes usadas en la lisis de células y membranas.

| ENZIMA | DESCRIPCIÓN | CONCENTRACIÓN FINAL |
|--------------------|---|-----------------------------|
| Proteinasa K | Es una proteasa no específica, no es inactivado por iones metálicos o agentes quelantes. Su actividad total esta sobre pH 6.5 a 9.5. Libera los ácidos nucleicos de las proteínas que se adhieren. Su actividad es estimulada por agentes desnaturizantes (SDS y urea). | 0.1-0.2 mg.ml ⁻¹ |
| Pronasa | Es una mezcla de proteasas, es más barato que las proteinasa K. | 0.5-1 mg.ml ⁻¹ |
| Lisoenzima | Usada con EDTA para romper paredes celulares o membranas in extracción de ADN de bacterias. | 1-5 mg.ml ⁻¹ |
| Zimolasa Chitinasa | Digiere paredes celulares chitinosas de hongos que pueden ser resistentes a fuerzas mecánicas. | 1 mg.ml ⁻¹ |
| Liticasa | Usada para La degradación de paredes celulares de levaduras. | 20 units ml ⁻¹ |

Fuente: (Keer , et al. 2008).

pH del buffer de extracción.

El más común de los buffer usados en biología molecular es el Tris, con un pH entre 7.0 y 9.0; otros buffer biológicos son usados más adecuados para muchas aplicaciones. Por ejemplo, cuando trabajamos con muestras acidas el pH puede caer durante el proceso de extracción, por lo tanto un buffer con un alto pH de rango sería requerido. El buffer de extracción debe ser ajustado al pH requerido, esto debería llevarse a cabo después de que todos los componentes del tampón se disuelven completamente y, si es necesario, el tampón debe ser tratado en autoclave y enfriado a temperatura ambiente. Si se preparan soluciones de extracción, el pH de la solución de trabajo final debe comprobarse y ajustarse según sea necesario, (Keer, et al. 2008).

Excesivo daño del ADN

El daño puede ser infringido al ADN durante el proceso de extracción causando esquilas y la degradación. Las moléculas de ADN son susceptibles a la fractura caso de calentamiento, sonicación, molienda en nitrógeno líquido o forzada a través de pequeñas cavidades, tales como puntas de pipeta a un grado excesivo. En las que estos procedimientos son a menudo esenciales en un proceso de extracción, los niveles de tolerancia de tales tratamientos deben ser determinados empíricamente para una muestra dada. Si se requiere ADN de alto peso molecular tales todo el estrés físico debe ser evitado, y empleados métodos de lisis enzimática más suaves, (Keer, et al. 2008).

2.2.2.1.4. Protección y estabilización del ADN liberado.

Un buffer de extracción es usualmente colocado durante el proceso de lisis. Este contiene una combinación de componentes químicos los cuales protegen el ADN liberado en el nuevo ambiente de la degradación de nucleasas que fueron liberadas y podrían dañarlo, (Keer, et al., 2008).

2.2.2.1.5. Separación de ácidos nucleicos de la debris celular.

La separación del ADN liberado de la debris celular es logrado tradicionalmente por el fenol-cloroformo y extracción por cloroformo, aunque metodologías comerciales son usadas rutinariamente las cuales no requieren el uso de reactivos peligrosos pero son costosas, (Keer, et al., 2008).

Los factores que afectan la adecuada separación de ácidos nucleicos de la debris celular son los siguientes:

Calidad del Fenol

El fenol de alta calidad debe utilizarse siempre que haya sido correctamente tamponado (pH 7 - pH 8) y almacenado en la oscuridad a 4°C durante no más de 1 mes o a -20°C durante períodos más largos. La 8-hidroxiquinolina (0,1%) estabiliza al fenol al retardar la oxidación, (Keer, et al., 2008).

Extracción y Remoción Ineficiente de Fenol

Una muestra puede requerir más de una extracción con fenol para eliminar los contaminantes potenciales. Debe tenerse cuidado al remover la fase acuosa; la interfaz que contiene los restos no debe ser perturbada. Podría considerarse prudente sacrificar un pequeño volumen de la fase acuosa cerca de la interfaz. Si se utiliza fenol, los

restos o trazas deben ser retirados de la muestra mediante una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para evitar la inhibición de la actividad enzimática en los procesos subsecuentes, (Keer, et al., 2008).

2.2.2.1.6. Purificación del ADN.

El ARN puede ser removido del extracto de ADN por la adición de apropiadas nucleasas que lo degradaran. Otras impurezas puede actuar como inhibidores por lo que son removidas por columnas de cambio iónico, procesos químicos o la adición de agentes quelantes, (Keer, et al., 2008).

Los factores que puede ayudar a una mejor purificación del ADN se han identificado de la siguiente manera:

Composición del Buffer de Extracción

Ciertos reactivos como aquellos proporcionados en la Tabla 8 pueden ser añadidos al buffer de extracción para quelar o inactivar los inhibidores, (Keer, et al., 2008).

Tratamiento ARNasa de la Muestra

La contaminación por ARN puede interferir con algunos procedimientos analíticos o técnicas de cuantificación. Esto puede ser particularmente relevante cuando se trabaja con tejidos ricos en ARN como hígado y riñón. La digestión de ARN puede ser realizada en varias etapas del proceso de extracción si las condiciones del buffer son las adecuadas. Debe tenerse cuidado de inactivar las ADNasa presentes en las preparaciones de ARNasa comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una solución stock de 10 mg.ml^{-1} es

normalmente preparada y usada a una concentración de trabajo de aproximadamente 100 ug.ml^{-1} , (Keer, et al., 2008).

Tabla 8. Reactivo que son utilizados en el buffer de extracción para remover inhibidores.

| ADITIVO | DESCRIPCIÓN |
|---|--|
| PV(P)P40 (<i>polyvinil(poly)</i> <i>Pyrrolidine</i>) | Está incluido en el buffer de extracción de plantas y suelos ricos en polifenoles, ya que degrada a este compuesto. Los polifenoles se oxidan y forman el fenol oxidasa la cual se une al ADN formando complejos que inhiben y dañan el ADN. |
| DTT (<i>Dithiotheitol</i>) (1mM) | Es un antioxidante, considerado superior que el β -mercaptoetanol y con una menor tendencia a oxidarse al contacto con el aire. |
| DIECA (<i>diethyl-</i> <i>dithiocarbamic</i> <i>acid</i>) | Inhibidor del fenol oxidasa, inhibe la oxidación de polifenoles que dañan el ADN. |
| Ascorbic acid (5mM) | Fuerte agente reductor/ antioxidante. |
| β -mercaptoetanol | Agente reductor y antioxidante, protege a los grupos sulfidril contra la oxidación, se añade al buffer de extracción antes de usar. |
| Cisteina (10mM.) | Antioxidante. |

Fuente: (Keer , et al. 2008).

2.2.2.1.6. Precipitación y Concentración de ADN.

Se puede lograr la concentración de ADN por precipitaciones con alcohol, columnas comerciales o agentes químicos, siendo al mismo tiempo removido más inhibidores.

Este paso del procedimiento puede llevarse a cabo por un número de razones: en primer lugar, para cambiar el disolvente, tal vez a un tampón adecuado para los propósitos de almacenamiento, en segundo lugar, para eliminar ciertos contaminantes no precipitados, y Tercero, para concentrar el ADN a una requerida molaridad de trabajo, (Keer, et al., 2008). Una revisión de los aspectos prácticos de precipitaciones alcohólicas es descrito por Winfrey, et al. 1997.

Los factores que afectan la validez de la extracción debido a la concentración o precipitación de ADN han sido identificados como sigue:

Volumen y Temperatura de Alcohol usado y Tiempos de Precipitación

Usualmente se recomienda un volumen 2X de etanol o un volumen 0.6X de isopropanol. La precipitación de ADN se realiza a temperatura ambiente o a -20°C . Si la concentración de ADN es baja, los rendimientos se pueden incrementar incubando toda la noche a -20°C ., mientras que para las muestras que se sabe que contienen altas cantidades de ADN 10 minutos a temperatura ambiente podrían ser suficientes. Los tiempos y la velocidad de centrifugación también pueden ser incrementados para muestras de bajo rendimiento, sin embargo esto puede compactar más el pellet y dificultar su redilución. El isopropanol es útil cuando se requiere volúmenes más pequeños, sin embargo, es menos volátil y tiene mayor tendencia a coprecipitar sales que el etanol, (Keer, et al., 2008).

Concentración y tipo de sal

Con el fin de formar un precipitado de ácido nucleico, debe haber al menos una concentración de 0.2 M de un catión monovalente para proteger la carga negativa de los grupos fosfato del ácido nucleico y permitir el agregado de hebras de ácido nucleico. Por lo tanto, la adición de sal a las muestras extraídas con buffers comunes, los cuales tienen menores concentraciones de sal, podría ayudar al proceso de precipitación con alcohol si se añade a la concentración final proporcionada en la Tabla 9. Sin embargo, si un buffer de alta concentración salina fuera usado, la adición de posteriores sales podría reducir el rendimiento de ADN precipitado. Lavar el pellet con etanol 70% puede remover algunas de las sales precipitadas, (Keer, et al., 2008).

ADN degradado

Cuando se espera ADN degradado o comprometido luego de un proceso de extracción (por ejemplo, cuando se trabaja con una muestra altamente procesada o una muestra sumergida en parafina), se debe recordar que las moléculas pequeñas de ADN (<200bps) son precipitadas ineficientemente por etanol. La precipitación puede ser mejorada por la adición de $MgCl_2$ o glucógeno hasta una concentración final de 10 mM. y 10 $\mu g \cdot ml^{-1}$ respectivamente, (Keer, et al., 2008).

Concentración de ADN

Si se realizan procedimientos de extracción a pequeña escala o de bajo rendimiento, el ADN podría perderse en la etapa de precipitación. La adición de glucógeno (a una concentración final de 10 $g \cdot ml^{-1}$) puede actuar como un eficiente inerte co-precipitante de bajas

concentraciones de ADN. Las columnas comerciales para concentrar ADN, como los tubos de ultrafiltración Centricon, pueden también ser usados como una alternativa a la precipitación con alcohol, (Keer, et al., 2008). Los kits comerciales dedicados a la extracción de muestras con pequeñas cantidades de ADN también están disponibles, por ejemplo, el QIAamp ADN Micro Kit, donde se optimizan las condiciones de la extracción y la formulación de la columna para bajas cantidades de ADN.

Pérdida de Pellet

Los tubos de centrifugación deben ser colocados consistentemente en una centrifuga de tal manera que la posición del pellet de ADN sea siempre conocido. De esta manera, aun cuando el pellet se vuelva translúcido y difícil de ver, el contacto con el pellet puede ser evadido.

Tabla 9. Concentración de sales recomendadas para usar en la precipitación con alcohol.

| SALES | CC. final | DESCRIPCIÓN |
|---------------------------|--------------------|--|
| Acetato de Sodio (3M.) | 0.3 M. (pH 5.2) | Generalmente usado para ADN. |
| Acetato de amonio (7.5M.) | 2.5 M. | Reduce la co-precipitación de DNTP's libres. |
| Cloruro de Sodio (5M.) | 0.1 M. | Usada para muestra contaminadas con SDS y otros detergentes. |

Fuente: (Keer , et al. 2008).

1.2.3. Determinación y cuantificación de la calidad del ADN.

Existen varias técnicas para la cuantificación del ADN, algunas depende del empleo de equipamiento costoso, como espectrofotómetros, mientras que otras menos precisas, son sencillas y baratas.

Existen dos técnicas que son utilizadas en la cuantificación del ADN para análisis moleculares, una de ellas es mediante fluorímetro o por comparación de los fragmentos en geles coloreados con bromuro de etidio.

1.2.3.1. Cuantificación mediante fluorimetría.

La cuantificación mediante fluorímetro se basa en la adición de un compuesto llamado DAPI (*4',6-diamino-2-fenilindol*) a una solución de ADN. El DAPI es un compuesto que se une a la molécula de ADN como una sonda y que emite fluorescencia al ser excitado por el haz de luz del fluorímetro. Cuanto mayor es la fluorescencia emitida, mayor es la concentración de ADN y por tanto, mayor la concentración de ADN. La concentración más elevada de la muestra de ADN patrón se utiliza para acertar la escala arbitraria del fluorímetro en la posición máxima y se utiliza disoluciones proporcionales de la misma para obtener otros puntos en la escala en la lectura del fluorímetro. Una vez obtenida una curva de calibración de valor del fluorímetro respecto a la concentración de muestra patrón de ADN se prosigue a la lectura de los valores de las muestras de ADN que se desea cuantificar. Por fin los valores obtenidos en la escala del fluorímetro son transformados en ug/ml de ADN según la curva patrón.

1.2.3.2. Cuantificación mediante espectrofotometría.

El espectrofotómetro se funda en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la

misma. Por lo tanto, para la cuantificación de material genético la absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN corresponde a 260 nm y la de las soluciones de proteínas, a 280 nm. Dado que las soluciones de ADN y ARN absorben parcialmente la luz a 280 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 260 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes A_{260}/A_{280} respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Con un paso de luz de 10 mm y una longitud de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN bicatenario, 37 $\mu\text{g/ml}$ de ADN monocatenario, 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos, (Somma, 2012).

1.2.3.3. Cuantificación y determinación de la calidad de ADN por el Nanodrop.

En la biología y química de investigación, las soluciones se han cuantificado mediante la medición del grado de absorción de la luz en una longitud de onda particular. Un valor llamado coeficiente de extinción se utiliza para calcular la concentración del compuesto. Así, en biología molecular, los laboratorios utilizan espectrofotómetros para medir las concentraciones de ADN o ARN de las muestras.

Las técnicas moleculares y otros métodos científicos continúan un rápido avance en el uso de cada vez menores para poder cuantificar ácidos nucleicos. En algunos laboratorios se cuenta con un equipo espectrofotómetro llamado Nanodrop que ha proporcionado un avance en la espectrofotometría, ya que es un espectrofotómetro de micro volumen

para medir ADN, ARN y proteínas. Este sistema de medición emplea la tensión superficial para mantener la muestra estática entre dos fibras ópticas lo que permite la medición de muestras altamente concentradas sin la necesidad de utilizar diluciones (Thermo Scientific, 2009). Para mayor información sobre el uso ver Anexo 7.

1.2.3.4. Geles coloreados con bromuro de etidio.

La técnica consiste simplemente en la utilización de una secuencia ascendente de concentraciones de solución patrón de ADN coloreadas lado a lado en el gel de agarosa, con el que se compara una muestra de ADN de concentración desconocida. La técnica presenta algunas variaciones que se basan en la electroforesis del ADN patrón y de la muestra de concentración desconocida. La técnica presenta algunas variaciones que se basan en la electroforesis del ADN patrón y de la muestra de concentración desconocida en geles de agarosa. El cálculo de las concentraciones de las bandas se hace bajo la luz ultravioleta según la fluorescencia. Esta variación es la más adecuada para la cuantificación, pues ocurre la separación del ADN y del ARN durante la electroforesis y se reduce la imprecisión del proceso de cuantificación cuando el ácido nucleico analizado presenta contaminantes que se unen al bromuro de etidio.

La visualización de los fragmentos de ADN se hace directamente en un gel de agarosa que contiene bromuro de etidio, las moléculas de estas sustancias se colocan entre las bases del ADN y producen una fluorescencia de color anaranjado bajo la luz ultravioleta, la señal emitida es proporcional a la cantidad de ADN en la muestra.

Para la determinación de la calidad del ADN se precisa la observación de bandas integras que corresponde a un ADN no degradado y en caso

contrario cuando se observa un barrido (smear), este corresponde a un ADN degradado de mala calidad, no apto para su utilización en diversas técnicas moleculares.

El cálculo de la concentración de ADN se realiza mediante la observación de la fotografía del gel en presencia de la Luz UV o de la imagen digitalizada, cuando es posible el uso de sistemas más sofisticados de integración de datos. Es de extrema importancia evitar la cuantificación por observación directa de las bandas bajo luz ultravioleta incluso con máscaras de protección (Ferreira, et al.,1998)

Una cuantificación más precisa, se realiza comparando la intensidad de la banda del ADN con la primera banda del marcador de peso molecular (ADN del fago Lambda λ cortado con enzima PstI), cuyo tamaño es de 14800 pb y su intensidad corresponde a una concentración de 280 ng/ul.

1.2.4. Protocolos de extracción comerciales

Hoy en día existe una variedad de empresas que formulan kit de extracción de ADN, los cuales en la mayoría de los casos suelen ser óptimos para la extracción de material genético y rápido, pero de un costo alto.

Uno de los kit de extracción más populares que se tiene en el mercado es DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen - Sample & Assay Technologies, 2003), este kit permite el aislamiento rápido y eficiente de ADN de alta calidad a partir de una amplia variedad de especies de plantas y tipos de tejidos incluyendo las fuentes más exigentes. Las muestras pueden ser frescas, congeladas o secas. El procedimiento optimizado DNeasy Plant incorpora la columna de centrifugación QIAshredder, una filtración de columna única y homogeneización que elimina eficazmente los desechos celulares y mejora el manejo de las muestras vegetales (Qiagen - Sample & Assay Technologies, 2003).

Cabe resaltar que a pesar de que los kit comerciales son eficientes para una gran variedad de especies, también pueden no serlo con otras especies con mayores contenidos de metabolitos secundarios (polifenoles, polisacáridos, etc.), teniendo en cuenta que plantas del mismo género pueden presentar diferencias enormes en su composición bioquímica, por lo cual que a pesar de ser eficientes estos kit aún no se dispone de un único método de extracción de ADN para todas las plantas, (Arun, et al., 2002 y BIOTED, 2012) .

1.2.5. Electroforesis.

La electroforesis es la migración de partículas cargadas a través de un soporte, las cuales están sometidas a un campo eléctrico (Frifelder, 1991), los dos principales polímeros que se utilizan para la técnica de electroforesis son la agarosa (para ADN y ARN) y la acrilamida (para Proteínas). De estas dos matrices se derivan las metodologías para la realización de la electroforesis que se utiliza en varias técnicas moleculares. (Zavala Castro, 2005)

La electroforesis del ADN se puede realizar en geles de agarosa horizontal (el más común) o verticales. El equipo que se utiliza para realizar esta técnica es diferente al que se utiliza en los geles de acrilamida, y consta de un contenedor para el buffer de corrida con los dos electrodos para la corriente eléctrica, un molde para la formación del gel y “peines” de varios grosores para formar las aberturas en donde se colocan las muestras (Zavala Castro, 2005), los geles de agarosa (de 0.8% a 2.0%) son muy útiles para separar fragmentos de ADN cuyo tamaño este comprendido en el intervalos de 300 a 10.00 pb. Tienen menor poder de resolución que geles de poliacrilamida pero tienen un mayor rango de separación (Alagón Talaverano et al., 2008).

Los geles al someterse al campo eléctrico, migran los fragmentos de ADN según su tamaño, de modo que los fragmentos grandes migran más lentamente que los fragmentos cortos, la distancia de migración es proporcional al logaritmo del número de bases, es por eso que el tamaño real de los fragmentos obtenidos

puede calcularse partiendo de la movilidad de los fragmentos de ADN de tamaño conocido.

1.2.6. Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR).

En 1984 un ingenioso método para amplificar secuencia específicas de ADN fue descubierto denominado Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) (Berg, Tymoczko et al., 2008 y Mullis, 1990), es una técnica potente que se ha convertido rápidamente en una de las más ampliamente usadas en la biología molecular porque es rápida, de bajo costo y sencilla.

La técnica de la PCR es un método de síntesis *in vitro* de un número de copias muy alto de un fragmento específico de ADN, que requiere de un molde o ADN matriz, unos iniciadores (Primers) que delimitan la zona del ADN matriz que deberá ser copiado, nucleótidos que serán adicionados a la nueva cadena y la enzima ADN Taq polimerasa que se encargara de hacer la síntesis química en presencia de iones de magnesio, el interés de esta técnica es que no importa la cantidad de sustrato, ya que si el número de ciclos de síntesis (o polimerización) es suficiente, siempre se obtendrá una cantidad de producto elevado, pues que se trata de un fenómeno de amplificación exponencial (Fonseca Mendoza, et al., 2012).

Para que la amplificación sea óptima se tiene que optimizar varias condiciones. La concentración de $MgCl_2$, en donde se recomienda utilizar diferentes concentraciones para elegir la adecuada. Se puede probar con concentraciones de 1.5 mM (Bajo), 3.0 mM (Mediano) y 4.5 mM (Alto), y de ahí escoger los rangos que produzcan la amplificación más eficiente. Es importante contar con una buena extracción de ADN para la reacción de PCR, ya que si existen contaminantes pueden inhibir la reacción de la Taq Polimerasa. La concentración de los dNTPs. No se recomienda utilizar más de 200 μ m de dNTPs por cada reacción. No se recomienda utilizar tiempos muy largos de

desnaturalización, ya que pueden dañar nuestro templado de ADN. Se debe tener presente la temperatura de alineamiento, cuando el contenido de GC sea de 50% o menor, el alineamiento puede ser hasta de 55 °C o menor y cuando el contenido de GC sea de 50% a más, el alineamiento puede ser hasta de 60 °C, es por eso que se recomienda que los primers tengan un contenido similar de GC. Los primers son utilizados en una concentración que va desde 0.25 a 0.5 μM final, (Zavala Castro, 2005).

1.2.6.1. Componentes de la PCR.

La PCR está comprendida por los siguientes componentes: muestra de ADN, un par de primers, la ADN polimerasa más conocida como *Taq* polimerasa, cloruro de magnesio, denucleótidos trifosfatos (DNTP's) y un buffer.

Muestra de ADN

La cantidad de ADN añadido a la PCR depende de la sensibilidad de la reacción, aunque la mayoría de kits comerciales requieren entre 0.5 a 2.5 ng. de ADN para obtener resultados óptimos, (Goodwin, et al., 2007).

Taq polimerasa

La primera PCR fue realizada usando una ADN polimerasa que fue aislada de *E. coli*; siendo la enzima inactivada en cada ciclo de la PCR por las altas temperaturas en la fase de denaturización y se añadía después de esta fase una nueva cantidad de enzima, lo cual a la fecha ya no es necesario porque la ADN polimerasa que se utiliza en la actualidad es aislada de una bacteria termófila (*Thermus aquaticus*), lo cual mejora significativamente la especificidad y sensibilidad, (Goodwin, et al., 2007).

Esta enzima tiene actividad a una temperatura de 72°C, está conformada por una cadena polipeptídica simple con un peso molecular de 90,000 daltons. Su aplicación principal se da en la PCR, donde es usada para extender los

primers y completar la síntesis de la nueva hebra de ADN (Mahesh, et al. 2003).

Primers

Los primers son usados en la PCR para definir la región del genoma que va ser analizada, los cuales son cortas piezas de ADN que son sintetizadas la cual hibrida con la muestra de ADN. Existen algunos requerimientos básicos para el diseño de un primer, en primer lugar debe tener un tamaño no menor de 18 nucleótidos ni mayor a 30 nucleótidos y un balance nucleotidico del número de G/C y A/T. la temperatura a la que se realiza el proceso de anillamiento depende de la longitud y la secuencia que presenta el primer, la mayoría de primers están diseñados para anillar a temperaturas que oscilan entre 50 y 65°C, (Goodwin, et al., 2007).

Cloruro de magnesio, nucleótidos trifosfatos (DNTP's) y buffer de reacción.

El cloruro de magnesio es un componente importante en la reacción de PCR, ya que los primer al unirse a la muestra de ADN forman un complejo la cual es estabilizada por el cloruro de magnesio y como cofactor de la *Taq* polimerasa. La concentraciones de cloruro de magnesio que son utilizadas oscilan entre 1.5 mM y 2.5 mM. La construcción de los bloques para la PCR está dado por los dexoxynucleotidos trifosfatos (DNTP's), los cuales son incorporados a la reacción para poder sintetizar las nuevas hebras de ADN que serán replicadas, las concentraciones normales de los cuatros nucleótidos, normalmente es de 200 μ M. Por último el buffer de reacción es usado en la reacción de PCR para mantener el pH óptimo y las condiciones salinas de la reacción, (Goodwin, et al., 2007).

1.2.6.2. Proceso de la PCR.

La amplificación del ADN ocurre en ciclos de PCR (estos ciclos de temperaturas producen copias y luego copias de copias, y así sucesivamente,

lo que lleva a un aumento exponencial del número de copias de determinada secuencia. Dado que la cantidad de ADN colocado en el tubo al comienzo es muy pequeña casi todo el producto presente al final de los ciclos de reacción pertenece a secuencias copiadas. Los productos de la reacción se separan mediante electroforesis según la cantidad producida y el tamaño del fragmento amplificado, los productos de reacción se pueden visualizar directamente con tinción de bromuro de etidio, plata, mediante radioisótopos y autorradiografía, (Alagón Talaverano et al., 2008).

A continuación se detalla cada uno de los procesos que se encuentran involucrados en la reacción de la PCR:

Desnaturalización (Denaturation)

La solución de reacción contiene moléculas de ADN blanco, Taq polimerasa, iniciadores (primers), nucleótidos (dNTPs: Adenina, Timina, Citosina y Guanina), esta solución es calentada de 90 a 95 °C durante 15 segundos, separando las dos hebras de la molécula de ADN parental (Berg, et al., 2008).

Alineación de los iniciadores (Annealing)

Seguidamente se enfría bruscamente la disolución de 36 a 65 °C, de forma que cada iniciadores (Primers) pueda hibridar con una de las hebras del ADN, un primers hibrida con el extremo 3' de la secuencia diana localizada en una de las hebras y el otro hibrida con el extremo 3' de la hebra complementaria a la secuencia diana. Estos primers tienen una longitud de entre 20 y 30 nucleótidos (Berg, et al., 2008).

Extensión y polimerización (Polimerization)

Posteriormente se calienta la solución a 72 °C, la temperatura óptima para la activación de la Taq Polimerasa. Esta polimerasa termoestable, proviene de

Thermus aquaticus, una bacteria termófila que vive en fuentes termales. La polimerasa elonga ambos primers en dirección a la secuencia diana porque la síntesis de ADN se realiza en el sentido 5' → 3'. La síntesis de ADN tiene lugar sobre las dos hebras y se extiende más allá de la secuencia diana (Berg, et al., 2008).

1.2.6.3. Aplicaciones de la PCR.

Las aplicaciones de la PCR son numerosas. Como por ejemplo, pueden citarse: clonación celular de fragmentos de ADN, detección de secuencias sin purificación previa, preparación de muestras para secuenciación de ácidos nucleicos, establecimientos de polimorfismos de secuencia, rastreo de mutaciones, tipificación de ADN para trasplantes, diagnóstico de enfermedades genéticas (incluido el diagnóstico prenatal), determinación de secuencias específicas de ADN relacionadas, detección de microorganismos infecciosos, detección de células tumorales, amplificación de ADN para su posterior clonación celular etc., (Herraéz, 2012).

1.2.7. Marcadores Moleculares.

Los marcadores moleculares o marcadores de ADN revelan sitios de variación naturales a nivel de secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores controlados por genes asociados a caracteres morfológicos (Fenotipos de fácil identificación visual), las variaciones en los marcadores de ADN no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden ser diferenciadas en un solo nucleótido del gen o en un pedazo del ADN repetitivo (Velasco Mosquera, 2005).

Los marcadores moleculares relacionados a una característica específica son de particular interés por que permiten identificar individuos que contengan esa característica y diferenciarlos de los que no la posean, es decir que dan información sobre la diversidad genética. Esto es un aspecto esencial en el

campo de la biología tanto aplica como fundamental: ecología, biología de la evolución, taxonomía, agronomía, biotecnología, microbiología, genética, etc. (Comide, 2000).

Un gran número de técnicas moleculares pueden ser utilizadas para obtener marcadores de diversidad mediante la detección de polimorfismo a nivel de ADN (Tautz, 1989). Algunos ejemplos de ellos son: polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites o secuencias repetidas (SSR), amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO), etc. (Rallo, et al. 2002).

1.2.7.1. Marcadores Moleculares microsatélites (SSR)

Los microsatélites o secuencias simple repetidas (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a 10 pares de bases) repetidas, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas azarosamente por todo el ADN. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma. Dado que la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips, et al., 1995).

Los tipos de repeticiones que ocurren en los SSR varían entre las especies. Las repeticiones más frecuentes en las plantas son (AA)_n y (AT)_n (Lagercrantz, et al., 1993). Estas repeticiones están concentradas en

secciones grandes de ADN que no codifican para genes conocidos y que se han llamado macrosatélites, por lo que probablemente no son útiles como aquellos marcadores que están distribuidos al azar (Phillips, et al., 1995). Por el contrario, Tanksley, 1993 encontró que las secuencias (GA)_n y (GT)_n y sus complementos (CT)_n y (CA)_n se presentan con más frecuencia y están aleatoriamente espaciadas en el genoma de maíz. También observaron que estos loci son altamente polimórficos entre variedades de arroz, por lo que son útiles como herramientas de mapeo y para estudios de polimorfismos intraespecíficos. Los SSR's representan un nivel adicional de información genómica que se puede usar para los estudios de mapeo y para la determinación de polimorfismos (Phillips, et al., 1995).

El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite). Aunque una vez conseguido presentan un sistema muy informativo. Al respecto Cervera 2002 menciona que aunque los microsatélites permiten analizar sólo un locus por experimento son bastante informativos ya que dejan diferenciar las variantes alélicas de los loci analizados y por lo tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y por lo tanto son menos numerosos que otros marcadores dominantes.

Estos marcadores son ideales para el estudio de ligamiento genético en plantas, el mapeo físico, los estudios poblacionales y la identificación de variedades (SIDTA, 2002).

La tecnología para el análisis de microsatélites es similar a la utilizada para el análisis de RAPD, con la adición de una evaluación y secuenciación previa para determinar los indicadores. La detección del

polimorfismo SSR se realiza mediante una PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por lo SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe, et al., 2004).

Además de su potencial polimorfo, los microsatélites reúnen una serie de características que lo han convertido en marcadores de preferencia para el mapeo génico; en primer lugar, porque son numerosos y se distribuyen ampliamente a lo largo de todo el genoma, particularmente en peces se ha estimado que su frecuencia es de 1 cada 10Kb; segundo, se heredan de modo mendeliano como marcadores codominantes, lo que facilita el seguimiento de su transmisión dentro de las poblaciones de mapeo; tercero, son abundantes en todos los genomas eucariotas estudiados hasta la fecha; cuarto, la mayoría de los loci microsatélite tienen un tamaño relativamente pequeño que facilita su caracterización vía PCR; quinto, son potencialmente transferibles entre linajes y/o especies próximas, especialmente cuando el locus microsatélite se encuentra dentro de un secuencia génica. (González Fortes, 2009).

1.2.7.1.1. Ventajas e inconvenientes de los microsatelites (SSR)

Las ventajas que ofrecen los microsatélites se deben en parte a la posibilidad de la amplificación por PCR, ya que el tejido que se utiliza no necesita ser de mucha calidad, e incluso ADN en estado avanzado de degradación es suficiente para ser analizado. En este caso aventaja a otras que también utilizan ADN nuclear, como son RFLP o los RAPD's. Los microsatélites son marcadores apropiados para el estudio de genética de poblaciones en especies en peligro de extinción porque se puede amplificar a partir de cualquier muestra biología como pelos, heces, huesos, etc., (Höss, et al. 1993) plumas, muestras de herbarios, etc. de esta forma es posible analizar el área de

distribución, movimiento y estructura social de las poblaciones sin tener que tomar contacto directo con los individuos, (Ernest, et al., 2000). Además puede utilizarse con muestras conservadas en museos, colecciones privadas, etc., de muchos años de antigüedad. Asimismo, puesto que es posible amplificar pequeñas cantidades, se puede ampliar el campo de aplicación a especies de muy pequeño tamaño, como insectos, etc.

Además de los métodos clásicos de análisis de genética de poblaciones basados en frecuencia alélicas y obtención de distancias genéticas, hoy día se empieza a aplicar diversos métodos para el análisis estadístico de microsatélites, como máxima verosimilitud, coalescencia y estadística bayesiana, (Whittaker, et al., 2003).

En cuanto a los inconvenientes, uno de ellos es que en muchos casos resulta necesario aislar y caracterizar marcadores específicos para la especie objeto de estudio, lo que supone un elevado esfuerzo en términos de tiempo y recursos económicos. Esto puede resultar un inconveniente añadido para ciertos grupos de organismos en los cuales su aislamiento y obtención resulta muy difícil técnicamente, o bien porque los microsatélites aislados para un grupo sean inadecuados para grupos próximos, (Garner, 2002). Sin embargo, en algunos casos los cebadores desarrollados para una especie se pueden utilizar en taxones cercanos sin tener que aislarlos específicamente para cada especie.

La utilización de los cebadores de una especie para amplificar por PCR microsatélites en especies cercanas, tiene como principal inconveniente la aparición de alelos nulos, debido a sustituciones, deleciones e inserciones en las secuencias que corresponden a los sitios de unión de los cebadores específicos. Estos pueden implicar la

asignación errónea de individuos heterocigóticos como homocigóticos, y puede suponer a la larga la acumulación de grandes errores en los análisis de datos si los alelos nulos son abundantes.

1.2.7.1.2. Aplicaciones de los Marcadores Moleculares microsatélites (SSR) en plantas.

Los microsatélites (SSR) son muy utilizados en estudios moleculares en plantas a continuación se describe diferentes tipos de aplicaciones moleculares:

Cuellos de botella

Los cuellos de botella pueden explicar en muchos casos la existencia de niveles bajos de variabilidad genética en poblaciones naturales, debido a la fragmentación del hábitat y aislamiento.

En muchas ocasiones resulta difícil cuantificar el flujo génico entre grupos de poblaciones y, por tanto, detectar este tipo de procesos de aislamiento efectivo. Por ello, es importante tomar como referencia muestras de poblaciones que no hayan padecido reducciones en su tamaño, o bien de individuos antes de sufrir en cuello de botella. En estos casos. Los microsatélites son uno de los marcadores más apropiados y siendo de gran utilización para análisis de variabilidad genética de especies animales, plantas, etc.

Hibridación intraespecífica e introgresión entre especies

Numerosos son los trabajos en los que se ha utilizado la información proveniente de microsatélites combinada con la información proveniente de ADN mitocondrial (ADNmt), para la detección de introgresiones e hibridaciones entre especies (Rüber, et al., 2001).

Asignación de individuos a poblaciones, análisis de paternidad

Estos marcadores moleculares son muy útiles, y en general los marcadores ideales, por su elevado grado de polimorfismo, facilidad de análisis y fiabilidad en la determinación de los alelos. Es el caso de la asignación de un individuo a un probable grupo de origen, lo que permite analizar estructuras intrapoblacionales (Rüber, et al., 2001), parentescos y análisis de paternidad (Paxton, et al. 2002).





CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOS.

3.1. CAMPO DE VERIFICACIÓN

3.1.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Subdirección de recursos genéticos y biotecnología (SUDIRGEB) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) en la ciudad de Lima.

3.1.2. Ubicación espacial

El Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) se encuentra ubicado en la Avenida La Molina # 1981, en la ciudad de Lima.

3.1.3. Unidades de estudio

Cada especie del género *Oenothera* (*Onoethera rosea*, *Oenothera multicaulis* y *Oenothera Tetraptera*), se convierten en una unidad de estudio. Con cada unidad de estudio se realizó pruebas para cada una de las técnicas de extracción de ADN y amplificación PCR para ser evaluados.

3.2. MATERIALES

3.2.1 Material biológico

Se recolectaron 4 muestras de cada especie de *Oenothera* evaluadas, en el caso de *Oenothera rosea* fue recolectada en la comunidad de Calca con coordenadas de 13°19'24.64"S y 71°57'42.51"O con una altitud de 2985 m.s.n.m., *Oenothera multicaulis* fue recolectada en la comunidad campesina de Wilky con

coordenadas de 13°25'54.53"S y 72°21'2.01"W con una altitud de 3906 m.s.n.m. y *Oenothera tetráptera* fue recolectada en la comunidad campesinas de Miraflores provincia de Apurímac con coordenadas de 13°32'30.80"S y 72°44'29.23"W con una altitud de 3080 m.s.n.m.

3.2.2 Material de laboratorio

3.2.2.1 Materiales para la colecta

Placa Petri, Bolsas Ziploc (sello hermético), Bolsas de papel, Cooler, Guantes de goma, Papel toalla, Tijeras, Silica gel, Lapicero tinta indeleble, Alcohol 96°, Cinta para rótulos, Cámara fotográfica y Garmin eTrex GPS.

3.2.2.2 Material para la extracción de ADN

3.2.2.2.1. Reactivos químicos

Ácido acético glacial (Merck), Agua bi-distilada, Agua destilada, Alcohol isoamilico (Merck), Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB), (Sigma), B-mercaptoetanol, (Sigma), Cloroformo (Merck), EDTA (Ácido etilen diamino tetra – acético), (Sigma), Etanol absoluto 70° y 96° , (Merck), Isopropanol, (Merck), RNase, (Sigma), PVP (polivinilpirrolidona), (Sigma), Tris (Tris[hidroxymethyl] amino ethan), (Merck) y Ácido Clorhídrico, (Merck), Agua libre de nucleasas, (Merck).

3.2.2.2.2. Material de laboratorio

Agitadores magnéticos, Espátulas, pinzas, tijeras, Gradillas y soportes para tubos, Guantes de vinilo (Quest), Contenedor de Nitrógeno Líquido, Tubo de 1,5 y 2 ml (Eppendorf y Axygen), Juego de micropipetas (Eppendorf y Rainin), Magnetos, Matraces Erlenmeyer, (Pyrex®), Probetas de 10, 100, 1000 ml (Pyrex®), Vasos precipitados “Beakers”, (Pyrex®), Bolsas de polipropileno, Puntas plásticas de 10, 200 y 1000 µl. (Axygen), Puntas cortadas 200 µl. (Axygen), Racks Polypropylne, (Axygen, Eppendorf) y Tubos eppendorf de 1.7, 2 ml, (Eppendorf).

3.2.2.2.3. Equipos

Autoclave, Balanza analítica (Sartorius, modelo CPA2245), Baño maría (Cimatec S.A.), Cámara extractora, Cámara de flujo laminar (ESCO), Centrifuga refrigerada (Hettich, modelo mikro 22R), Refrigeradora (Electrolux), Congeladora a -80°C (Glacier, modelo NU-9668), Estufa (Conterm), Hot plate, Potenciometro de mesa (Hanna, modelo HI255) , Vortex (Genie 2T y Wizard), Mili-Q (EasyPure® Water Filtration System) y Savant ADN Speedvac Concentrator (Thermo Scientific – USA).

3.2.2.3 Material para la electroforesis y cuantificación

3.2.2.3.1. Reactivos químicos

Agarosa (Sigma), Agua destilada, Azul de Bromofenol, (Sigma), Bromuro de Etidio, (Sigma), Marcadores de Peso Molecular (100 pb y 1000 pb.) y ADN del Fago Lambda λ Pst (CIP).

3.2.2.3.2 Material de laboratorio

Cajas de dilución, Gradillas y soportes para tubos, Papel Tissue, (Kimwipe®), Racks de polipropileno, Matraz Erlenmeyer (Pyrex®), Juego de micropipetas, puntas de 10 ul. (Axygen).

3.2.2.3.3 Equipos

Fotodocumentador (Biorad, modelo Chemidoc XRS), Expositor de luz UV Transsiluminador, Microondas y Cámara de electroforesis (Biorad), Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), Mili-Q (EasyPure® Water Filtration System).

3.2.2.4 Material para PCR

3.2.2.4.1. Reactivos químicos

Agua libre de nucleasas, (Merck), Alcohol 96°, Cloruro de Magnesio (Merck), dNTPs (invitrogen), Hot Start Taq Polimerasa (invitrogen) y Primers, Solución tampón 10X-PCR Buffer (invitrogen).

3.2.2.4.2 Material de laboratorio

Juego de micropipetas (Eppendorf), Placas de policarbonato PCR de 96 pocillos, Puntas para micropipetas de 0.5, 100 y 1000 µl., (Eppendorf y Axxygen), Tapa de placas de PCR de 96 pocillos,

(Axygen), Tubos en tiras y tapas en tiras para PCR, (Axygen) y Tubos Strips 0.2 ml para PCR, (Axygen).

3.2.2.4.3 Equipos

Minispin Plus (Eppendorf), Termociclador (MJ Research, modelo PTC-200) y PCR Mastercycler proS (Eppendorf).

3.2.3 Software

Statgraphics Centurium XV (StatPoint, 2010), Quantity One 1-D Analysis Software (Biorad, 2011), Nanodrop 2000 software (Thermo Scientific, 2009) y Microsoft Office 2010 (Microsoft, 2010).

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental elaborado para este proyecto de investigación se muestra en las Figura 5.

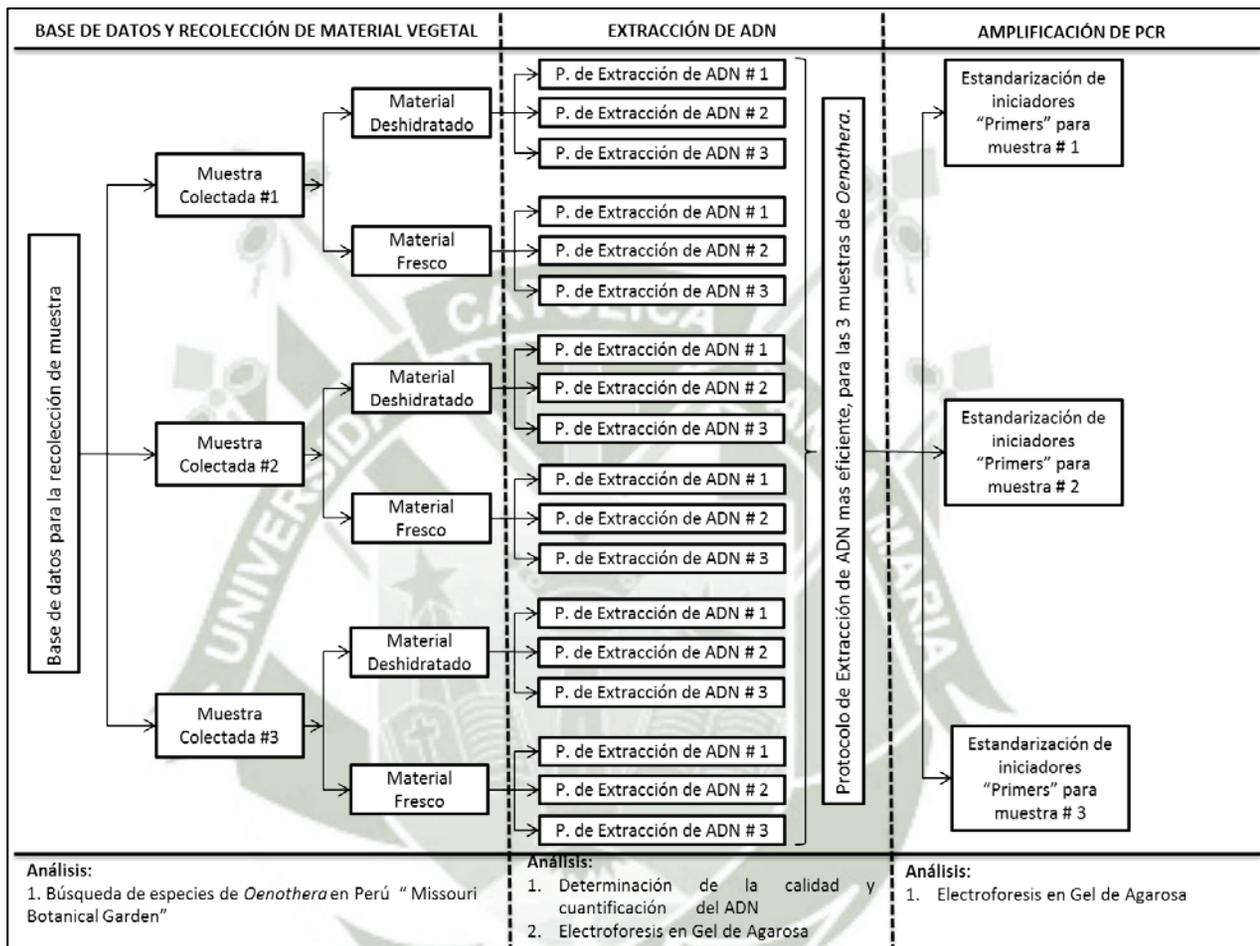


Figura 8. Diagrama de Flujo correspondiente al diseño experimental para extracción de ADN de tres especies de *Oenothera*.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.4.1 Recolección de las muestras.

Fundamento:

La mayoría de las actividades relacionadas con el estudio de las plantas requieren su identificación, es por ello que la recolección de muestras es el proceso por el cual se colecta el material vegetal en estudio para poder en primer lugar realizar el proceso de identificación en un herbario asegurando el almacenamiento adecuado de algunos especímenes para futuras investigaciones y el posterior uso de las demás muestras para la investigación a realizar (Estrada Sánchez, 2005).

Procedimiento:

Se recopiló información de todas las especies de *Oenothera* que existen en el Perú, usando para ellos la información de TROPICOS del “*Missouri Botanical Garden*” (Missouri Botanical Garden, 2013), la cual se realizó tomando diferentes variables (especie, ubicación, año de recolección y altitud), del mismo modo se identificó las especies que poseen cualidades medicinales. Obtenidos estos resultados se procedió a ubicar las especies de *Oenothera* seleccionadas y proceder a su respectiva recolección.

Como se sabe que la cantidad y calidad de ADN son afectadas por la condición del tejido antes de la extracción, siendo importante la recolección adecuada del material vegetal, para lo cual se realizó la recolección de las muestras usando dos métodos de conservación. Del mismo modo se tomaron muestras para realizar la verificación morfológica de cada una de las tres especies de *Oenothera* e ingresarlas a la base de datos del Herbarium Arequipensis – Husa de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa.

3.4.1.1. Técnica de conservación con Silica Gel.

Fundamento:

Esta técnica consiste en la utilización de la Silica Gel que es un desecante que al absorber la humedad en un espacio cerrado (generalmente una bolsa de plástico con cierre “zip-lock” o un frasco de vidrio o plástico con tapa de rosca), deshidrata los tejidos vegetales con relativa rapidez, evitando la oxidación de los tejidos y la degradación catalítica del ADN (Escalante, 2010).

Procedimiento:

Se recolectó hojas jóvenes de las especies seleccionadas de *Oenothera*, las cuales fueron cortadas por una tijera desinfectada con alcohol, en seguida las muestras fueron colocadas en una placa petri y fueron desinfectadas con alcohol para tener un material limpio, luego fue colocado el material vegetal en sobre de papel toalla (4 hojas por sobre), a continuación se colocó cada uno de los sobres en una bolsa ziploc con cierre hermético, en seguida se agregó una cantidad considerable de silica gel (Aproximadamente 10 gr) a la bolsa ziploc, luego se colocó la bolsa cerrada en otra bolsa ziploc para asegurar la hermeticidad y se rotulo la muestra indicando lugar de ubicación, altitud, coordenadas GPS y especie, por último se colocó la muestra en un cooler manteniendo las muestra a una temperatura de -20°C . Todo los detalles de este procedimiento estan especificados en el Anexo 2 Figura 25.

3.4.1.2. Técnica de conservación en fresco.

Fundamento:

La técnica de conservación en fresco consiste en la conservación del material vegetal recolectado a bajas temperaturas (-70°C a -80°C) evitando de este modo la descomposición de las muestras, ya que la congelación de los tejidos es una manera rápida de endurecerlos sin necesidad de inclusión, por lo que la preservación molecular es máxima (Morris et al., 2003).

Procedimiento:

Se recolectó hojas jóvenes de las especies seleccionadas de *Oenothera*, las cuales fueron cortadas por una tijera desinfectadas con alcohol, en seguida las muestras fueron colocadas en una placa petri y fueron desinfectadas con agua destilada para tener un material estéril, luego se colocó las muestras vegetales estériles dentro de una bolsa de papel y fue cerrado, seguidamente se rotulo la bolsa de papel indicando lugar de ubicación, altitud, coordenadas GPS y especie, por último se colocó las muestras en un cooler y se conservó a -20°C y luego a -80°C . Todo los detalles de este procedimiento estan especificados en el Anexo 2 Figura 26.

3.4.1.3. Recolección de muestras para herbario.

Fundamento:

La mayoría de las actividades relacionadas con el estudio de las plantas requieren su identificación, es por eso, que la recolección de muestras para herbario es un paso fundamental para el inicio de investigaciones en cualquier especie vegetal.

Procedimiento:

Se seleccionaron plántulas enteras las cuales fueron limpiadas y colocadas en una cartulina y fueron forradas en periódico, seguidamente se rotularon indicando lugar de ubicación, altitud, coordenadas GPS y especie, y fueron transportadas al herbario para ser identificadas y registradas.

3.4.2 Extracción de ADN.

Fundamento:

La extracción de ADN es el primer paso para la realización de estudios moleculares en cualquier especie animal, vegetal, etc. (Tan et al., 2009). Este procedimiento consiste en la extracción y purificación del ADN genómico, para lo cual se realiza la rotura de la membrana celular y nuclear de cada célula seguido de la protección del ADN con agentes químicos que impiden la interacción del ADN con enzimas y otros compuesto; y su posterior purificación con ayuda de solventes.

Procedimiento:

Se realizaron diferentes pruebas que fueron diseñados siguiendo la estructura de las técnicas de Doyle & Doyle, (Doyle et al., 1987; Doyle & Doyle, 1987; Doyle & Doyle, 1990; Aaron, et al., 1990; Doyle, 1991; Porebski, et al., 1997; Zhang et al., 2000; Keb-Ilanes, et al., 2002; Sharma, et al., 2002; Li, Su et al., 2002; Michiels, et al., 2003; Alaey, et al., 2005; Keizman, et al., 2006; Narayanan, et al., 2006; Deshmukh, et al., 2007; Matasyoh, et al., 2008; Shankar, et al., 2011; Saeid, 2011; Gurudeeban, et al., 2011; Borse, et al., 2011; Nakum, et al., 2011; Tiwari, et al., 2012 y Kazemi, et al., 2012.).

Con lo cual se obtuvo tres técnicas de extracción y se usó DNeasy Plant mini Kit - QIAGEN (Qiagen - Sample & Assay Technologies, 2003) como control

comercial, los cuales fueron probados en las muestras de *Oenothera*, repitiendo el ensayo dos veces para cada tipo de recolección y muestra vegetal.

Protocolo de extracción comercial DNeasy Plant mini Kit.

Fundamento:

DNeasy Plant es un kit que permite el aislamiento rápido y eficiente de ADN de alta calidad a partir de una amplia variedad de especies de plantas y tipos de tejidos incluyendo las fuentes más exigentes. Las muestras pueden ser frescas, congeladas o secas. El procedimiento optimizado DNeasy Plant incorpora la columna de centrifugación QIAshredder, una filtración de columna única y homogeneización que elimina eficazmente los desechos celulares y mejora el manejo de las muestras vegetales (Qiagen - Sample & Assay Technologies, 2003).

Procedimiento:

Se procedió a realizar la extracción con el protocolo de extracción comercial DNeasy Plant como medio de control para el material vegetal de *Oenothera*.

Para lo cual se trituró aproximadamente entre 150 a 300 mg. de hojas jóvenes de cada una de las tres variedades de *Oenothera* con nitrógeno líquido hasta obtener un pulverizado homogéneo, inmediatamente se colocó el material vegetal en un eppendorf de 1,5 ml al cual se añadió 400 ul. de buffer AP1 precalentado a 65°C en baño maría y 4 ul. de RNasa, seguidamente se mezcló vigorosamente por 20 segundos en el vortex y se incubó a 65°C en el baño maría por 10 minutos agitando 3 veces durante la incubación, finalizando la incubación se procedió añadir 130 ul. de buffer AP2 al lisado mezclándolo e incubando en hielo por 10 minutos, después se centrifugó a 5000 rpm. por 5 minutos a temperatura ambiente, en seguida se decantó el sobrenadante colocándolo en un columna QIAshredder maxi (lilac) y se centrifugó a 15000 rpm. por 5 minutos a temperatura ambiente, seguidamente al material recepcionado en el nuevo

ependorf se le añadió 1.5 volúmenes de buffer AP3/E y se mezcló vigorosamente por 20 segundos en el vortex, a continuación se colocó la muestra en una columna DNeasy maxi spin column y se centrifugó a 6000 rpm. por 1 minutos descartando el líquido obtenido, inmediatamente se transfiere la columna DNeasy maxi a un tubo de eppendorf de 1.5 ml se pipeteó 500 ul. de buffer AW (precalentado a 65°C) y se centrifugo a 15000 rpm. por 1 min., se colocó la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml. y se agregó 100 ul. de AE precalentado a 65°C, dejar reposar por 5 minutos y por último se centrifugó por 1 minuto a 6000 rpm. a temperatura ambiente obteniendo en el eluente el ADN aislado. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 3 Figura 27.

Técnica de extracción 1

Fundamento:

La técnica de extracción 1 es una técnica de extracción de ADN estándar utilizada en muchos laboratorios, similar a la utilizada por Doyle & Doyle 1990, cabe indicar que esta técnica fue y es utilizada en la actualidad en el laboratorio de biología molecular del INIA para la ejecución de trabajos moleculares en plantas como *Musa* (plátano), *Solanum tuberosum* (papa) entre otros.

Procedimiento:

Se molió 150-300 mg. del tejido vegetal con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvillo homogenizado, inmediatamente esta pasta fue transferida a un eppendorf de 2 ml y se agregó 1000 ul. de buffer CTAB 2X precalentado a 55°C, seguidamente se incubó el extracto por 15 minutos a 55°C en baño maría mezclando 3 veces en el proceso, finalizando la incubación se centrifugo a 12000 rpm. por 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se traspasó el sobrenadante a un epenfort nuevo de 2 ml añadiendo 250 ul. de cloroformo : alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inmersión, seguidamente se centrifugo

a 13000 rpm. por 10 minutos a temperatura ambiente, en seguida se retiró la fase acuosa del extracto con puntas anchas y se colocó en un eppendorf nuevo donde se agregó 500 ul. de isopropanol, después se realizó una mezcla suave por inmersión (el ADN puede ser visto como un precipitado) y se dejó 1 hora a -20°C, finalizado el proceso de refrigeración se centrifugó a 13000 rpm. por un minuto a temperatura ambiente formando un pellet en la parte inferior del eppendorf y se eliminó el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar el pellet, en seguida se colocaron las muestras en el concentrador por 3 minutos, terminado el proceso de secado se agregó 1000 ul de alcohol absoluto mezclando suavemente por inmersión, después se eliminó el alcohol y se colocaron las muestras en el concentrador por 3 minutos, seguidamente se agregó 50 ul de agua libre de ADNsa (Qiagen) y se mezcló hasta que el pellet se haya disuelto totalmente, posteriormente se agregó 2 ul. de RNAsa (Invitrogen) y se incubó a 65°C por 20 minutos y por último se almacenó a 4 °C. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 4.

Técnica de extracción 2

Fundamento:

La Técnica de extracción 2, es una técnica de extracción que contiene los principios mencionados por Doyle & Doyle 2008, con la diferencia que es una técnica más robusta con una concentración de CTAB 3X, proteinasa K, otros reactivos que ayudaran a la extracción del ADN genómico y teniendo como beneficio que no usa nitrógeno líquido para la trituración del material vegetal.

Procedimiento:

Se molió 150-300 mg. del tejido vegetal los cuales fueron triturados dentro de una bolsa de polipropileno con ayuda de un tubo de ensayo agregando 1000 ul. de buffer CTAB 3X precalentado a 70°C, 4ul. de proteinasa K y 5.70 ul. de β -mercaptoetanol hasta obtener un extracto homogenizado, en seguida se transfirió

el extracto a un eppendorf de 2ml y se incubó el extracto por 30 minutos a 70°C en baño maría mezclando 3 veces en el proceso, finalizada la incubación se centrifugó a 13000 rpm. por 10 minutos a temperatura ambiente, a continuación se traspasó el sobrenadante a un eppendorf nuevo de 2 ml añadiendo 1000 ul. de cloroformo : alcohol isoamilico (24:1) y 50 ul de acetato de amonio 5M mezclando por inmersión, seguidamente se centrifugo a 13000 rpm. por 10 minutos a temperatura ambiente, en seguida se retiró la fase acuosa del extracto con puntas anchas, colocando 0.6 volúmenes de isopropanol y 300 ul. de NaCl 5M, después se realizó una mezcla suave por inmersión (el ADN puede ser visto como un precipitado) y se dejó 30 minutos a -20°C y 10 minutos a -80°C, pasado el tiempo de refrigeración se centrifugó a 13000 rpm. por 15 minutos a 4°C formando un pellet en la parte inferior del eppendorf, en seguida se retiró el sobrenadante y se colocaron las muestras en el concentrador por 3 minutos, terminado el proceso de secado se agregó 1000 ul de alcohol al 80% mezclando suavemente por inmersión y se centrifugó a 13000 rpm. por 5 minutos, seguidamente se eliminó el sobrenadante y se agregó 1000 ul de alcohol absoluto, se mezcló por inmersión y se centrifugo a 1300 rpm. por 5 minutos, acabo el proceso de centrifugación se eliminó el sobrenadante y se colocaron las muestras en el concentrador por 7 minutos, seguidamente se agregó 50 ul. de agua libre de ADNsa (Qiagen) y se mezcló hasta que el pellet se haya disuelto totalmente, posteriormente se agregó 2 ul. de RNAsa (Invitrogen) y se incubó a 65°C por 60 minutos y por último se almacenó a 4 °C. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 5.

Técnica de extracción 3

Fundamento:

La Técnica de extracción 3 es una técnica de extracción que contiene los principios mencionados de Doyle & Doyle 2008, con la diferencia que esta técnica de extracción cuenta con la adición de dos concentraciones de CTAB

(2X y 10X), la reducción significativa de la cantidad de agentes químicos y la trituración del material vegetal sin uso de nitrógeno líquido lo que la hace una técnica extracción innovadora y rentable.

Procedimiento:

Se molió 150-300 mg. del tejido vegetal los cuales fueron triturados dentro de una bolsa de polipropileno con ayuda de un tubo de ensayo agregando 800 ul. de buffer CTAB 2X precalentado a 60°C y 3.4 ul. de β -mercaptoetanol hasta obtener un extracto homogenizado, en seguida se transfirió el extracto a un eppendorf de 2ml y se incubó el extracto por 40 minutos a 60°C en baño maría mezclando 3 veces en el proceso, finalizada la incubación se centrifugo a 13000 rpm. por 10 minutos a 4°C, a continuación se traspasó el sobrenadante a un eppendorf nuevo de 2 ml añadiendo 50 ul. de acetato de amonio 3M, 60 ul. de CTAB 10X y 400 ul. de cloroformo : alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inmersión, seguidamente se centrifugo a 13000 rpm. por 8 minutos a 4°C, en seguida se retiró la fase acuosa del extracto con puntas anchas, colocando 2/3 de volúmenes de isopropanol y 50 ul. de NaCl 5M, después se realizó una mezcla suave por inmersión (el ADN puede ser visto como un precipitado) y se dejó 1 hora a -20°C y 15 minutos a -80°C, pasado el tiempo de refrigeración se centrifugó a 13000 rpm. por 20 minutos a 4°C formando un pellet en la parte inferior del eppendorf, en seguida se retiró el sobrenadante y se colocaron las muestras en el concentrador por 3 minutos, terminado el proceso de secado se agregó 700 ul. de alcohol al 70% mezclando suavemente por inmersión, después se centrifugó a 12000 rpm. por 5 minutos a 4°C, seguidamente se agregó 700 ul. de alcohol absoluto, se mezcló por inmersión y centrifugo a 12000 rpm. por 5 minutos a 4°C, acabo el proceso de centrifugación se colocaron las muestras en el concentrador por 5 minutos, seguidamente se agregó 50 ul. de agua libre de ADNsa (Qiagen) y se mezcló hasta que el pellet se haya disuelto totalmente, posteriormente se agregó 2 ul. de RNAsa (Sigma) y se incubó a 65°C por 60

minutos y por último se almacenó a 4 °C. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 6.

3.4.3 Evaluación de la concentración, pureza y calidad del ADN genómico aislado.

3.4.3.1. Determinación de la pureza y concentración del ADN genómico por espectrofotometría.

Fundamento:

La espectrofotometría se fundamenta en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. Por lo cual el ADN puede cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir midiendo la absorbancia de luz ultravioleta y al mismo tiempo obtener resultados de absorbancia para determinar los parámetros de pureza respectivos ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) (Somma, 2012).

Procedimiento:

Las muestras fueron analizadas por un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 2009), para lo cual se usó 1 ul. de cada una de las muestras para analizar la concentración y la calidad del material vegetal. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 7 Figura 31.

3.4.3.2. Determinación visual de la pureza y concentración del ADN genómico por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Fundamento:

La concentración y calidad del ADN puede ser verificada mediante la electroforesis en geles de agarosa que consiste en la separación de molecular (ácidos nucleicos) a través de la matriz tamponeada (agarosa). Esta matriz

funciona como un filtro separando las moléculas de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen (Posso Duque et al., 2008). Finalmente corridas las muestras con un Fago Lambda se puede determinar la concentración del ADN obtenido con programas especializados.

Procedimiento:

La calidad del ADN obtenido se analizó en forma visual por corridas de las muestras en geles de agarosa al 1%. Para lo cual se preparó previamente una dilución de 2 ul. de ADN de las muestras de *Oenothera* con 8 ul. de tampón de carga (loading buffer dye) en placas de policarbonato; las cuales fueron cargadas en el gel de agarosa como también un fago Lambda 1X, seguidamente las muestras fueron corridas a 80 V. por 5 minutos y 120 V. hasta completar la corrida de las muestras, por último el gel de agarosa fueron llevadas al chemidoc XRS de BIORAD para ser analizadas. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 7 Figura 32.

3.4.3.3. Validación de la calidad del ADN genómico por amplificación por PCR.

Fundamento:

La calidad del ADN genómico es un paso importante para determinar una buena técnica de extracción, este proceso se realiza por medio de una amplificación por PCR para asegurar por medio del amplificado que la muestra de ADN está libre de contaminantes que inhiben este proceso (Pandey et al., 1996).

Procedimiento:

Se determinó la validación de la calidad del ADN obtenido a partir de cada método de extracción, realizando la amplificación con el par de primers

Oenbi2tri2 construidos por Larson, et al. (2008). Todos los detalles de la secuencia se pueden ver en la Tabla 10.

Dilución del ADN

Se realizó en primer lugar la dilución de las muestras a una concentración de 10 ug./ul.

Reacción de amplificación

Se procedió a realizar la amplificación teniendo una mezcla de 10 ul. de reacción de PCR para cada muestra, la muestra estuvo compuesta por un 1 ul. de PCR buffer (Invitrogen), 2.0 mM. de MgCl₂, 0.2 mM. de DNTP's (Invitrogen), 0.2 uM. de primer (F), 0.2 uM. de primer ®, 0.25 U. de hot start Taq Polimerasa (Invitrogen) y 50 ug. de ADN genómico. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 8.

Programa de amplificación en gradiente

Se realizo una amplificación en gradiente para poder determinar la Ta (Temperatura de anillamiento) adecuada para la reacción de PCR.

Para lo cual se inició con 95°C por 5 minutos como preactivación de la hot start Taq Polimerasa (Invitrogen), seguido de 35 ciclos de 95°C por un minuto, gradiente entre 48°C y 64°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido de un único ciclo de 72°C por 12 minutos, la reacción de PCR fue realizada en el termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.).

Programa de amplificación

Determinada la Ta más adecuada para el par de primers microsatélites (SSR), se procedió a realizar la amplificación de las muestras de *Oenothera*.

Para lo cual se inició con 95°C por 5 minutos como preactivación de la hot start Taq Polimerasa (Invitrogen), seguido de 35 ciclos de 95°C por 1

minuto, temperatura determinada en la amplificación en gradiente por 1 minuto y 72°C por un minuto, seguido de un único ciclo de 72°C por 12 minutos, la reacción de PCR fue realizada en el termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.).

Visualización de amplificados

El amplificado fue analizado en geles de agarosa al 2%. Para la preparación de los geles de agarosa, en primer lugar se preparó una solución stock de buffer TBE 10X (Tabla 19), en seguida se realizó la dilución del buffer TBE 10X a un buffer TBE 1X, seguidamente se pesó 1.4 gr de agarosa los cuales fueron agregados a 70 ml. de buffer TBE 1X, el cual es colocado en el microondas por 1.5 minutos hasta ver la solución completamente transparente y se espera que la solución enfríe un poco, en seguida se agregó 1.5 ul. de bromuro de etidio y se procedió a añadir el buffer en el molde hasta llenarlo completamente colocando el peine para formar los pozos de carga

Se preparó el material genético, para lo cual se tomó 5 ul. del amplificado los cuales fueron diluidos en un placa de policarbonato con 2 ul. de loading buffer 10X. Las muestras fueron cargadas en los pozos de carga del gel de agarosa y en los pocillos extremos se colocó ADN ladder de 1Kb.

Luego se realizó la corrida electroforética a 80 V. por 5 minutos y 130 V. por 30 a 40 minutos, luego de la corrida electroforética se colocó el gel al fotodocumentador Chemidoc (Biorad) y se capturaron las imágenes para ser evaluadas.

3.4.4 Estandarización de primers microsatélites (SSR).

Fundamento:

La estandarización de marcadores moleculares como los son los microsatelites (SSR) es el proceso por el cual se realiza la amplificación de las muestras de ADN con los pares de primers, identificando de este modo el mix de PCR más adecuado, la programación del amplificado y una Ta adecuada. El cual es un paso fundamental para poder trabajar con marcadores moleculares que aportaran a futuros estudios de origen y evolución mediante análisis filogenéticos, filogeográficos, entre otros (Llerena, et al., 2013).

Procedimiento:

Se trabajaron con los 9 pares de primers microsatélites (SSR) estandarizados para *Oenothera Biennis* por Larson, et al. (2008). Todos los detalles de la secuencia se pueden ver en la Tabla 10.

Dilución del ADN

Se realizó la dilución de las muestras a una concentración de 10 ug./ul.

Reacción de PCR

Para la reacción de PCR se usó la metodología usada por Larson, et al. (2008). Se procedió a realizar la amplificación teniendo una mezcla de 10 ul. de reacción de PCR para cada muestra, la muestra estuvo compuesta por un 1 ul. de PCR buffer (Invitrogen), 2.0 mM. de MgCl₂, 0.2 mM. de DNTP's (Invitrogen), 0.2 uM. de primer (F), 0.2 uM. de primer @, 0.25 U. de hot start Taq Polimerasa (Invitrogen) y 50 ug. de ADN genómico. Todos los detalles de este procedimiento están especificados en el Anexo 8.

Programa de amplificación en gradiente

Se realizó la amplificación en gradiente para cada uno de los primers con la finalidad de poder determinar la Ta más adecuada para realizar trabajos moleculares.

Para lo cual se usó una temperatura de 95°C por 5 minutos como preactivación de la hot start Taq Polimerasa (Invitrogen), seguido de 35 ciclos en gradiente de entre 48°C y 64°C por 50 segundos, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido de un único ciclo de 72°C por 12 minutos, la reacción de PCR fue realizada en el termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.).

Programa de amplificación

Determinada la Ta más adecuada para cada par de primers microsátélites (SSR), se procedió a realizar la amplificación de las muestras de *Oenothera*.

Para lo cual se inició con 95°C por 5 minutos como preactivación de la hot start Taq Polimerasa (Invitrogen), seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, temperatura determinada en la amplificación en gradiente por 1 minuto y 72°C por un minuto, seguido de un único ciclo de 72°C por 12 minutos, la reacción de PCR fue realizada en el termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.).

Visualización de amplificadas

El amplificado fue analizado en geles de agarosa al 2%. Para la preparación de los geles de agarosa, en primer lugar se preparó una solución stock de buffer TBE 10X (Tabla 23), en seguida se realizó la dilución del buffer TBE 10X a un buffer TBE 1X, seguidamente se pesó 1.4 gr de agarosa los cuales fueron agregados a 70 ml. de buffer TBE 1X, el cual es colocado en el microondas por 1.5 minutos hasta ver la solución completamente transparente y se espera que la solución enfríe un poco, en seguida se agregó 1.5 ul. de bromuro de etidio y se

procedió a añadir el buffer en el molden hasta llenarlo completamente colocando el peine para formar los pozos de carga

En seguida se preparó el material genético, para lo cual se tomó 5 ul. del amplificado los cuales fueron diluidos en un placa de poliacrilamida con 2 ul. de loading buffer 10X. Las muestras fueron cargadas en los pozos de carga del gel de agarosa y en los pocillos extremos se colocó ADN ladder de 1Kb.

En seguida se realizó la corrida electroforética a 80 V. por 5 minutos y 130 V. por 30 a 40 minutos, luego de la corrida electroforética se colocó el gel al fotodocumentador Chemidoc (Biorad) y se capturaron las imágenes para ser evaluadas.

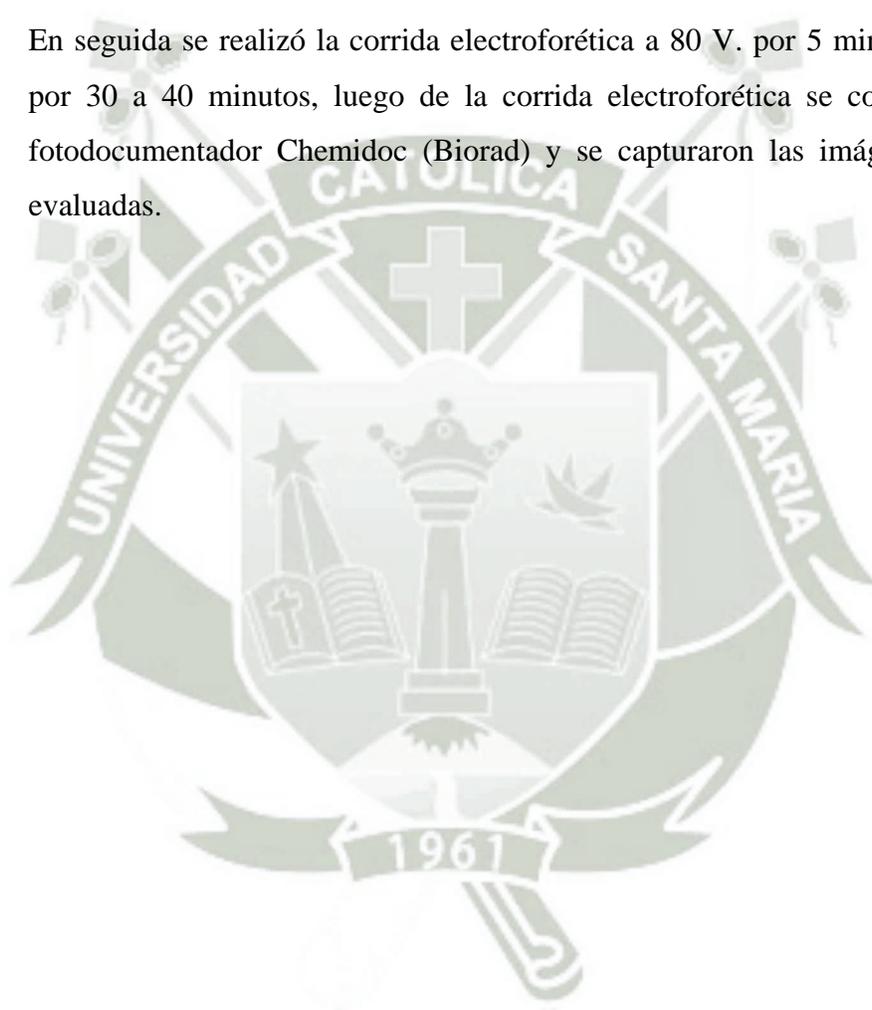


Tabla 10. Marcadores moleculares microsatélites (SSR) para el género *Oenothera*.

| Locus | Repetición | Secuencia 5'-3' | T _a (°C) | Tamaño de alelo (pb.) | Gen Bank # Accesoión |
|-------------|----------------------|---|---------------------|-----------------------|----------------------|
| | | | Larson et al. 2008 | | |
| Oenbi2tri2 | (GTT) ₈ | TTCAGCTCCGATTGCCAAATGATGG ATTCGCTGATGGAGCTGGGTTGTTCTT | 50 | 407-423 | EF988083 |
| Oenbi2tri3 | (CTT) ₂₉ | CCCAATCACACCCCTCCCTCAAT GCGACGGTGGATAGTGGATCTTCCTCT | 50 | 402-485 | EF988084 |
| Oenbi2tri6 | (CTT) ₉ | CAGGCCCTTGATCCGTTACACTTACCA GCGCTGCTGGAAGAGACGATGCT | Touchdown | 176-198 | EF988085 |
| Oenbi2tri7 | (CTT) ₉ | CTTTTTGCCCTTCTTTGACCCCATCC GACAGCAGCAGCAGCAAAGCAAAGA | Touchdown | 361-367 | EF988086 |
| Oenbi2tet1 | (AGAT) ₉ | GCCGCCCCATCAAATATCGAGTA CATATACTATTTTCTGTTTAATTTAGAAATTTGGTCCTAA | 50 | 341-364 | EF988087 |
| Oenbi39di2 | (GT) ₁₀ | TAAC TTCGTGGAACCAGACAGACTCTC GAAGCGACAAGGCATACACTTTCTCCT | 50 | 198-205 | EF988088 |
| Oenbi39tri1 | (CTT) ₆ | AACTCATACCATCCTCCTTACTTGCATCATTTA GCGAGAAGAGGTAGAGAAGCAGAAGGAGTTAG | 50 | 229-235 | EF988089 |
| Oenbi39tri4 | (CTT) ₁₆ | TTTCCTCTCCTTATCTCCTCAATTCTTCTCA CTTGCGTTATCTTATGCGTAGCCGTTAGTTTAT | 50 | 226-244 | EF988090 |
| Oenbi39tet5 | (ATAA) ₁₁ | AATTAATTTGCTCGGACACCTTTCTT GAGCTATATTTTCTTCGATCATCTTGTCTA | 50 | 277-323 | EF988091 |

Fuente: (Larson, et al., 2008 y NCBI, 2013)



3.5. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Fundamento:

La estadística es utilizada constantemente en la investigación científica para poder fundamentar los resultados obtenidos con una evaluación objetiva basada en el experimento científico, buscando aceptar o rechazar una hipótesis de forma objetiva, lo que asegura la veracidad de los fenómenos estudiados y obliga al desarrollo de conclusiones en acorde con la realidad (UTM, 2008).

Procedimiento:

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV versión 15.2 (StatPoint Inc., Warrenton, Virginia, EEUU). Para el análisis estadístico se utilizó un diseño factorial evaluando la concentración y pureza del material vegetal recolectado para el efecto de la conservación, las tres técnicas de extracción y como control se empleó el protocolo del kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Los resultados son expresados con la media \pm error estándar de la media (EE) de muestras y por duplicado para cada caso. Las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$.

Se obtuvieron resultados de Absorbancia 260/280 y 260/230 en el nanodrop 2000 (Thermo Scientific, 2009) para poder comprobar la pureza de nuestra extracción geles de agarosa que fueron analizados en el chemidoc XRS (Biorad, 2011). Todos estos datos están detallados en el Anexo 7. Por lo que para la realización del análisis estadístico en el caso de las concentraciones, se utilizó los datos proporcionados por los geles de agarosa tomando en cuenta lo mencionado por Barrick, 2012 el cual indica que comparando la medición de concentraciones del Nanodrop que indica que para estandarizaciones de técnicas de extracción es recomendable tomar los datos de concentración de las imágenes de los geles de agarosa y no los resultados del nanodrop ya este equipo puede absorber otras

sustancias como solventes dando resultados de hasta tres veces la concentración real. Todos estos datos pueden ser vistos en el Anexo 9.

3.6. METODOLOGÍA PARA ANÁLISIS COSTO.

Fundamento:

El análisis de costos es una técnica importante para poder analizar el costo total de algún proceso a realizar y de esta manera escoger el proceso que me genera menos gasto y mayor efectividad.

Procedimiento:

Se realizó el análisis de costos comparando el costo de insumos y materiales usados en cada una de las técnicas de extracción probadas, con los cuales se hizo un análisis comparativo con respecto al control comercial DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) que se usó en la presente investigación con la finalidad de obtener los porcentajes de ahorro y así poder comprobar la eficiencia económica de las técnicas de extracción evaluadas.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES



4.1 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.1. Recolección de muestras

Realizada la búsqueda de especies de *Oenothera* en Trópicos de Missouri Botanical Garden (Missouri Botanical Garden, 2013), se encontraron 19 especies distribuidas por todo el Perú.

Identificando en los departamentos de Apurímac y Cusco tres especies de *Oenothera* que han sido evaluadas por su efecto medicinal en investigaciones realizadas y por el conocimiento de los pobladores de las comunidades campesinas visitadas.

Las tres especies seleccionadas fueron inscritas en el Herbarium Arequipensis – Husa de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, en donde se encuentran los ejemplares estudiados en esta investigación (*Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis* y *Oenothera tetraptera*), que se encuentran entre los 2800 m.n.s.m. hasta los 3906 m.s.n.m. Véase 3.2.1 y Anexo 1.

Como se puede apreciar son plantas que viven en zonas de altitud y características ambientales las condicionan a poseer mayor cantidad de metabolitos secundarios tales como polifenoles, polisacáridos, etc.; haciendo que estos tejidos se constituyan en muestras con una mayor dificultad para la extracción de ADN genómico como lo menciona Deshmukh, et al. 2007 que dice que hay múltiples inconvenientes debido a la co-extracción al mayor contenido de polisacáridos de alta viscosidad y polifenoles, los cuales actúan como inhibidores durante la extracción del ADN; lo que hace que también se observe el ADN aislado de un color amarillento, pegajoso y viscoso.

Con respecto a las técnicas de conservación usadas en esta investigación (conservación con silica gel y conservación en fresco), permitieron la conservación del ADN genómico de cada muestra, sin embargo variando en la cantidad de ADN conservado.

4.1.2.1. Efecto de la conservación del material vegetal para *Oenothera rosea*

El contenido de ADN genómico con respecto a *Oenothera rosea* fue significativamente afectado por el tipo de conservación usada para la recolección de las muestras con respecto a cada técnica de extracción usada ($P > 0.05$), como puede observarse amplia y detalladamente en el Anexo 10, Tabla 28.

Como se puede ver en la Tabla 11, existe diferencias estadísticamente significativa para cada tipo de conservación con respecto al contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* probado con cada una de las técnicas de extracción utilizados en la presente investigación ($P > 0.05$), siendo la técnica de conservación en fresco la que registra los contenidos más altos de ADN genómico en cada una de las técnicas de extracción (Figura 9), lo cual puede apreciarse también en el gráfico de dispersión y grafico de error estándar mostrados en el Anexo 11 Figura 33.

Tabla 11. Contenido de ADN genómico (ng/ul) de *Oenothera rosea* con respecto a la conservación.

| TÉCNICA DE EXTRACCIÓN | TÉCNICA DE CONSERVACIÓN | |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | SILICA GEL | FRESCO |
| DNeasy | 0.00 ± 0.00 ^{Aa} | 10.86 ± 0.35 ^{Ab} |
| Técnica 1 | 23.39 ± 0.55 ^{Ba} | 105.64 ± 4.34 ^{Bb} |
| Técnica 2 | 99.31 ± 9.10 ^{Ca} | 173.62 ± 8.49 ^{Cb} |
| Técnica 3 | 99.84 ± 1.05 ^{Ca} | 210.11 ± 4.01 ^{Db} |

Fuente: Statgraphics Centurion XV

*Se reportan los resultados como las medias ± el error estándar de la media (n=2)

**Las medias dentro de una misma columna con el mismo superíndice en letras mayúscula no presentan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan, las medias dentro de la misma fila con el mismo superíndice en letra minúscula no presentan diferencias estadística significativa ($P > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan.

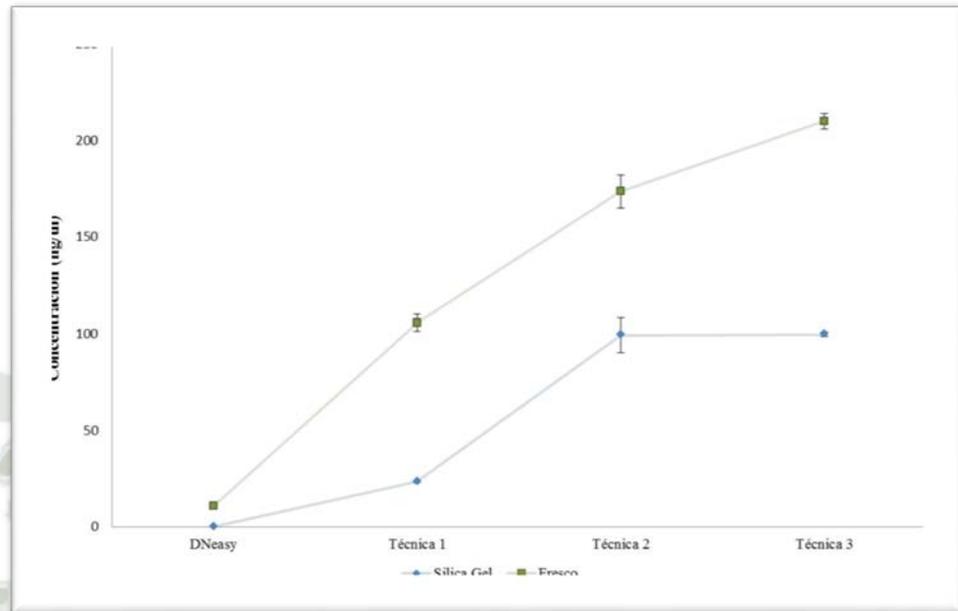


Figura 9. Efecto de la conservación para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea*.

Fuente: Microsoft Excel 2010

Tener un método de conservación adecuado para el material genético es un paso importante para realizar una exitosa extracción de ADN, como lo menciona Matasyoh, et al. 2008 que dice que no solo es importante para asegurar un adecuado estudio de extracción y el uso de diferentes tejidos, sino también la evaluación del método de almacenamiento,

Se determinó que el efecto de la conservación en fresco almacenado a -80°C fue la técnica de conservación que dio mejores resultados comparando entre todos los tratamientos de extracción usados para *Oenothera rosea*, lo cual ya fue reportado por Marulanda, et al., 2006, en donde se menciona que para preservar las muestras por tiempos prolongados es necesario almacenarlas en congeladores de -70°C y -80°C o dispositivos de nitrógeno líquido.

Del mismo modo el proceso de recolección de las muestras conservadas en fresco realizando la limpieza del material vegetal y el secado de las muestras influye considerablemente a la adecuada conservación de material genético para la extracción de ADN genómico, esto es sustentando por Matasyoh, et al., 2008 que menciona que es necesario almacenar el tejido en condiciones limpias y secas.

Otro paso fundamental para obtener una conservación adecuada fue la recolección de plantas jóvenes ya que las plantas adultas pueden ocasionar dificultades para la extracción de ADN, como indica Dabo, et al., 1993 y Zhang, et al., 2000, quienes dicen que las plantas maduras no son preferentes para la extracción de ADN principalmente por la presencia de altas concentraciones de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios.

4.1.2.2. Efecto de la conservación del material vegetal para *Oenothera multicaulis*

El contenido de ADN genómico con respecto a *Oenothera multicaulis* no fue significativamente afectado por el tipo de conservación para las técnicas de extracción usadas ($P > 0.05$), como puede observarse amplia y detalladamente en el Anexo 12, Tabla 29.

Como se puede ver en la Tabla 12, existe diferencias estadísticamente significativa para los tipos de conservación con respecto al contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* únicamente para la técnica de extracción 2 ($P > 0.05$), ya que con respecto a las demás técnica no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$), por lo que para el caso de *Oenothera multicaulis* no se puede indicar si hubo un efecto de las técnicas de conservación con respecto a la concentración en el proceso

de extracción de ADN genómico (Figura 10), lo cual puede apreciarse también en el gráfico de dispersión y gráfico de error estándar mostrados en el Anexo 13 Figura 34.

Tabla 12. Contenido de ADN genómico (ng/ul) de *Oenothera multicaulis* con respecto a la conservación.

| TÉCNICA DE EXTRACCIÓN | TÉCNICA DE CONSERVACIÓN | |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | SILICA GEL | FRESCO |
| DNeasy | 0.00 ± 0.00 ^{Aa} | 7.36 ± 2.15 ^{Aa} |
| Técnica 1 | 9.30 ± 0.05 ^{Aa} | 11.03 ± 1.51 ^{Aa} |
| Técnica 2 | 120.91 ± 12.13 ^{Ba} | 335.97 ± 22.86 ^{Cb} |
| Técnica 3 | 193.63 ± 13.43 ^{Ca} | 219.54 ± 14.51 ^{Ba} |

Fuente: Statgraphics Centurion XV

*Se reportan los resultados como las medias ± el error estándar de la media (n=2)

**Las medias dentro de una misma columna con el mismo superíndice en letras mayúscula no presentan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan, las medias dentro de la misma fila con el mismo superíndice en letra minúscula no presentan diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan.

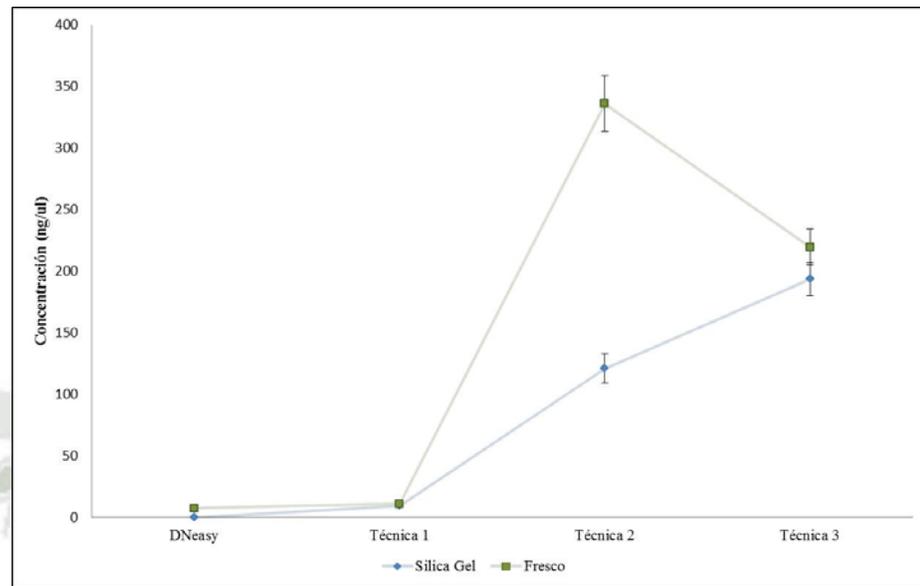


Figura 10. Efecto de la conservación para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis*.

Fuente: Microsoft Excel 2010

Como se puede apreciar con respecto a la conservación para *Oenothera multicaulis*, se presenta como resultado que la conservación en fresco sin perseverantes es la técnica más eficiente al igual que en *Oenothera rosea*.

4.1.2.3. Efecto de la conservación del material vegetal para *Oenothera tetraptera*.

El contenido de ADN genómico con respecto a *Oenothera tetraptera* fue significativamente afectado por el tipo de conservación usado para la recolección de las muestras con respecto a cada técnica de extracción usada ($P > 0.05$), como puede observarse amplia y detalladamente en el Anexo 14, Tabla 30.

Como se puede ver en la Tabla 13, existe diferencias estadísticamente significativa para cada tipo de conservación con respecto al contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* probado en con cada una de las técnicas de extracción utilizados en la presente investigación, con excepción de la extracción con kit comerciales (DNeasy) en donde no se obtuvieron resultados ($P > 0.05$), siendo la técnica de conservación en fresco la que registra los contenidos más altos de ADN genómico en cada una de las técnicas de extracción (Figura 11), lo cual puede apreciarse también en el gráfico de dispersión y grafico de error estándar mostrados en el Anexo 15 Figura 35.

Tabla 13. Contenido de ADN genómico (ng/ul) de *Oenothera tetraptera* con respecto a la conservación.

| TÉCNICA DE EXTRACCIÓN | TÉCNICA DE CONSERVACIÓN | |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | SILICA GEL | FRESCO |
| DNeasy | 0.00 ± 0.00 ^{Aa} | 0.00 ± 0.00 ^{Aa} |
| Técnica 1 | 28.50 ± 3.02 ^{Aa} | 81.56 ± 5.97 ^{Bb} |
| Técnica 2 | 99.64 ± 6.14 ^{Ba} | 172.53 ± 14.70 ^{Cb} |
| Técnica 3 | 152.95 ± 20.84 ^{Ca} | 214.25 ± 11.30 ^{Cb} |

Fuente: Statgraphics Centurion XV

*Se reportan los resultados como las medias ± el error estándar de la media (n=2)

**Las medias dentro de una misma columna con el mismo superíndice en letras mayúscula no presentan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan, las medias dentro de la misma fila con el mismo superíndice en letra minúscula no presentan diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan.

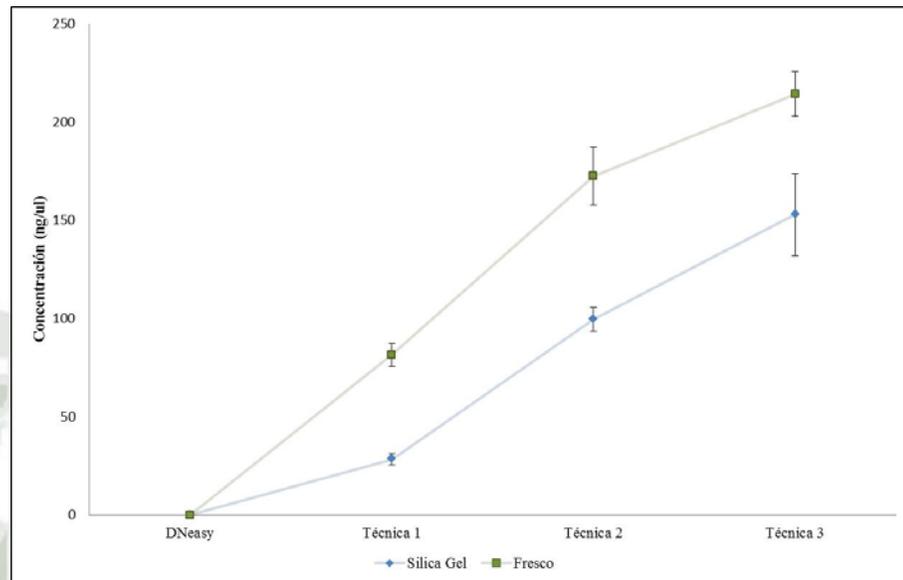


Figura 11. Efecto de la conservación para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera*.

Fuente: Microsoft Excel 2010

Como se puede apreciar con respecto a la conservación para *Oenothera tetraptera*, se presenta como resultado que la conservación en fresco sin perseverantes es la técnica más eficiente al igual que en *Oenothera rosea*.

4.1.2. Extracción de ADN

4.1.3.1. Extracción de ADN para *Oenothera rosea*

Para *Oenothera rosea* se analizaron 3 tipos de extracción y un control comercial (DNeasy), encontrando una significancia afectada con respecto a la concentración de ADN genómico para cada tipo de extracción ($P >$

0.05), como puede observarse amplia y detalladamente en el Anexo 16, Tabla 31.

Para poder determinar la calidad y concentración de ADN genómico de *Oenothera rosea* fue necesario considerar las diferencias entre todos los tratamientos realizados para la extracción. La Tabla 14 y la Figura 12 muestran el contenido de ADN genómico y las relaciones de absorbancia ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera rosea*.



Tabla 14. Contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera rosea* para cada tratamiento de extracción.

| Técnica de extracción | Técnica de Conservación | Temp. (°C) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ | Concentración (ng/ul) |
|-----------------------|-------------------------|------------|-------------------|-----------------------|------------------------|
| DNeasy | Silica Gel | -20 | 5.07 ± 1.00^B | 1.16 ± 0.02^B | 0.0 ± 0.0^A |
| | Fresco | | 1.65 ± 0.02^A | 0.64 ± 0.05^A | 10.86 ± 0.35^{AB} |
| Técnica 1 | Silica Gel | -20 | 0.95 ± 0.23^A | 0.69 ± 0.05^A | 23.39 ± 0.55^C |
| | Fresco | | 1.66 ± 0.03^A | 1.58 ± 0.02^C | 105.64 ± 4.34^D |
| Técnica 2 | Silica Gel | -20 | 1.83 ± 0.05^A | 1.80 ± 0.07^D | 84.92 ± 9.02^C |
| | | -80 | 1.68 ± 0.01^A | 1.82 ± 0.03^D | 113.70 ± 1.17^D |
| | Fresco | -20 | 1.88 ± 0.04^A | 1.93 ± 0.06^{DEF} | 162.15 ± 0.35^E |
| | | -80 | 1.83 ± 0.02^A | 1.89 ± 0.11^{DE} | 185.09 ± 12.99^F |
| Técnica 3 | Silica Gel | -20 | 1.88 ± 0.09^A | 2.09 ± 0.11^{EF} | 99.13 ± 1.29^{CD} |
| | | -80 | 1.94 ± 0.00^A | 2.13 ± 0.09^F | 100.56 ± 1.99^{CD} |
| | Fresco | -20 | 1.88 ± 0.03^A | 2.01 ± 0.02^{DEF} | 209.26 ± 3.58^G |
| | | -80 | 1.85 ± 0.01^A | 2.08 ± 0.1^{EF} | 210.67 ± 9.07^G |

Fuente: Statgraphics Centurion XV

*Se reportan los resultados como las medias \pm el error estándar de la media (n=2)

**Las medias dentro de una misma columna con el mismo superíndice en letras mayúscula no presentan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan.

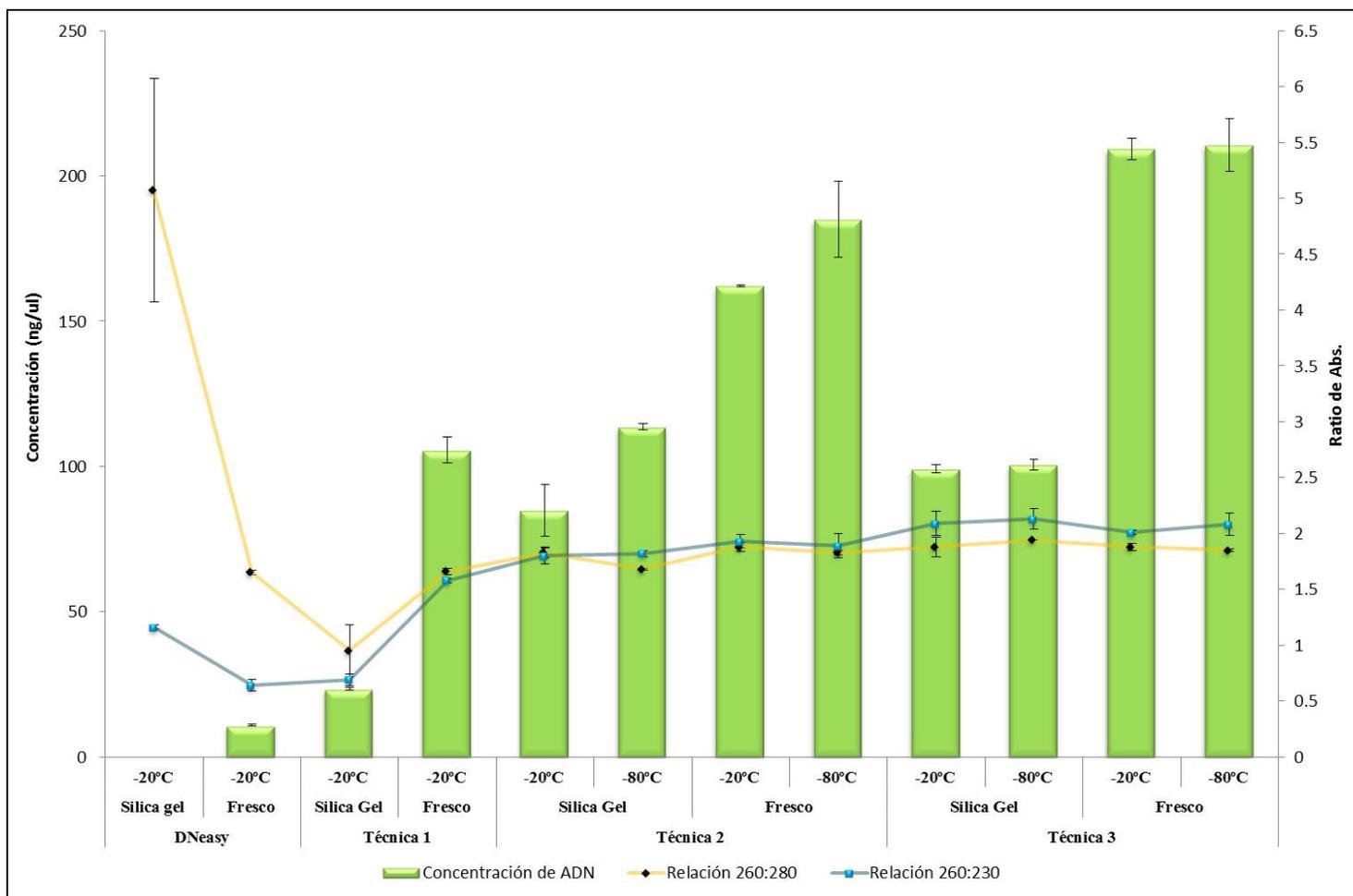


Figura 12. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera rosea* para cada tratamiento de extracción.

Fuente: Microsoft Excel 2010

Para la conservación de ADN genómico comparando entre todos los tratamientos realizados para *Oenothera rosea* se puede ver que se obtuvieron mejores resultados para la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en fresco, del mismo modo se obtuvieron concentraciones aceptables para los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en silica gel, y los tratamientos de la técnica de extracción 2, mientras que el control comercial (DNeasy) y la técnica de extracción 1 fueron los que obtuvieron los niveles más bajos de concentración de ADN genómico, estos resultados pueden observarse en la Tabla 14, Figura 12 y Anexos 17 y 18.

Para la relación $A_{260/280}$ comparando entre todos los tratamientos se obtuvieron resultados óptimos para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 y tres tratamientos de la técnica de extracción 2 con excepción del tratamiento que uso material vegetal conservado con silica gel y un enfriamiento a -80°C , mientras que los tratamientos de la técnica de extracción 1 y el control comercial (DNeasy) obtuvieron resultados que no están dentro de los parámetros de este control para contar con un ADN de alta pureza Nieman & Poulsen, 1963; Becker, et al., 1996 y Sambrook et a., 2001, estos resultados pueden observarse en la Tabla 14, Figura 12.

Para la relación $A_{260/230}$ comparando entre todos los tratamientos se obtuvieron resultados óptimos para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3, del mismo modo los resultados de los tratamientos de la técnica de extracción 2 fueron aceptables ya que se acercan a los parámetros permisibles de este control de pureza, mientras que en la técnica de extracción 1 y el control comercial (DNeasy) se obtuvo resultados que no están dentro de los parámetros de este control para contar con un ADN de alta pureza Nieman & Poulsen, 1963; Becker, et al., 1996 y Sambrook et a., 2001, estos resultados pueden observarse en la Tabla 14, Figura 12.

Por lo tanto, comparando entre las tres variables (Concentración, $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) para cada tratamiento realizado, se puede indicar que los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal fresco nos da los mejores resultados para la extracción de ADN genómico de *Oenothera rosea*, del mismo modo los resultados obtenidos en los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material conservado en silica gel también proporcionaron resultados óptimos teniendo en cuenta únicamente que la concentración con respecto a los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en fresco son menores a esta, estos resultados pueden observarse de forma clara y detallada en la Tabla 14, Figura 12 y Anexos 17 y 18. Por otro lado cabe indicar que haciendo una comparación de resultados entre los dos tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en fresco y silica gel (enfriamiento a -20°C y -80°C) no presentan una diferencia estadísticamente significativa ($P>0.05$), estos resultados pueden observarse en la Tabla 14, Figura 12.

Como se puede apreciar para realizar todas las pruebas de extracción de ADN con los diferentes tratamientos utilizados se usaron cantidades de 150 a 300 mg. de tejido vegetal porque según lo reportado por Moyo, et al., 2008, se sabe que si se usan cantidades grandes de tejidos vegetal para la extracción, menores serán las concentraciones de ADN obtenidas, por eso se tomó cantidades pequeñas de tejidos vegetal de *Oenothera rosea* en las diferentes pruebas realizadas para obtener concentraciones óptimas de ADN extraído.

Por otro lado para la técnica de extracción 2 y 3 como esta descrito en Materiales y Métodos no utilizan nitrógeno líquido para realizar la trituración del tejido considerando lo indicado por Kazemi, et al., 2012 que menciona que normalmente los tejidos de plantas son triturados en nitrógeno líquido pero esta es una dificultad en algunos casos por el tema

de almacenamiento y transporte del nitrógeno líquido, por lo que una técnica de extracción sin uso de nitrógeno líquido ayudaría para realizar trabajos moleculares en un mayor número de laboratorios del mundo. Por lo indicado es que en el presente trabajo se procedió a buscar una técnica de extracción que pueda suplir estas deficiencias.

Por otra parte referente a las técnicas de extracción utilizadas, el control comercial de QIAGEN (DNeasy), no obtuvo resultados favorables en la extracción de ADN de las tres especies de *Oenothera* evaluadas, lo cual se debe a que estos Kits comerciales están diseñados para materiales vegetales que no contienen grandes cantidades de metabolitos secundarios, como hacen referencia Li, et al., 2002 y López Mora, et al., 2011; los cuales indican que los Kits comerciales requiere tejidos jóvenes o que contengan niveles bajos de polifenoles para poder obtener una eficiente extracción de ADN.

Con respecto a la técnica de extracción 1, los resultado dieron niveles de concentración y pureza del ADN no óptimos para *Oenothera rosea*, ya que al trabajar con plantas con altos contenidos de metabolitos secundarios y ser de hábitat extremos, crean dificultades en la extracción como lo indica Ziegenhagen et al., 1993 y Mazid, et al., 2011, por lo cual no es suficiente trabajar con técnicas de extracción convencionales para tejidos vegetales como es el caso de la técnica de extracción 1 sino más bien realizar modificaciones a estas técnicas para obtener resultados óptimos.

Con respecto a la técnica de extracción 2 que es una técnica de extracción modificada de la técnica de extracción 1 a la cual se agregó principalmente proteinasa K para poder eliminar de mejor manera las impurezas, se obtuvo resultados de concentración óptimos pero resultados de pureza no tan buenos para cada tratamiento de extracción de *Oenothera rosea*, estos resultados óptimos de concentración se lograron ya que al aumentar las

concentraciones de CTAB los polifenoles forman complejos con puentes de hidrogeno evitando de esta manera que formen complejos con el ADN genómico impidiendo de este modo la perdida de ADN en los pasos de limpieza, lo cual se encuentra sustentando por Gurudeeban, et al., 2011. Del mismo modo la adición de proteinasa K ayuda a la desactivación de las proteínas durante la incubación, facilitando el proceso de extracción según lo reportado Kang, et al., 1998. Por otro lado la pureza de las muestras extraídas no fue en todos los caso la más óptima y esto puede deberse a que no se realizó una limpieza optima del ADN lo cual es fundamental para poder realizar una amplificación adecuada según lo reportado por Rowntree, et al., 2010. Otros factor que puede a ver influenciado en la baja pureza de las muestras es que se agregó acetato de potasio en el proceso de precipitación del ADN con isopropanol frio lo cual pudo ocasionar la precipitación de proteínas que aún se encontraban en el medio según lo reportado por Velasco Mosquera, 2005.

Con respecto a la técnica de extracción 3 que es al igual que la técnica de extracción 2 una modificación de la técnica de extracción 1 a la cual se agregaron algunos reactivos (CTAB 10X, NaCl y Acetato de potasio) para poder eliminar de mejor manera las impurezas, obteniendo resultados de concentración y pureza óptimos para *Oenothera rosea*. Estos resultados óptimos se pueden relacionar a que se hicieron uso de dos concentraciones de CTAB una 2X y la otra 10X, la primera fue usada en el primer paso del proceso de extracción y la segunda en el proceso de limpieza de cloroformo-alcohol isoamilico lo cual es sustentado por Rowntree, et al., 2010, el cual indica que para el caso de plantas con altos contenidos de metabolitos secundarios es adecuado realizar varias limpiezas con CTAB para asegurar la adecuada amplificación del ADN obtenido. Del mismo modo la adición de acetato de potasio al proceso de limpieza de cloroformo-alcohol isoamilico con CTAB 10X ayudo a la precipitación de

las proteínas presentes lo cual es justificado por Velasco Mosquera, 2005. Así mismo en el proceso de precipitación de ADN con isopropanol frío se usó concentraciones de NaCl lo cual según Velasco Mosquera, 2005; ayudan a la precipitación del ADN diluido y la dilución de otras sustancias de la solución, lo cual permitió obtener únicamente ADN y eliminar de mejor manera las impurezas del medio.

Por otro lado Sharma, et al., 2010; que trabajó con seis plantas medicinales de la India (*O. sanctum*, *C. roseus*, *C. borivilianum*, *C. gigantean*, *S. cumini*, *Z. mauritiana*), estandarizando una técnica de extracción que evita el uso de nitrógeno líquido, obtuvo resultados de concentración que van entre 800 a 1200 ng/ul. y de pureza ($A_{260/280}$) de 1.30 a 1.70; y Tiwari, et al., 2012, que trabajó con cinco plantas medicinales (*T. procumbes*, *T. cordifolia*, *A. barbadensis* y *C. quadrangularis*) estandarizando de una técnica de extracción, la cual utiliza concentraciones de CTAB de 2.4X y usando una mezcla de tres alcoholes (fenol, cloroformo y alcohol isoamílico) para el proceso de purificación, obtuvo resultados de concentración que van entre 179 a 833 ng/ul. y de pureza ($A_{260/280}$) de 1.29 a 1.93. Al ser comparados con las técnicas de extracción 3 que obtuvo los mejores resultados para las tres especies de *Oenothera* evaluadas en la presente investigación, la cual utiliza dos concentraciones de CTAB (2X y 10X) y evita el uso de nitrógeno líquido en la trituración, dio mejores resultados obteniendo un promedio de concentración que va entre 99.13 a 242.75 ng/ul. y un rango de pureza ($A_{260/280}$) de 1.84 a 1.94; lo cual nos indica que a pesar de poseer menores concentraciones de ADN la técnica de extracción 3 proporciona un grado de pureza muy bueno, el cual nos indica que contamos con un ADN completamente puro y bueno para trabajos moleculares.

4.1.3.2. Extracción de ADN para *Oenothera multicaulis*

Para *Oenothera multicaulis* se analizaron 3 tipos de extracción y un control comercial (DNeasy), encontrando una significancia afectada con respecto a la concentración de ADN genómico para cada tipo de extracción ($P > 0.05$), como puede observarse amplia y detalladamente en el Anexo 19, Tabla 32.

Para poder determinar la calidad y concentración de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* fue necesario considerar las diferencias entre todos los tratamientos realizados para la extracción. La Tabla 15 y la Figura 13 muestran el contenido de ADN genómico y las relaciones de absorbancia ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera multicaulis*.

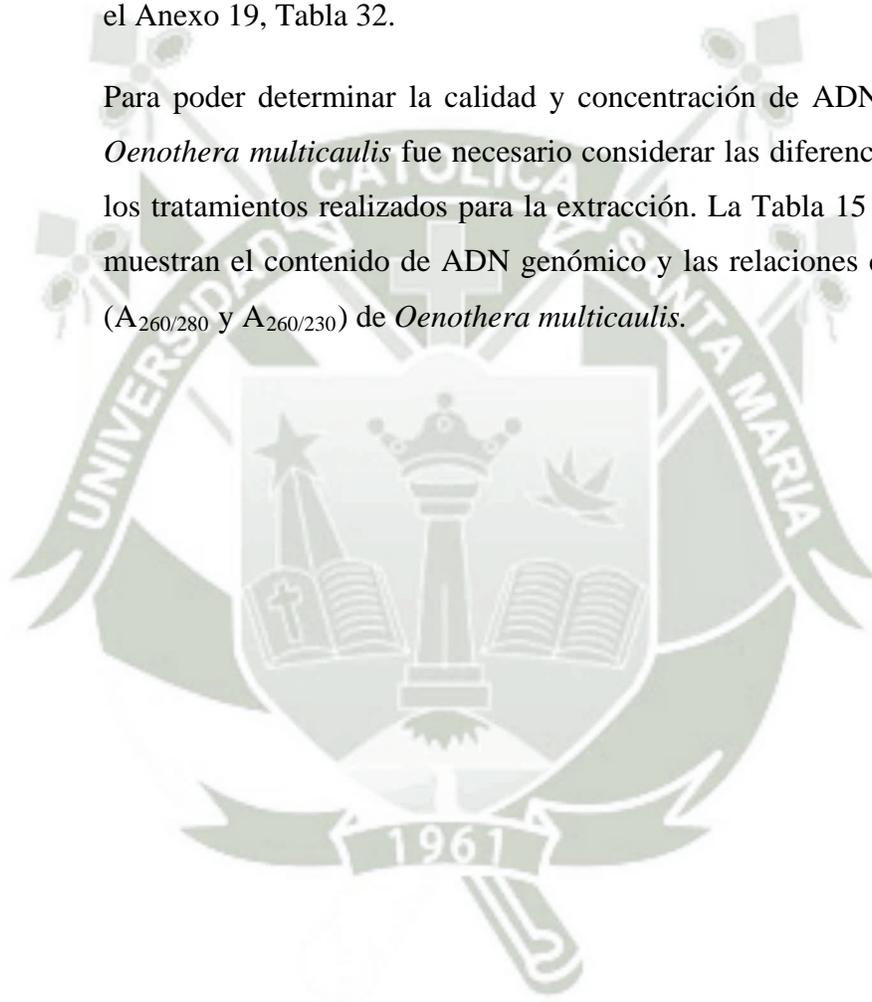


Tabla 15. Contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera multicaulis* para cada tratamiento de extracción.

| Técnica de extracción | Técnica de Conservación | Temp. (°C) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ | Concentración (ng/ul) |
|-----------------------|-------------------------|------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| DNeasy | Silica Gel | -20 | -0.33 ± 0.29^A | 0.15 ± 0.04^A | 0.00 ± 0.00^A |
| | Fresco | | 1.94 ± 0.24^{CD} | 0.91 ± 0.35^B | 7.36 ± 2.15^A |
| Técnica 1 | Silica Gel | -20 | 2.3 ± 0.23^D | 1.25 ± 0.37^{BC} | 9.30 ± 0.05^A |
| | Fresco | | 1.75 ± 0.01^{BC} | 0.85 ± 0.01^B | 11.03 ± 1.51^A |
| Técnica 2 | Silica Gel | -20 | 1.81 ± 0.06^{BC} | 1.81 ± 0.05^{DE} | 125.89 ± 28.36^{BC} |
| | | -80 | 2.07 ± 0.03^{CD} | 1.52 ± 0.13^{CD} | 115.92 ± 5.33^B |
| | Fresco | -20 | 1.69 ± 0.08^{BC} | 1.92 ± 0.09^{DE} | 309.06 ± 32.83^F |
| | | -80 | 1.44 ± 0.18^B | 1.66 ± 0.15^{CDE} | 362.88 ± 24.73^G |
| Técnica 3 | Silica Gel | -20 | 1.90 ± 0.01^{BCD} | 2.02 ± 0.01^{DE} | 172.09 ± 3.16^{CD} |
| | | -80 | 1.84 ± 0.01^{BCD} | 2.02 ± 0.03^{DE} | 215.17 ± 11.99^{DE} |
| | Fresco | -20 | 1.88 ± 0.05^{BCD} | 2.11 ± 0.02^E | 196.93 ± 11.60^{DE} |
| | | -80 | 1.85 ± 0.01^{BCD} | 2.05 ± 0.04^{DE} | 242.15 ± 10.30^E |

Fuente: Statgraphics Centurion XV

*Se reportan los resultados como las medias \pm el error estándar de la media (n=2)

**Las medias dentro de una misma columna con el mismo superíndice en letras mayúscula no presentan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan.

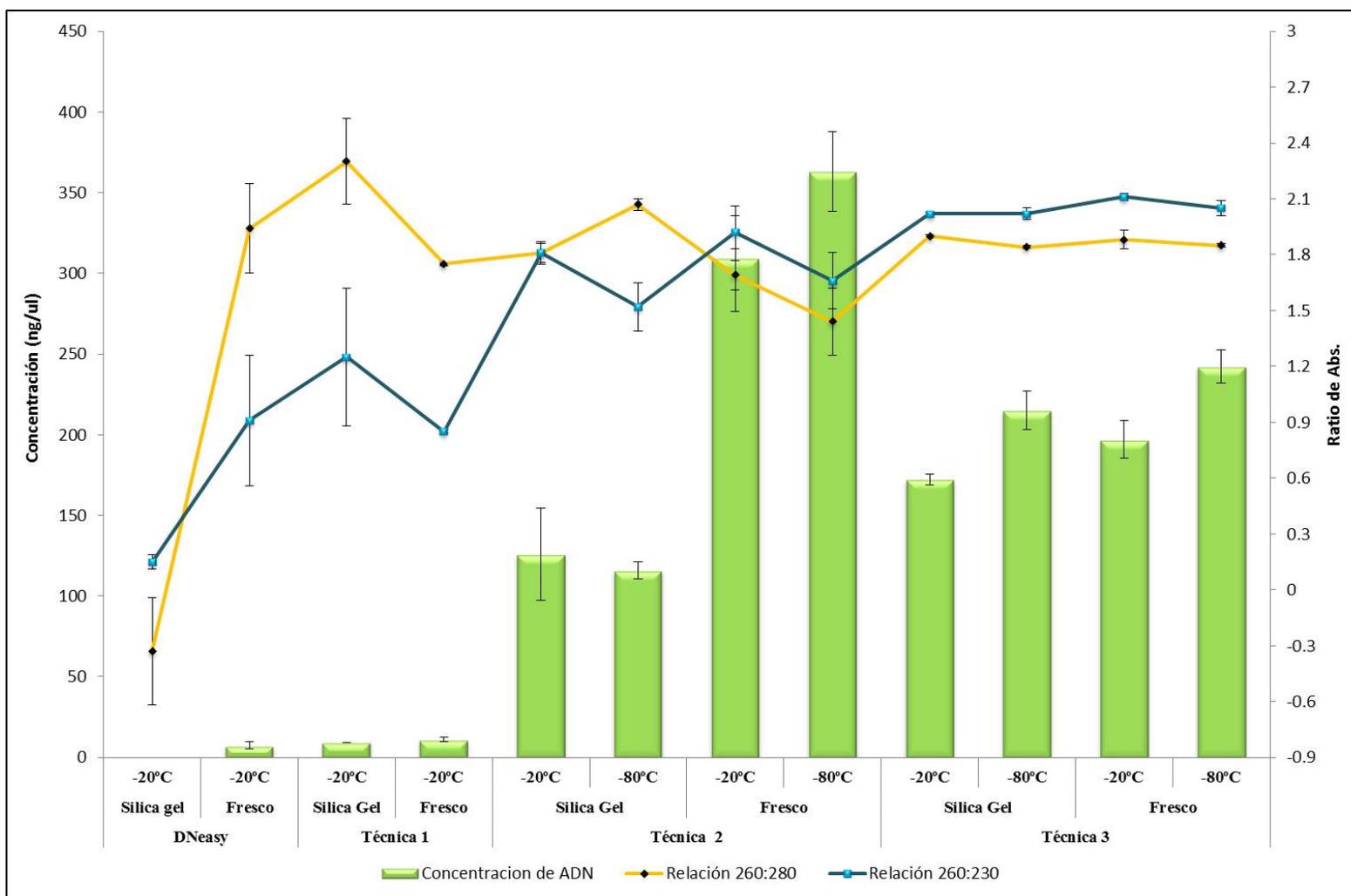


Figura 13. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera multicaulis* para cada tratamiento de extracción.

Fuente: Microsoft Excel 2010

Para la conservación de ADN genómico comparando entre todos los tratamientos realizados para *Oenothera multicaulis* se puede ver que se obtuvieron mejores resultados para la técnica de extracción 2 usando material vegetal conservado en fresco, del mismo modo se obtuvieron concentraciones aceptables para los tratamientos de la técnica de extracción 2 usando material vegetal conservado en silica gel, y los tratamientos de la técnica de extracción 3, mientras que el control comercial (DNeasy) y la técnica de extracción 1 fueron los que obtuvieron los niveles más bajos de concentración de ADN genómico, estos resultados pueden observarse en la Tabla 15, Figura 13 y Anexos 20 y 21.

Para la relación $A_{260/280}$ comparando entre todos los tratamientos se obtuvieron resultados óptimos para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 y tres tratamientos de la técnica de extracción 2 con excepción del tratamiento que uso material vegetal conservado con silica gel y un enfriamiento a -80°C , mientras que en la técnica de extracción 1 y el control comercial (DNeasy) obtuvieron resultados que no están dentro de los parámetros de este control para contar con un ADN de alta pureza Nieman & Poulsen, 1963; Becker, et al., 1996 y Sambrook et a., 2001, estos resultados pueden observarse en la Tabla 15, Figura 13.

Para la relación $A_{260/230}$ comparando entre todos los tratamientos se obtuvieron resultados óptimos para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3, mientras que en los tratamientos de la técnica de extracción 1, la técnica de extracción 2 y el control comercial (DNeasy) se obtuvo resultados que no están dentro de los parámetros de este control para contar con un ADN de alta pureza Nieman & Poulsen, 1963; Becker, et al., 1996 y Sambrook et a., 2001, estos resultados pueden observarse en la Tabla 15, Figura 13.

Por lo tanto, comparando entre las tres variables (Concentración, $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) para cada tratamiento realizado, se puede indicar que los tratamientos de la técnica de extracción 3 nos da los mejores resultados para la extracción de ADN genómico de *Oenothera multicaulis*, cabe mencionar que los tratamientos de la técnica de extracción 2 tiene resultados de concentración favorables pero sus relaciones de absorbancia ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) presentan resultados fuera de los parámetros permisible, como puede observarse de forma clara y detalles en la Tabla 15, Figura 13 y Anexos 20 y 21. Por otro lado cabe indicar que haciendo una comparación de resultados entre los dos tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material conservado en fresco y silica gel (enfriamiento a -20°C y -80°C) no presentan una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$), estos resultados pueden observarse en la Tabla 15 y Figura 13.

Como se puede apreciar los resultado obtenidos para los diferentes tratamientos para *Oenothera multicaulis* son similares a los obtenidos para *Oenothera rosea* siendo los tratamientos de la técnica 3 los que dieron los mejores resultados.

4.1.3.3. Extracción de ADN para *Oenothera tetraptera*.

Para *Oenothera tetraptera* se analizaron 3 tipos de extracción y un control comercial (DNeasy), encontrando una significancia afectada con respecto a la concentración de ADN genómico para cada tipo de extracción ($P > 0.05$), como puede observarse amplia y detalladamente en el Anexo 22, Tabla 33.

Para poder determinar la calidad y concentración de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* fue necesario considerar las diferencias entre todos los tratamientos realizados para la extracción. La Tabla 16 y la Figura 14

muestran el contenido de ADN genómico y las relaciones de absorbancia ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera tetraptera*.



Tabla 16. Contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera tetraptera* para cada tratamiento de extracción.

| Técnica de extracción | Técnica de Conservación | Temp. (°C) | $A_{260/280}$ | $A_{260/230}$ | Concentración (ng/ul) |
|-----------------------|-------------------------|------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|
| DNeasy | Silica Gel | -20 | -0.34 ± 0.44^A | 0.10 ± 0.36^A | 0.00 ± 0.00^A |
| | Fresco | | 0.92 ± 0.85^B | 0.47 ± 0.30^{AB} | 0.00 ± 0.00^A |
| Técnica 1 | Silica Gel | -20 | 1.56 ± 0.18^{BC} | 0.91 ± 0.49^{BCD} | 28.50 ± 3.02^A |
| | Fresco | | 1.51 ± 0.04^{BC} | 0.56 ± 0.13^{ABC} | 81.56 ± 5.97^B |
| Técnica 2 | Silica Gel | -20 | 2.15 ± 0.05^C | 1.30 ± 0.29^{CDE} | 100.26 ± 15.02^B |
| | | -80 | 1.89 ± 0.06^{BC} | 1.47 ± 0.34^{DE} | 99.03 ± 0.45^B |
| | Fresco | -20 | 2.20 ± 0.02^C | 2.12 ± 0.19^E | 150.11 ± 15.60^{CD} |
| | | -80 | 1.93 ± 0.16^C | 1.89 ± 0.07^E | 194.96 ± 6.80^E |
| Técnica 3 | Silica Gel | -20 | 1.85 ± 0.03^{BC} | 1.96 ± 0.02^E | 186.21 ± 19.00^{DE} |
| | | -80 | 1.94 ± 0.04^C | 2.08 ± 0.06^E | 119.70 ± 5.55^{BC} |
| | Fresco | -20 | 1.85 ± 0.00^{BC} | 2.04 ± 0.05^E | 219.73 ± 25.48^E |
| | | -80 | 1.88 ± 0.04^{BC} | 2.13 ± 0.02^E | 208.77 ± 7.49^E |

Fuente: Statgraphics Centurion XV

*Se reportan los resultados como las medias \pm el error estándar de la media (n=2)

**Las medias dentro de una misma columna con el mismo superíndice en letras mayúscula no presentan diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) cuando se someten a la prueba de múltiples rangos de Duncan.

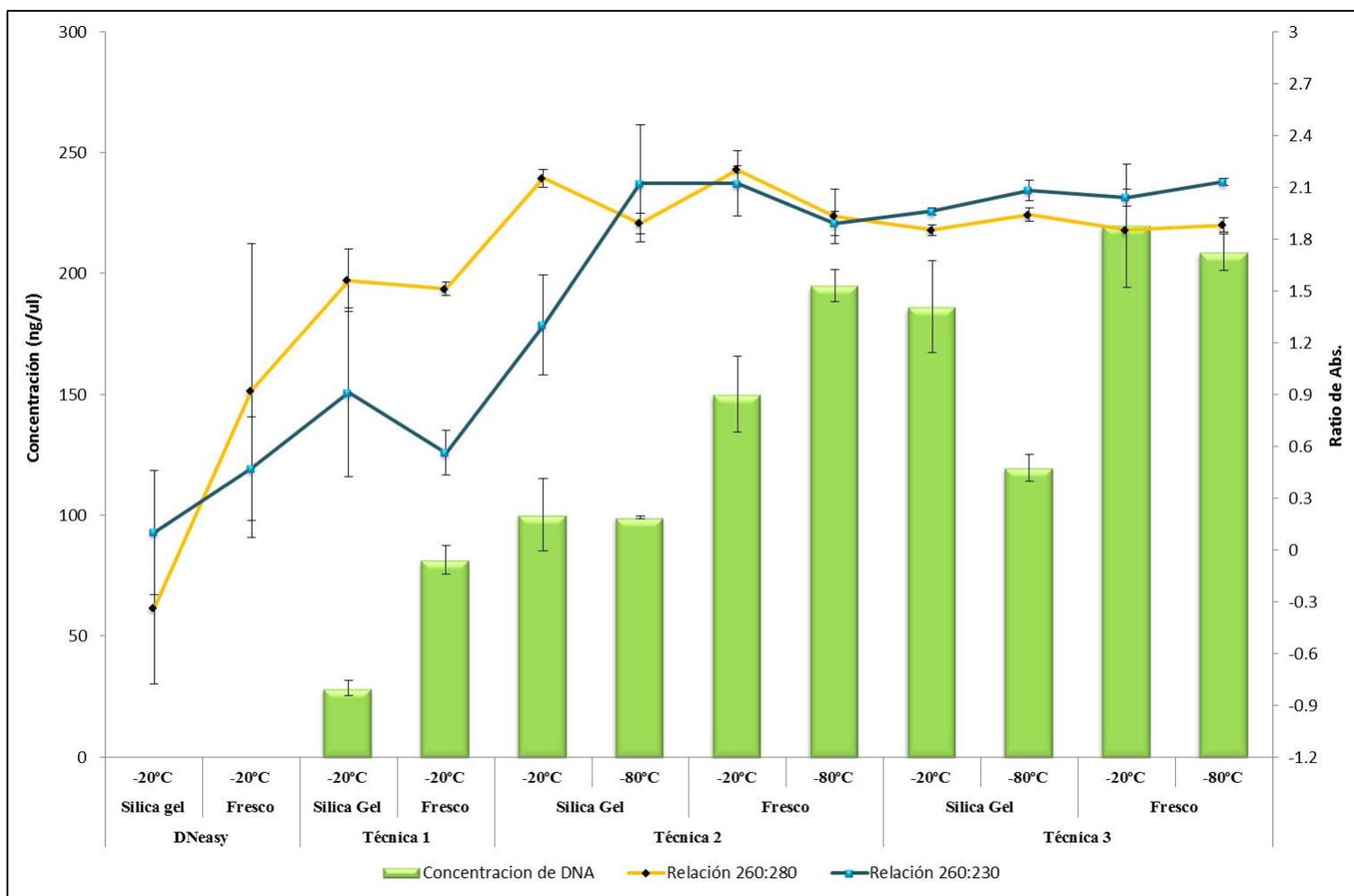


Figura 14. Gráfica del contenido de ADN genómico y relación de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) de *Oenothera tetraptera* para cada tratamiento de extracción.

Fuente: Microsoft Excel 2010

Para la conservación de ADN genómico comparando entre todos los tratamientos realizados para *Oenothera tetraptera* se puede ver que se obtuvieron mejores resultados para la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en fresco y el tratamiento de la técnica de extracción 2 usando material vegetal conservado en fresco con enfriamiento a -80°C , del mismo modo se obtuvieron concentraciones aceptables para los demás tratamientos de la técnica de extracción 3 y la técnica de extracción 2; mientras que los tratamientos del control comercial (DNeasy) y la técnica de extracción 1 fueron los que obtuvieron los niveles más bajos de concentración de ADN genómico, estos resultados pueden observarse en la Tabla 16, Figura 14 y Anexos 23 y 24.

Para la relación $A_{260/280}$ comparando entre todos los tratamientos se obtuvieron resultados óptimos para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 y tres tratamientos de la técnica de extracción 2 con excepción del tratamiento que uso material vegetal conservado en fresco con enfriamiento a -20°C , mientras que los tratamientos de la técnica de extracción 1 y el control comercial (DNeasy) obtuvieron resultados que no están dentro de los parámetros de este control para contar con un ADN de alta pureza Nieman & Poulsen, 1963; Becker, et al., 1996 y Sambrook et al., 2001, estos resultados pueden observarse en la Tabla 16, Figura 14.

Para la relación $A_{260/230}$ comparando entre todos los tratamientos se obtuvieron resultados óptimos para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 y los tratamientos de la técnica de extracción 2 usando material vegetal conservado en fresco, mientras que los tratamientos de la técnica de extracción 1, la técnica de extracción 2 usando material vegetal conservado en silica gel y el control comercial (DNeasy) se obtuvo resultados que no están dentro de los parámetros de este control para contar con un ADN de alta pureza Nieman & Poulsen, 1963; Becker, et al.,

1996 y Sambrook et a., 2001, estos resultados pueden observarse en la Tabla 16, Figura 14.

Por lo tanto, comparando entre las tres variables (Concentración, $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) para cada tratamiento realizado, se puede indicar que los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal fresco nos dan los mejores resultados para la extracción de ADN genómico de *Oenothera tetraptera*, del mismo modo los resultados obtenidos en los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en silica gel también proporcionaron resultados óptimos teniendo en cuenta únicamente que la concentración con respecto a los tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material vegetal conservado en fresco son menores a esta, al igual que el tratamiento de la técnica de extracción 2 usando material vegetal en fresco con enfriamiento a -80°C , todos estos resultados pueden observarse de forma clara y detallada en la Tabla 12, Figura 14 y Anexos 23 y 24. Por otro lado cabe indicar que haciendo una comparación de resultados entre los dos tratamientos de la técnica de extracción 3 usando material conservado en fresco y silica gel (enfriamiento a -20°C y -80°C) no presentan una diferencia estadísticamente significativa ($P>0.05$), estos resultados pueden observarse en la Tabla 16, Figura 14.

Como se puede apreciar los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos para *Oenothera tetraptera* son similares a los obtenidos para *Oenothera rosea* siendo los tratamientos de la técnica de extracción 3 los que dieron los mejores resultados.

4.1.3. Evaluación de la calidad del ADN genómico.

Se realizó la evaluación de la calidad del ADN genómico de las tres especies de *Oenothera* evaluadas en la presente investigación, para lo cual se realizó una

amplificación con el par de primers SSR Oenbi2tri2 (Larson, et al. 2008), las características de este primer puede observarse amplia y detalladamente en la Tabla 10.

Para poder realizar la amplificación con el primer SSR Oenbi2tri2, se realizó una amplificación en gradiente para determinar su T_a , obteniendo como resultado que la T_a más adecuada para la amplificación siguiendo el mix PCR seleccionado (Anexo 8, Tabla 20) se encuentra entre 59.5°C y 60.7°C , por lo cual se usó una T_a de 60°C , lo cual es válido según Satya S., et. al, 2011, el cual indica que a pesar de tener primers de una especie del mismo género es recomendable la evaluación de las T_a para obtener resultados óptimos con otras especies. Para ver estos resultados puede observar la Figura 15,

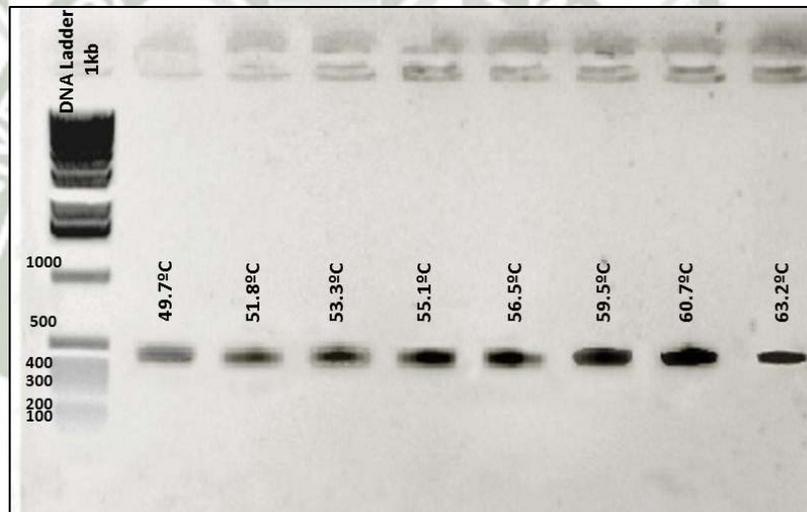


Figura 15. Amplificación con gradiente de temperatura para el primer SSR Oenbi2tri2.

Fuente: (Biorad, 2011)

4.1.4.1. Evaluación de la calidad de ADN para *Oenothera rosea*

Para realizar la evaluación de la calidad de *Oenothera rosea* se determinó cuáles fueron los mejores resultados obtenidos para los diferentes técnicas de extracción utilizadas, dando como resultado que las técnicas con mejores resultados fueron los tratamientos de las técnicas de extracción 2 y 3, estos resultados puede observarlo detalladamente en la Tabla 14 y Figura 12.

Se realizó la amplificación con el primer SSR Oenbi2tri2 (Larson, et al. 2008), tomando como muestras una de las repeticiones de cada tratamiento y siguiendo el mix de PCR seleccionado (Anexo 8, Tabla 24), obteniendo como resultado un amplificado adecuado para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3, así mismo se logró la amplificación de tres tratamientos de la técnica de extracción 2 aunque la concentración de amplificado comparado con los tratamientos de la técnica de extracción 3 son menores. Véase Tabla 25 y Figura 16.

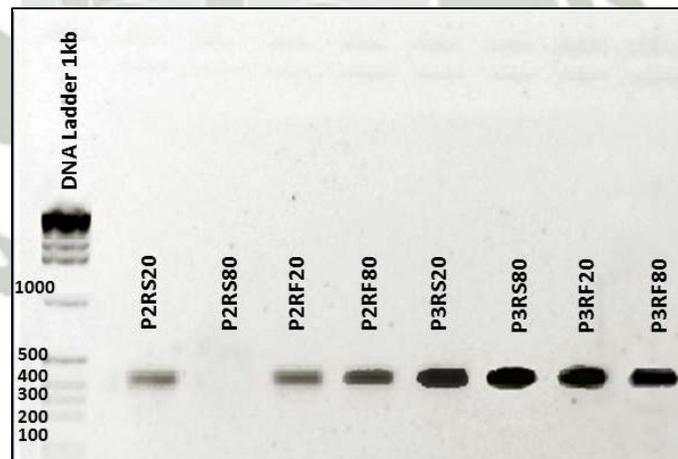


Figura 16. Amplificación de muestras de *Oenothera rosea* con el primer SSR Oenbi2tri2, para la determinación de la calidad de ADN de los diferentes tratamientos seleccionados.

Fuente: (Biorad, 2011)

Por todo lo indicado se puede concluir que todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 para *Oenothera rosea*, presentan mejores resultados de calidad para poder realizar trabajos de amplificación, aunque también se puede ver que algunos de los tratamientos de la técnica de extracción 2 dieron amplificados aunque las concentraciones de amplificado son menores, lo cual es válido según lo indicado por Grattapaglia, 1994 y Kotchoni, et al., 2003 determinaron que aun en casos en los cuales se obtiene concentraciones considerables de ADN empleando un método o un tejido específico como es el caso de la técnica de extracción 2 esto no garantiza que fuese amplificable ya que las impurezas presentes como los polisacáridos y polifenoles residuales inhiben la amplificación y pueden producir interpretaciones erróneas.

4.1.4.2. Evaluación de la calidad de ADN para *Oenothera multicaulis*

Para realizar la evaluación de la calidad de *Oenothera multicaulis* se determinó cuáles fueron los mejores resultados obtenidos para los diferentes técnicas de extracción utilizadas, dando como resultado que las técnicas con mejores resultados fueron los tratamientos de las técnicas de extracción 2 y 3, estos resultados pueden observarlos detalladamente en la Tabla 15 y Figura 13.

Se realizó la amplificación con el primer SSR Oenbi2tri2 (Larson, et al. 2008), tomando como muestras una de las repeticiones de cada tratamiento y siguiendo el mix de PCR seleccionado (Anexo 8, Tabla 24), obteniendo como resultado un amplificado adecuado para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3, así mismo se logró la amplificación para los tratamientos de la técnica de extracción 2 conservados en silica gel aunque la concentración de amplificado comparado con los tratamientos de la técnica de extracción 3 son menores. Véase Tabla 26 y Figura 17.

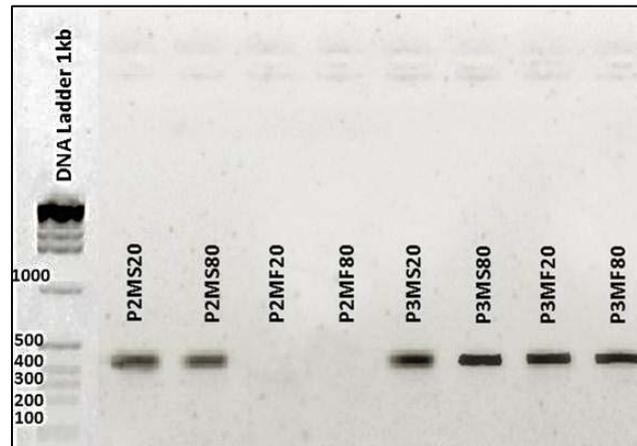


Figura 17. Amplificación de muestras de *Oenothera multicaulis* con el primer SSR Oenbi2tri2, para la determinación de la calidad de ADN de los diferentes tratamientos seleccionados.

Fuente: (Biorad, 2011)

Por todo lo indicado se puede concluir que todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 para *Oenothera multicaulis*, presentan mejores resultados de calidad para poder realizar trabajos de amplificación, aunque también se puede ver algunos de los tratamientos de la técnica de extracción 2 dieron amplificados aunque las concentraciones de amplificado son menores, siendo los resultados similares a los obtenidos para *Oenothera rosea*.

4.1.4.3. Evaluación de la calidad de ADN para *Oenothera tetraptera*.

Para realizar la evaluación de la calidad de *Oenothera tetraptera* se determinó cuáles fueron los mejores resultados obtenidos para los diferentes técnicas de extracción utilizadas, dando como resultado que las técnicas con mejores resultados fueron los tratamientos de las técnicas de

extracción 2 y 3, estos resultados puede observarlo detalladamente en la Tabla 16 y Figura 14.

Se realizó la amplificación con el primer SSR Oenbi2tri2 (Larson, et al. 2008), tomando como muestras una de las repeticiones de cada tratamiento y siguiendo el mix de PCR seleccionado (Anexo 8, Tabla 24), obteniendo como resultado un amplificado adecuado para todos los tratamientos de la técnica de extracción 3, así mismo se logró la amplificación de un tratamientos de la técnica de extracción 2 aunque la concentración de amplificado comparado con los tratamientos de la técnica de extracción 3 son menores. Véase Tabla 27 y Figura 18.

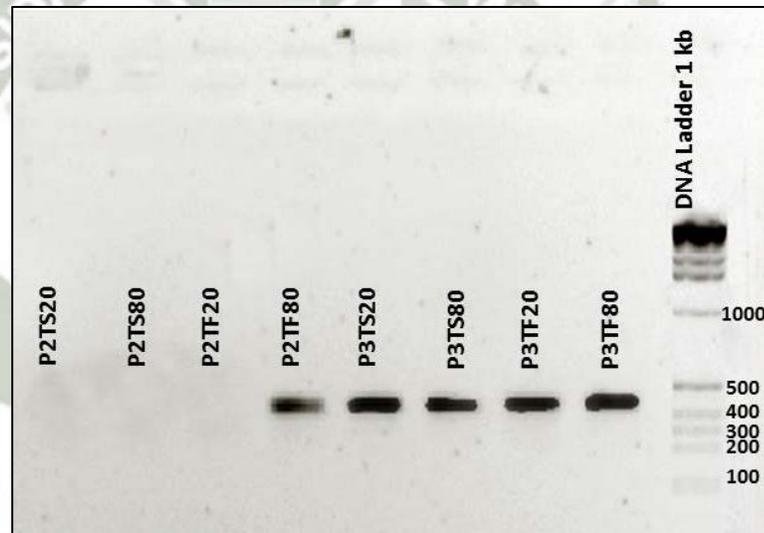


Figura 18. Amplificación de muestras de *Oenothera tetraptera* con el primer SSR Oenbi2tri2, para la determinación de la calidad de ADN de los diferentes tratamientos seleccionados.

Fuente: (Biorad, 2011)

Por todo lo indicado se puede concluir que todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 para *Oenothera tetraptera*, presentan mejores

resultados de calidad para poder realizar trabajos de amplificación, aunque también se puede ver que un tratamiento de la técnica de extracción 2 presenta concentraciones de amplificado pero de menor concentración, siendo los resultados similares a los obtenidos para *Oenothera rosea*.

4.1.4. Estandarización de primers microsátélites (SSR).

Para lograr la correcta amplificación del ADN es importante tener en cuenta la calidad de ADN extraído, por lo cual después de realizada la evaluación de calidad del ADN genómico de cada una de las especies en estudio se dio como resultado que los tratamientos de la técnica de extracción 3 fueron los que presentaron mejores resultados para los tres casos, por lo cual fueron los usados para la estandarización de primers SSR; los tiempos y temperaturas a usar en la PCR también son importantes para este proceso, para lo cual se siguió el protocolo de amplificación descrito por el laboratorio de Biología Molecular del INIA, como se encuentra descrito en los materiales y métodos; añadiendo una gradiente de temperatura para la estandarización de cada uno de los pares de primers utilizados con la finalidad de obtener la T_a adecuada para estas especies.

Se estandarizaron 9 primers SSR que fueron diseñados y estandarizados por Larson et al. 2008 para *Oenothera Biennis* en el departamento de biología de la Universidad de Duke Estados Unidos, permitiendo estos primers tener informativa en la identificación de genotipos en estudios de campo multigeneracionales para evaluar los cambios en las frecuencias genotípicas.

Según Larson et al. 2008 se tenía referencia de las T_a para los nueve pares de primers para *Oenothera biennis*, estos datos se pueden ver en la Tabla 17; por lo que al ser tres diferentes especies de *Oenothera* se realizó la gradiente de temperatura para cada uno de los primers, determinando la T_a adecuada para cada los nueve pares de primers estudiados, que fueron en su gran mayoría

diferentes a los reportados por Larson et al. 2008, estos resultados se pueden ver en la Tabla 17 y la Figura 19.

Como se pudo apreciar en los resultados se trabajaron con nueve pares de primers microsatélites (SSR) diseñados y estandarizados para *Oenothera biennis*, por tal motivo según como lo mencionado por Satya S., et. al, 2011, el cual indica que a pesar de tener primers de una especie del mismo genero es recomendable la evaluación de las Ta para obtener resultados optimos con otras especies, lo cual fue así ya que la mayoría de Ta obtenidas en la estandarización son diferentes a los reportados por Larson et al. 2008. Estos datos pueden ser visto en la Tabla 17. La determinación de la Ta (Temperatura de anillamiento) es un paso importante para la realización de la amplificación de cualquier par de primers, ya que es el momento en el cual los primers pueden hibridar a las hebras del ADN para dar inicio en el siguiente paso a la síntesis de amplificado con ayuda de la taq polimerasa como lo indica Berg, et al., 2008.

Por otra parte el mix de PCR que se puede apreciar en el Anexo 8 Tabla 24, fue el estandarizado por el laboratorio de Biología Molecular del INIA, que contenía cantidades adecuadas de componentes y ya había sido utilizada para el análisis de PCR de varias especies como *musa* (plátano) y *solanum tuberosum* (papa). Por lo que se contaba con una concentración de componentes adecuada para asegurar asegurar el proceso de amplificación y evitar la generación de dímeros que dan resultado falsos positivos, tal como lo indica Mehboob-ur, et al. 2002.

Tabla 17. Estandarización de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para el género *Oenothera*.

| Locus | Repetición | Secuencia 5'-3' | T _a (°C) | T _a (°C) | Tamaño de alelo (pb.) | Gen Bank # Accesoión |
|-------------|----------------------|---|---------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|
| | | | Larson et al. 2008 | Estandarizada | | |
| Oenbi2tri2 | (GTT) ₈ | TTCAGCTCCGATTGCCAAATGATGG ATTCGCTGATGGAGCTGGGTTGTTCTT | 50 | 60 | 407-423 | EF988083 |
| Oenbi2tri3 | (CTT) ₂₉ | CCCAATCACACCCCTCCCTCAAT GCGACGGTGGATAGTGGATCTTCCTCT CAGGCCCTTGATCCGTTACACTTACCA | 50 | 56.5 | 402-485 | EF988084 |
| Oenbi2tri6 | (CTT) ₉ | GCGCTGCTGGAAGAGACGATGCT CTTTTGGCCCTTCTTTGACCCCATCC | Touchdown | 60 | 176-198 | EF988085 |
| Oenbi2tri7 | (CTT) ₉ | GACAGCAGCAGCAGCAAAAGCAAAGA GCCGCCCATCAAAATATCGAGTA | Touchdown | 60 | 361-367 | EF988086 |
| Oenbi2tet1 | (AGAT) ₉ | CATATACTATTTTCTGTTTAATTTTAGAATTTGGTCCTAA TAACTTCGTGGAACCAGACAGACTCTC | 50 | 50 | 341-364 | EF988087 |
| Oenbi39di2 | (GT) ₁₀ | GAAGCGACAAGGCATACACTTTCTCCT AACTCATACCATCCTCCTTACTTGCATCATTTA | 50 | 56.5 | 198-205 | EF988088 |
| Oenbi39tri1 | (CTT) ₆ | GCGAGAAGAGGTAGAGAAGCAGAAGGAGTTAG TTTCTCTCCTTATCTCCTCAATTCTTCTCA | 50 | 60 | 229-235 | EF988089 |
| Oenbi39tri4 | (CTT) ₁₆ | CTTGCGTTATCTTATGCGTAGCCGTTAGTTTAT AATTAATTTGCTCGGACACCTTTCTT | 50 | 56.5 | 226-244 | EF988090 |
| Oenbi39tet5 | (ATAA) ₁₁ | GAGCTATATTTTCTTCGATCATCTTGTCTA | 50 | 50 | 277-323 | EF988091 |

Fuente: Propia

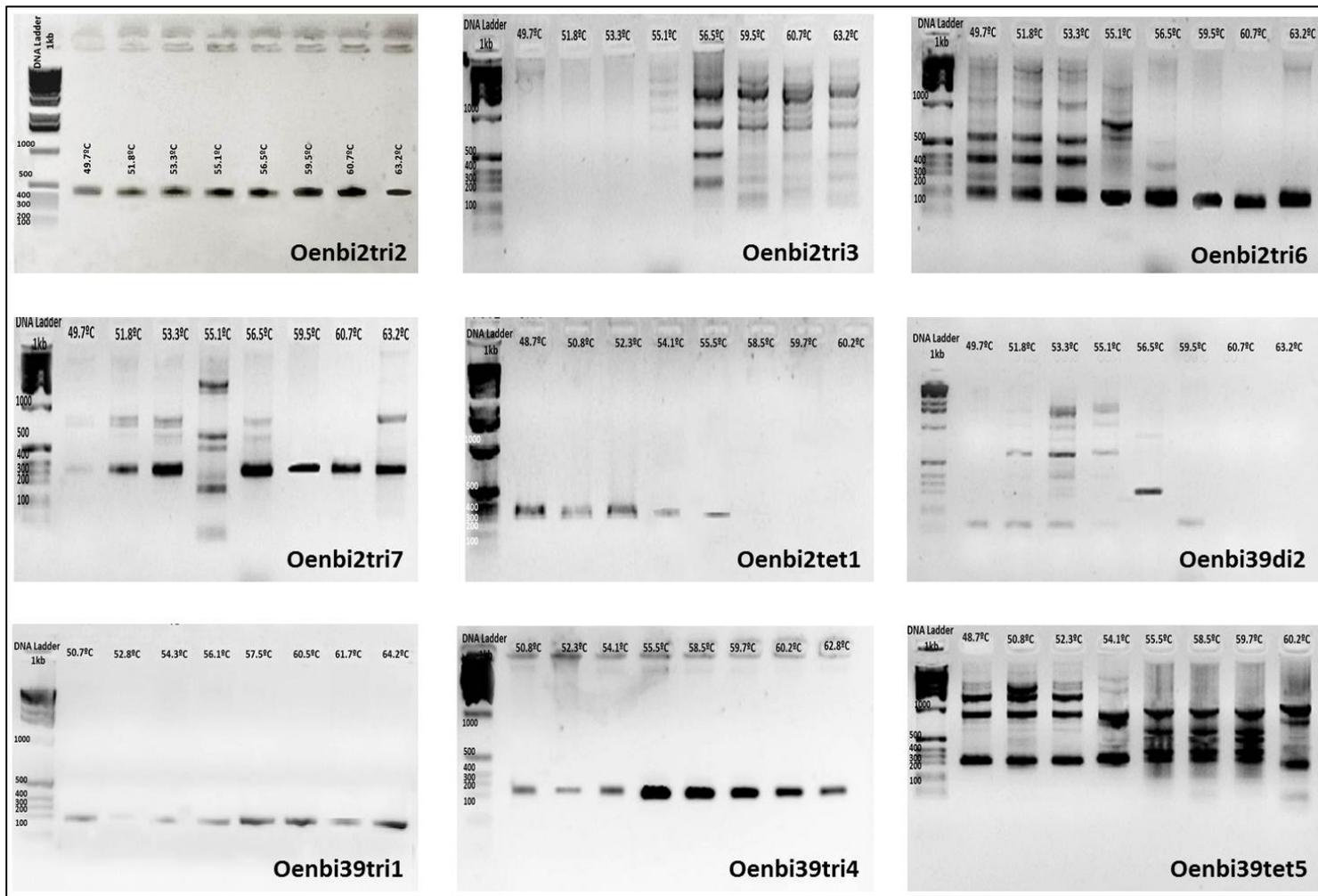


Figura 19. Gradientes de temperatura para los primer microsatélites (SSR) del género *Oenothera*.

Fuente: (Biorad, 2011)

Teniendo los resultados de Ta más óptimos para cada par de primers se procedió a realizar una amplificación con las muestras de los tratamientos de extracción con los que se obtuvieron mejores resultados que para este caso fueron los de la técnica de extracción 3 para las variedades de *Oenothera* evaluadas en la investigación, logrando estandarizar de forma óptima los nueve pares de primers microsatélites (SSR), estos resultados pueden ser visto en la Figura 20.

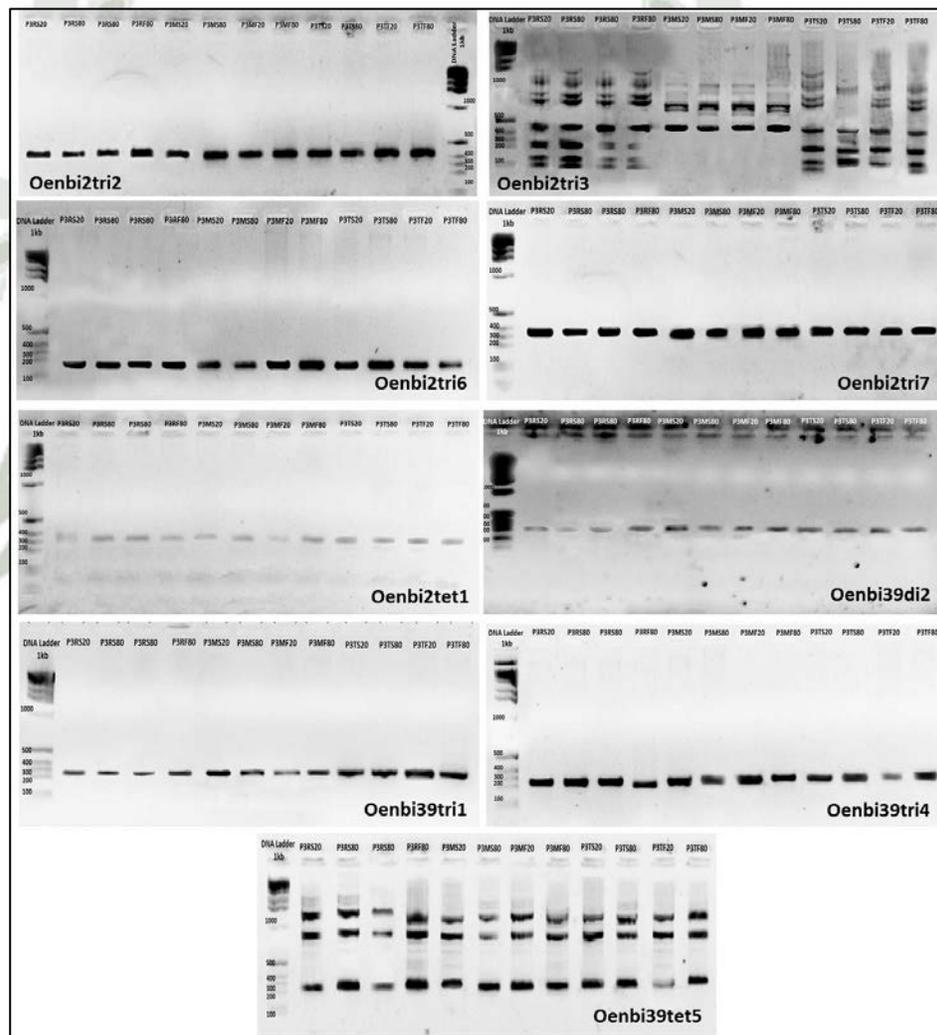


Figura 20. Gradientes de temperatura para los primer microsatélites (SSR) del género *Oenothera*.

Fuente: (Biorad, 2011)

4.1.5. Análisis de costos.

Con respecto al análisis de costo se realizó una análisis de comparación de costos para poder identificar cuan beneficiosa económicamente resultaba la técnica de extracción 3 que fue la que nos dio los mejores resultados, para lo cual realizamos el presupuesto general de todos los reactivos usados en un global del costo de cada reactivo como separadamente para cada uno de las técnicas de extracción evaluadas en el presente trabajo, realizando una sumatoria de gastos para una reacción y cien reacciones, para mayor información ver el Anexo 25.

Realizado el análisis de costos para la técnica de extracción 3 comparándola con el control comercial y las otras técnicas de extracción evaluadas, podemos ver que en la técnica de extracción 3 obtenemos un resultado total de gasto de 40.64 nuevos soles para cien reacción ósea 0.41 nuevos soles para una reacción, lo cual al ser comparado con el costo del control comercial que es un precio similar a otros kit de extracción comerciales se tiene un porcentaje de ahorro de 97.95 % y comparándolo con las otras técnicas de extracción evaluadas también se puede apreciar que la técnica de extracción 3 es la que nos da los mejores porcentajes de ahorro, por lo cual la técnica de extracción 3 no solo nos presenta resultados de extracción y amplificación adecuados sino que también nos proporciona una técnica de extracción económica. Para mayores detalles ver la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de costos comparativo para las técnicas de extracción evaluadas.

| ANÁLISIS | PARA 100 RX | PARA 1 RX | % |
|-------------------------|-------------|-------------|-------|
| | COSTO (S/.) | COSTO (S/.) | |
| Dneasy (Kit Comercial) | 3085.29 | 30.86 | - |
| Técnica de extracción 1 | 1735.95 | 17.36 | 43.75 |
| Técnica de extracción 2 | 2141.59 | 21.49 | 30.36 |
| Técnica de extracción 3 | 1662.89 | 16.63 | 46.11 |

Fuente: Propia.

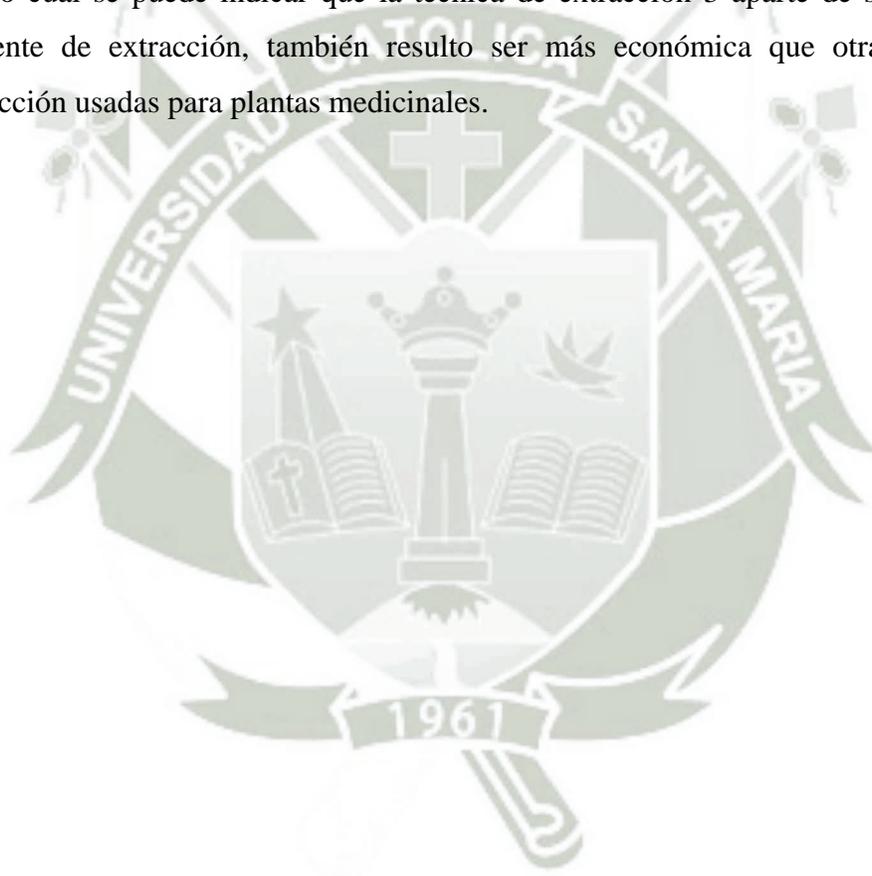
Como se pudo apreciar en los resultados, al comparar el precio para cien reacciones y una reacción de la técnica de extracción 3 que fue la técnica con la cual se pudo estandarizar la extracción de todas las especies de *Oenothera* evaluadas en la presente investigación, comparadas con el precio para cien reacciones y una reacción del control comercial usado y las otras dos técnicas de extracción evaluadas se obtuvo mejores porcentajes de ahorro con la técnica de extracción 3.

Estos resultados se dan ya que para la técnica de extracción 3 se deja de usar insumos costosos que tradicionalmente se usan en las técnicas de extracción convencionales como es el caso del nitrógeno líquido ya que en esta técnica la trituración del tejido vegetal se realiza en bolsas de polipropileno con ayuda de un tubo de ensayo y combinado con el CTAB para evitar la degradación del ADN.

Por otro lado también se puede apreciar un menor costo ya que se disminuye considerablemente la cantidad de reactivo utilizado en algunas etapas de la extracción,

con lo cual se disminuyen los gastos y se pudo obtener una técnica de extracción eficiente y con un costo muy bajo con respecto a kit comerciales y técnicas convencionales de extracción.

Del mismo modo la técnica de extracción estandarizada para plantas medicinales por Sharma, et al., 2010; que evita el uso de nitrógeno líquido, nos da un gasto total para 100 reacciones de 1740.32 nuevos soles, que al ser comparado con la técnica de extracción 3, la cual utiliza dos concentraciones de CTAB (2X y 10X) y evita el uso de nitrógeno líquido, nos da un gasto total para 100 reacciones de 1662.89 nuevos soles. Por lo cual se puede indicar que la técnica de extracción 3 aparte de ser una técnica eficiente de extracción, también resulto ser más económica que otras técnicas de extracción usadas para plantas medicinales.





CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

PRIMERA. El efecto de la conservación con respecto a la concentración de las muestras recolectadas de *Oenothera*, es significativamente mejor para las muestras conservadas en fresco ya que presento resultado de concentración superiores a las muestras conservadas en silica gel.

SEGUNDO. Después de realizar los diferentes tratamientos para la extracción del ADN genómico de las tres especies evaluadas de *Oenothera*, se obtuvo como mejores resultados para *Oenothera rosea*, *Oenothera multicaulis* y *Oenothera tetraptera* que los tratamientos de la técnica de extracción 3. Estandarizando una técnica adecuada de extracción para la realización de análisis moleculares para las tres especies de *Oenothera* evaluadas.

TERCERO. La calidad del ADN genómico obtenidos para las tres especies evaluadas de *Oenothera*, se observó que todos los tratamientos de la técnica de extracción 3 dieron resultados de amplificación óptimos.

CUARTO. Se estandarizó correctamente cada uno de los nueve pares de primers microsatélites (SSR) diseñados y estandarizados para *Oenothera biennis* para las tres especies de *Oenothera* evaluadas, con lo cual se deja esta información para posteriores trabajos de genética poblacional.

QUINTO. El análisis de costos de las técnicas de extracción utilizadas comparando con kit comerciales, se pudo ver claramente que los precios obtenidos por la técnica de extracción 3 son muchos menores y con mejores beneficios para el estudio de este tipo de especies.

5.2 RECOMENDACIONES

- Ya que en el presente trabajo se llegó a estandarizar nueve primers SSR para las tres especies de *Oenothera* estudiadas, es conveniente realizar un estudio de genética poblacional de estas tres especies ya que esto ayudaría a conocer mejor las especies y proteger los recursos naturales.
- Contando con una técnica de extracción adecuada para estas especies de *Oenothera*, es importante realizar trabajos en el campo de la biotecnología molecular que sean esenciales para determinar el perfil químico de las plantas medicinales y facilitar la producción de principios activos.
- Sería importante también realizar trabajos de extracción con otros tejidos vegetales (raíces, semillas) de estas especies de *Oenothera*, para poder certificar si esta técnica de extracción sería también adecuada.
- Realizar trabajos similares en otras especies medicinales como por ejemplo *Cuphea aequipetala* (Hierba del cancer), *Eleutherine bulbosa* (Yahuar Piri Piri), *Chuquiraga spinoza* (Huamanpinta), *Plantago major L.* (Llanten), *Taraxacum officinale* (Pilli Pilli), entre otras; que presente alta concentraciones de metabolitos secundarios tale como polifenoles, polisacaridos, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

National Center for Complementary and Alternative Medicine. (2005). Rheumatoid Arthritis and Complementary and Alternative Medicine. *NCCAM - PubMed* - , 1-23.

Aaron, L., Rieseberg, L. H., Adams, R. P., Do, N., & Ge-lin, Z. (1990). A Method for Collecting Dried Plant Specimens for DNA and Isozyme Analyses, and the Results of a Field Test in Zinjiang, China. *Annals of the Missouri Botanical Garden* , 77 (4), 859-863.

ABC-Labs. (2012, 07 25). *ACD/ChemSketch*. Retrieved 03 28, 2013, from <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>

Alaey, M., Naderi, R., Vezvaei, A., Lhaligni, A., & Salami, A. (2005). Comparing study between four different methods of genomic DNA extraction from *Cyclame persicum* Mill. *International Journal of Agriculture & Biology* , 7 (6), 882-884.

Alagón Talaverano, R. I., & Rosas Raa, M. A. (2008). CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MASHUA (*TROPAEOLUM TUBEROSUM*) DE LAS COMUNIDADES CAMPESINAS DE CUSCO Y HUANUCO, MEDIANTE MARCADORES AFLPS. Tesis para optar por el título de Ingeniero Biotecnólogo. *Biblioteca de la Universidad Carolica de Santa Maria* .

Arun, D. S., Prabhjot, K. G., & Prabhjeet, S. (2002). DNA Isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant. Biol. Rep.* , 20, 415-415.

Asturnatura. (2013). *Oenothera Rosea L.* Retrieved Febrero 27, 2013, from <http://www.asturnatura.com/especie/oenothera-rosea.html>

Bandaranayake, W. M. (2002). Bioactivites, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecol Manage.* , 10, 421-452.

Barrick, J. (2012, 09 04). *Barrick Lab*. Retrieved 06 16, 2013, from Recommended to use Qubit when you think accuracy matters, or when NanoDrop gives a reading of <50

ng/ μ l. Electrophoresis should be used anytime trying to quantitate subspecies of DNA.:
<http://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/DNAConcentrationDetermination>

Becker, J. M., Caldwell, G. A., & Zachgo, E. A. (1996). *Biotechnology: A laboratory course. Academic press*, 216.

Berbis, P., Hesse, S., & Privat, Y. (1999). Essential fatty acids and the skin. *Allerg Immunol*, 22 (6), 225-231.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica* (6ta Ed. ed.). (J. M. Macarulla, Trans.) Nueva York, Estados Unidos: Reverte S.A.

Berkeley, California. (2013). *Calflora Database - Oenothera*. Retrieved Febrero 27, 2013, from <http://www.calflora.org/cgi-bin/specieslist.cgi?where-genus=Oenothera&orderby=taxon&ttime=1230695391>

Biorad. (2011). *Quantity One 1-D Analysis Software*. Retrieved 03 30, 2013, from <http://www.biorad.com/prd/en/AL/adirect/biorad?ts=1&cmd=BRCatgProductDetail&vertical=LSR&catalogID=1de9eb3a-1eb5-4edb-82d2-68b91bf360fb>

BIOTED. (2012). *Donapure "Plantas y Hongos"*. Retrieved 03 28, 2013, from <http://www.bioted.es/documentos/DANAPURE%20plantas%20y%20hongos.pdf>

Borse, T., Joshi, P., & Chaphalkar, S. (2011). Biochemical role of ascorbic acid during the extraction of nucleic acids in polyphenol rich medicinal plant tissues. *Plant Molecular Biology & Biotechnology*, 2 (2), 1-7.

Bourre, J. M. (2005). Dietary omega-3 fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *The Journal of Nutrition Health and Aging*, 9 (1), 31-38.

Cameron, N., & Cotter, M. (1993). Potential therapeutic approaches to the treatment or prevention of diabetic neuropathy: evidence from experimental studies. *Diabetic medicine* , 46 (2), 31-37.

Centro Internacional de la Papa. (1998). *Protocolos de Laboratorio de Biología Molecular*. Lima-Perú.

Cheng, F. S., Brown, S. K., & Weeden, N. F. (1997). A DNA EXTRACTION PROTOCOL FROM VARIOUS TISSUES IN WOODY SPECIES. *HortScience* , 32 (5), 921-922.

Choudhary, K., Mathur, N., Choudhary, O. P., & Pillai, U. (2008). Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh leaves of Vigna species suitable for rapid and restriction digestion. *Advances in biological research* , 2 ((5-6)), 83-89.

Coleman, G., & Tsongalis, G. (2006). *Molecular Diagnostics: For the clinical laboratorian, second edition*. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC.

Colter, A. L., Cutler, C., & Meckling, K. A. (2008). Fatty acid status and behavioural symptoms of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in adolescents: A case-control study. *Nutrition Journal* , 7 (8).

Comide, M. T. (2000). Diversidad genética y marcadores moleculares. *CNIC* .

CONABIO. (2009, 8 4). *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*. Retrieved 03 25, 2013, from *Oenothera Biennis*: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenothera-rosea/fichas/ficha.htm#8>. Enlaces en internet

CONABIO. (2009). *Onagraceae - Oenothera tetraptera Cav. Linda tarde blanca*. Retrieved 07 2, 2013, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenothera-tetraptera/fichas/ficha.htm>

Couch, J. A., & Fritz, P. J. (1990). Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. *Plant Molecular Biology Reporter* , 8 (1), 8-12.

Dabo, S. M., Mitchell, E. D., & Melcher, U. (1993). A methos for the isolation of nuclear DNA from cotton (Gassypium Leaves. *Anal Biochem.* , 210 (1), 34-38.

D'Almeida, A., Carter, J. P., Anatol, A., & Prost, C. (1992). Effects of a combination of evening primrose oil (gamma linolenic acid) and fish oil (eicosapentaenoic + docahexaenoic acid) versus magnesium, and versus placebo in preventing pre-eclampsia. *Women Health* , 19 (2-3), 117-131.

De La Cruz, J. P., Martin-Romero, M., Carmona, J., Villalobos, M., & Sanchez de la Cuesta, F. (1997). Effect of evening primrose oil on platelet aggregation in rabbits fed an atherogenic diet. *Thromb Res.* , 141-149.

Dehestani, A., & Kazemi Tabar, S. K. (2007). A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites. *Asian J. Plant Sci.* , 6, 977-981.

Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A Plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* , 1 (4), 19-21.

Deng, Y. C., Hua, H. M., Li, J., & Lapinkase, P. (2001). Studies on the cultivation and uses of Evening Primrose (*Oenothera* spp.) in China. *Economic Botany* , 19 (2-3), 83-92.

Deshmukh, V. P., Thakare, P. V., Chaudhari, U. S., & Gawande, P. A. (2007). A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of terminalia arjuna (Roxb.) Wight and Argot. *Electronic Journal of Biotechnology* , 10 (3), 468-472.

Diaz Porras, H. V., Fuertes Ruiton, C., Whu Whu, D., Jurado Teixeira, B., Roque Alcarraz, M., & Arroyo Acevedo, J. (2011). Efecto antiagregante plaquetario in vivo y fibrinolítico in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre). *Revista de la Sociedad Química del Perú* , 77 (3), 225-234.

Diaz Porras, H. V., Fuertes Ruitón, C., Whu Whu, D., Jurado Teixeira, B., Roque Alcarraz, M., & Arroyo Acevedo, J. (2011). EFECTO ANTIGREGANTE PLAQUETARIO in vivo Y FIBRINOLITICO in vitro DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Oenothera rosea* Aiton (Chupasangre). *Sociedad Quimica del Perú* , 225-234.

Dietrich, W., Wanger, W. L., & Raven, P. H. (1997). *Systematics of Oenothera section Oenothera subsection Oenothera (Onagraceae)* (Vol. 4). The American Society of Plant Taxonomists.

Discover Life. (2013). *Discover Life*. Retrieved 01 15, 2013, from <http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Oenothera>

Doyle, J. J. (1991). DNA Protocols for plants. *Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series H, Cell Biology.* , 57, 283-293.

Doyle, J. J., & Dickson, E. E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* , 36, 715-722.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* , 19, 11-15.

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preapration procedure for fresh plant tissue. *Focus* , 12, 13-15.

þekerroulu, N., & Ozguven, M. (2006). Effects of different nitrogen doses and row spacing applications on yield and quality of *Oenothera biennis* L. grown in irrigated low land and unirrigated dryland conditions. *Turk J Agric For* , 125-135.

Ernest, H. B., Penedo, M. C., May, B. P., Syvanen, M., & Boyce, W. M. (200). MOLECULAR TRACKING OF MOUNTAIN LIONS IN THE YOSEMITE VALLEY REGION IN CALIFRONIA: GENETIC ANALYSIS USING MICROSATELLITES AND FAECAL DNA. *Molecular Ecology* , 16, 551-558.

Escalante, P. (2010, 03 10). *Blog del Instituto de biología de la UNAM*. Retrieved 07 03, 2013, from Preservación de tejidos vegetales para extracción de ADN genómico utilizando gel de sílice: <http://mexbolibunam.wordpress.com/2010/03/17/preservacion-de-tejidos-vegetales-para-extraccion-de-adn-genómico-utilizando-gel-de-silice/>

Estrada Sánchez, J. (2005, 10 15). *Manual de recolección de muestras botánicas*. Retrieved 07 03, 2013, from <http://www.botanica.ciens.ula.ve/Herbario/cuaderno.pdf>

Evans, M. E., Hearn, D. J., Hahn, W. J., Spangle, J. M., & Lawrence Venable, D. (2005). CLIMATE AND LIFE-HISTORY EVOLUTION IN EVENING PRIMROSES (OENOTHERA, ONAGRACEAE): A PHYLOGENETIC COMPARATIVE ANALYSIS. *Evolution*, 59 (9), 1914–1927.

Fang, G., Hamrnar, S., & Grumet, R. (1992). a quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biofeedback*, 13 (1), 52-54.

Ferreira, M. E., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético* (1ra Ed. ed.). Brasilia, Brasil: Ministerio de Agricultura y del Abastecimiento (MA), Empresa Brasileora de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA) y Centro Nacional de Investigación de Recursos Genéticos y Biotecnología CENARGEN.

Fonseca Mendoza, D., Mateus Arbelaez, H., & Contreras Bravo, N. (2012). *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicación en Genética Básica* (1era. Ed. ed.). Colombia: Universidad del Rosario.

Frifelder, D. (1991). *Técnicas de Bioquímica y Biología molecular* (1ra Ed. ed.). Mexico: Reserve Mexicana.

Gaby, A. R. (2006). Natural remedies for scleroderma. *Altern Med Rev.*, 11 (3), 188-195.

Gankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., & Gruden, K. (2006). Critical Points of DNA Quantification by Real-time PCR - Effects of DNA Extraction Method and Sample

Matrix on Quantification of Genetically Modified Organisms. *BMC Biotechnology* , 6 (37).

Garner, T. W. (2002). Genomic size and microsatellites: the effect of nuclear size on amplification potential. *Genome* , 45, 212-215.

Ghasemnezhad, A. (2007). *Investigations on the Effects of Harvest Methods and Storage Conditions on Yield, Quality and Germination of Evening Primrose (Oenothera Biennis L.) Seeds "Disseration Submitted for the degree of doctor of Agricultural Science"*. Giessen: Justuts Liebig University.

Gomez Flores, R., Reyna Martinez, R., Tamez Guerra, P., & Quintanilla Licea, R. (2012). Antibacterial Activity of *Oenothera rosea* (L'Hér) Leaf Extracts. *British Journal of Medicine & Medical Research* , 2 (3), 396-404.

Gonzales Bellido, J., Lechuga Chacón, A. M., & Serrano Flores, C. (2001). ESTUDIO FITOQUÍMICO COMPARATIVO DE *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (Yawar Chonq'a). *Tesis para optar el grado de Doctor en Ingenieria Quimica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. (17).

Gonzáles Fortes, G. M. (2009). *Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y microsatélite en rodaballo (Scopthamus maximus L.)*. Universidad de santiago de compostela.

Gonzales, D. O., Palacios, N., & Tohme, J. (1995). *Protocolos para Marcadores Moleculares* (1era Ed. ed.). Cali, Colombia: Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Goodwin, W., Inacre, A., & Hadi, S. (2007). *An Introduction to Forensic Genetics*. Wiley.

Grattapaglia, D. (1994). Genetic mapping of quantitatively inherent economically import traits in Eucalyptus- PhD. Dissertation. *North Carolina State University* , 289.

Griel, A. E., Kris-Etherton, P. M., Hilpert, K. F., Zhao, G., Wets, S. G., & Corwin, R. L. (2007). An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. *Nutritional Journal* , 6 (2).

Guillemaut, P., & Maréchal-Drouard, L. (1992). Isolation of plant DNA: a fast inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter* . , 10, 60-65.

Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K., & Dhinesh, T. (2011). Standardization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of Suaeda sp. *Asian Journal of Biotechnology* , 3 (5), 486-492.

Harris, N. M., Crook, T. J., Dyer, J. P., Solomon, L. Z., Bass, P., Cooper, A. J., et al. (2002). Intravesical meglumine gamma-linolenic acid in superficial bladder cancer: an efficacy study. *Eur Urol* , 42 (1), 39-42.

Hemphill, J., Basal, H., & Wayne, C. (2006). Screening method for salt tolerance in cotton. *American Journal of Plant Physiology* . , 1, 107-112.

Herraéz, Á. (2012). *BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA*. ELSEVIER.

Honermeier, B., & Ghasemnezhad, A. (2008). A yield, oil constituents, and protein content of evening primrose (*Oenothera biennis* L.) seeds depending on harvest time, harvest method and nitrogen application. *Industrial Crops and Products* . , 28 (1), 17-23.

Honermeier, B., Ghasemnezhad, A., & Beiten, S. (2005). Effect of different autumn and spring sowing times on seed yield and seed quality of evening primrose (*Oenothera biennis* L.). *Journal of Medicinal and Spice* , 187-193.

Höss, M., & Paabo, S. (1993). DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* , 3913-3914.

Ibrahim, R. H. (2011). A modified CTAB protocol for DNA extraction from young flower petals of some medicinal plant species. *Geneconserve* , 10 (40), 165-182.

- Inoue, N., Akasaka, K., Arimoto, H., & Ohru, H. (2006). Effect of ascorbic acid on the chemiluminescence of polyphenols. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, *70*, 1517-1520.
- Jingade Anuradha, H., Vijayan, K., Chirakara V., N., & Manjula, A. (2013). A novel and efficient protocol for the isolation of genomic DNA from mulberry (*Morus L.*). *Emir. J. Food Agric.*, *25* (2), 124-131.
- John, M. E. (1992). An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acid Res.*, *20* (9), 2381.
- Jude, C. I., Catherine, C. I., & Ngozi, M. I. (2009). CHEMICAL PROFILE OF TRIVAX PROCUMBENS IINN. *Pak. J. Nutr.*, 548-550.
- Kang, H. W., Cho, Y. G., Yoon, U. H., & Eun, M. Y. (1998). A Rapid DNA Extraction Method for RFLP and PCR Analysis from a Single Dry Seed. *Springer*, *16* (1), 90-90(1).
- Katterman, F. H., & Shattuck, V. I. (1983). An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolics, terpenoides and taninos. *Preparative Biochemistry*, *13*, 347-359.
- Kazemi, M., & Seyed Hajizadeh, H. (2012). An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Alcea rosea*. *Journal of Agriculture Technology*, *8* (1), 319-326.
- Keb-llanes, M., Gonzáles, G., Chi-Manzanero, B., & Infante, D. (2002). A Rapid and Simple Method for Small-Scale DNA Extraction in *Agaveceae* and Other Tropical Plants. *Plant Molecular Biology*, *20* (3), 299.
- Keer, J. T., & Birch, L. (2008). *Essentials Of Nucleic Acid Analysis: A Robust Approach*. RSCPublishing.

Keizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B., & Prosek, M. (2006). Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction *Acta. Agriculturae Slovenia* , 87 (2), 433-444.

Kim, J. J., Yu, S. H., Jeon, W. M., & Kwak, H. S. (2005). The Effect of Evening Primrose Oil on Chemical and Blood Cholesterol Lowering Properties of Cheddar Cheese. *Department of Food Science and Technology, Sejong University, Seoul.* , 143 (747), 450-458.

Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Betiku, E., & Shonukan, O. O. (2003). A home made kit for plasmid DNA mini preparation. *Alf. J. Biotechnol.* , 2 (4), 88-90.

Kulkarni, M., Borse, T., & Chaphalkar, S. (2001). Isolation and purification of genomic DNA from Black Plum (*Eugenia Jambolana Lam.*) for analytical applications. *International Journal of Biotechnology.* , 3, 49-55.

Lagercrantz, U., Eleengreen, H., & Andersson, L. (1993). The abundance of microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research* , 21, 1111-1115.

Larson, E. L., Bogdanowicz, S. M., Agrawal, A. A., Johnson, M. T., & Harrison, R. G. (2008). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in common evening primrose (*Oenothera biennis*). *Molecular Ecology Resources* , 8 (2), 434-436.

Li, Y. X., Su, Z. X., & Chen, F. (2002). Rapid Extraction of genomic DNA from leaves and breaacts of dove tree (*Davidia involucreta*). *Plant Molecular Biology Reporter* , 20 (2), 185.

Llerena, S., Segovia, C., Salinas, N., Orlando de Oliveira, L., & Jadán, M. (2013). Estandarización de técnicas moleculares para amplificar regiones cloroplastídicas y nucleares en el material genético de *Cedrela odorata*, *Cedrela montana* y *Cedrela fissilis* en el Ecuador. *Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE 2013* .

Lodhi, M. A., Daly, M. A., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1995). A molecular marker based linkage map of *Vitis*. *Genome* , 38 (4), 786-794.

López Mora, P. A., López Gutiérrez, A. M., & Marulanda Ángel, M. L. (2011). Estandarización de la extracción de ADN genómico en *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. y *Cordia alliodora* (Ruiz&Pav.) Okén. *Universidad Tecnológica de Pereira - Ciencias Ambientales.* , 28-41.

Low Dog, T. (2005). Menopause: a review of botanical dietary supplements. *Am J Med* , 118.

Lowe, A., Harris, S., & Ashton, P. (2004). Ecological genetics; design, analysis, and application. *Blackwell Science.* , 326.

Mahesh, S., & Vedamurthy, A. (2003). *Biotechnology-4: Including Recombinant DNA Technology, Environmental Biotechnology, Animal Cell Culture*. New age international publishers.

Mann, J. (1995). *Murder, magic and medicine*. Nueva York: Oxford University Press.

Manoj, K., Tushar, B., & Sushama, C. (2007). Isolation and purification of genomic DNA from Black Plum (*Eugenia jambolana* Lam.) for analytical applications. *Int. J. Biotechnol Biochem* , 3 (1), 49-55.

Marquez Flores, Y. K., Montellano Rosales, H., Campos Aldrete Ma., E., & Meléndez Camargo Ma., E. (2009). Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait in the rat. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* , 11-16.

Marquez Flores, Y. K., Montellano Rosales, H., Campos Aldrete, E. M., & Melendez Camargo, E. M. (2009). Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait in the rat. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* , 40 (3), 11-16.

- Marulanda, M., Claroz, J., & López, A. (2006). Caracterización molecular de progenies de aliso alnus acuminat H.B.K ssp acuminata, mediante marcadores AFLP. *Scientia et Technica* , 32, 463-468.
- Matasyoh, L. G., Wachira, F. N., Kinyua, M. G., Thairu, A. W., & Mukiyama, T. K. (2008). Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* L. from Kenya. *Africa Journal of Biotechnology* , 7 (5), 557-564.
- Mazid, M., Khan, T. A., & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biol. Med.* , 3, 232-249.
- Mehboob-ur-, R., Tanqir Ahmad , M., Nazneen, A., Muhammad, A., Rashid, A., Iftikhar, A. K., et al. (2002). Optimization of PCR Conditions to amplify microsatellite loci in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Genomic DNA. *International Journal of Agriculture & Biology* , 282-284.
- Mendiola, C. (2009, Abril 15). *Biodiversidad y Desarrollo en el Perú*. Retrieved Febrero 23, 2013, from http://www.peruecologico.com.pe/lib_c21_t09.htm
- Michiels, A., Ende, W. V., Tucker, M., Riet, L. V., & Laere, A. V. (2003). Extration of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry* , 315 (1), 85-89.
- Microsoft. (2010). *Microsoft Office*. Retrieved 03 30, 2013, from <http://office.microsoft.com/es-mx/>
- Missouri Botanical Garden. (2013). *Tropicos*. Retrieved Febrero 27, 2013, from <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx>
- Mohammadi, A., Abdolmajid, M., & Dinarvand, Z. (2009). Direct transfer of polyphenol oxidase on carbon nanotube surface: aplicattion in biosensing. *International Journal Electrochemical Science* , 495-905.

Mohapatra, T., Sharma, R. P., & Chopra, V. L. (1992). Cloning and use of low copy sequence genomic DNA for RFLP analysis of somaclones in mustard (*Brassica juncea* L. Czern and Corss). *Current Science* , 62, 482-484.

Moller , E. M., Bahnweg, B., Sanderman, H., & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res.* , 20 (22), 6115-6116.

Morris, G., & Acton, E. (2003). *Patent No. 2 236 237*. España.

Moyo, M., Amoo, S. O., Bairu, M. W., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2008). Optimising DNA isolation for medicinal plants. *South African of Biology.* , 74, 771-775.

Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* , 64 (5), 56-61.

Muñoz, O., Montes, M., & Wilkomirsky, T. (2001). *Plantas medicinales de uso en Chile - química y farmacología* (3 ed.). Santiago de Chile: Universitaria.

Nakum, N. M., Mandaliya, V. B., Pandya, R. V., & Taker, V. S. (2011). A simple and efficient protocol for high quality of DNA from *Vitis quadrangularis* L. *Electronic Journal of Plant Breeding* , 2 (1), 87-95.

Narayanan, C., Dubey, S., Wali, S. A., Shukla, N., Kumar, R., Mandal, A. K., et al. (2006). Optimization of DNA extraction for ISSR studies in *Tectona Grandis* L.f. an important forest tree species. *African Journal of Biotechnology* , 5 (13), 1220-1223.

National Institute for Enviromental Studies, Japan. (2011). *Invasive Especies of Japan*. Retrieved 03 25, 2013, from *Oenothera Biennis*: <http://www.nies.go.jp/biodiversity/invasive/DB/detail/80240e.html>

National Institutes of Health. (2013, 02 27). *MedlinePlus*. Retrieved 03 10, 2013, from Evening primrose oil: *MedlinePlus Supplements*: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/1006.html>

Natural Standard Monografía. (2010, Abril 24). *Aceite de Onagra (Oenothera Biennis)*. Retrieved Febrero 24, 2013, from <http://holadoctor.com/es/hierbas-y-suplementos-a-z/aceite-de-onagra-oenothera-biennis-l>

NCBI. (2013, 4 1). *GenBank*. Retrieved 4 1, 2013, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

NCBI. (2013). *PubChem*. Retrieved 01 16, 2013, from <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2007). *LEHNINGER. PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA* (5ta Ed. ed.). Omega.

Nieman, R. H., & Poulsen, L. L. (1963). SPECTROPHOTOMETRIC ESTIMATION OF NUCLEIC ACID OF PLANT LEAVES. *Plant Physiol* , 38, 31-35.

Odukoya, O. A., Agha, I., & Llori, O. O. (2007). Immune Boosting Herbs: Lipid peroxidation in liver homogenate as index of activity. *Journal of Pharmacology and Toxicology* , 2., 190-195.

Oxholm, P., Manthorpe, R., Prause, J., & Horrobin, D. (1986). Patients with primary Sjögren's syndrome treated for two months with evening primrose oil. *Scand J Rheumatol* , 15 (2), 103-108.

Pandey, R. N., Adams, R. P., & Flournoy, L. E. (1996). Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol Biol Report.* , 14, 17-22.

Paxton, R. J., Ayasse, M., Field, J., & Soro, A. (2002). Complex sociogenetic organization and reproductive skew in a primitively eusocial sweat bee, *lasioglossum malachurum*, as revealed by microsatellites. *Molecular ecology* , 11, 2405-2416.

Pellegrina, C., Padovani, G., Mainente, F., Zoccatelli, G., Bissoli, G., Mosconi, S., et al. (2005). Anti-Tumour Potential Of A Gallic Acid-Containing Phenolic Fraction From *Oenothera Biennis*. *Cancer Letters* , 226 (1), 17-25.

Peterson, D. G., Boehm, K. S., & Stack, S. M. (1997). isolation of miligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant. Mol. Biol. Rep.* , 15, 148-153.

Phillips, W., Rodríguez, H., & Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). *Serie técnica informe técnico # 252. CATIE.* , 183.

Pirtilä, M. A., Hirsikorpi, M., Kämäräinen, T., Jaakola, L., & Hohtola, A. (2001). DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* , 19 (3), 273.

Porebski, S., Grant Bailey, L., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter* , 15 (1), 8-15.

Posso Duque, D., & Ghneim Herrera, T. (2008). Uso de Marcadores Microsatélites para la Estimación de Diversidad Genética en Plantas. *Ediciones IVIC* .

Pye, J., Mansel, R., & Hughes, L. (1985). Clinical experience of drug treatment for mastalgia. *Lancet* .

Qiagen - Sample & Assay Technologies. (2003). *DNeasy Plant Mini Kit*. Retrieved Marzo 12, 2003, from <http://www.qiagen.com/Products/Catalog/Sample-Technologies/DNA-Sample-Technologies/Genomic-DNA/DNeasy-Plant-Mini-Kit#productdetails>

QIAGEN. (2000, 08). *DNeasy Plant Maxi Kit Handbook*. Retrieved 03 31, 2013, from http://www.ebiotrader.com/buyf/productsf/qiagen/1015107hbdny_0800ww.pdf

- Rallo, P., Belaj, A., De la Rosa, R., & Trujillo, I. (2002, 08 1). *Marcadores moleculares*. Retrieved 07 02, 2013, from http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
- Rauwolf, U., Golczyk, H., Meurer, J., Herrmann, R. G., & Greiner, S. (2008). Molecular Market Systems for *Oenothera* Genetics. *Genetics Society of America* , 180 (3).
- Real Jardín Botánico de Madrid. (2010). *Oenothera Biennis*. Retrieved 03 25, 2013, from <http://www.anthos.es/index.php>
- Robert, H. J. (2001). *Plant genotyping [electronic resource]: the DNA fingerprinting of plants*. CABI Publishing.
- Roersch Ph. D., C. (1993). Uso de Plantas Medicinales en el Sur Andino de Perú y la Republica Dominicana. *i Festival Nacional de Plantas Medicinales en Venezuela. San Cristobal* , 1-17.
- Roersch PhD., C. (1993). Uso de Plantas Medicinales en el Sur Andino de Perú y la Republica Dominicana. San Cristobal, Venezuela: Instituto de Medicina Dominicana.
- Rostanski, K. (1985). The classification of subsection *Oenothera* (section *Oenothera*, *Oenothera* L., Onagraceae). *Feddes Report* , 3 (14), 1-2.
- Rowntree, J. K., Cowan, R. S., & Leggett, M. (2010). Which moss is which? Identification of the threatened moss *Orthodontium gracile* using molecular and morphological techniques. *Conserv. Genet.* , 11, 1033-1042.
- RSC. (1995). *General principles of good sampling practice*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

- Rüber, L., Meyer, A., Sturmbauer, C., & Verheyen, E. (2001). Population structure in two sympatric species of the lake tanganyika cichlid tribe Eretmodini: evidence for introgression. *Molecular Ecology*, *11*, 1207-1225.
- Saeid, A.-R. (2011). Comparison of methods for isolating high quality DNA from sage (*Salvia Officinalis*). *Journal of Medicinal Plants Research*, *5* (6), 938-941.
- Sagástegui Alva, A., Dillon, M. O., Sánchez Vega, I., Leiva González, S., & Lezama Asencio, P. (2003). Diversidad Florística del Norte de Perú. *Revista del Herbario HAO*, 111-120.
- Sahasrabudhe, A., & Deodhar, M. (2010). Standardization of DNA extraction and optimization of RAPD-PCR conditions in *Garcinia indica*. *Int. J. Bot.*, *6*, 293-298.
- Salerno, C. (2011). *Onagra*.
- Sambrook, J., & Russel, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press - New York: Third Edition.
- Satya S., N., A d'Orgeix, C., & Sayre, B. L. (2011). Optimization of PCR conditions to amplify microsatellite loci in the bunchgrass lizard (*Sceloporus slevini*) genomic DNA. *BMC Res Notes*, *4* (26), 11-14.
- Schölkens, B. A., Gehring, D., Schlotte, V., & Weithmann, U. (1982). Evening primrose oil, a dietary prostaglandin precursor, diminishes vascular reactivity to renin and angiotensin II in rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, *8* (3), 273-285.
- Segal Kischinevzky, C. A., & Ortega Lule, G. J. (2005). *Manual de Practicas Biologia Molecular de la Celula I* (1era Ed. ed.). Mexico: Publidisa.
- Senapati, S., Barnerjee, S., & Gangopadhyay, D. (2008). Evening primrose oil is effective in atopic dermatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.*, *74* (5), 447-452.
- Sevilla, R., & Holle, M. (2004). *Recursos Genéticos Vegetales*. Luis Leon Asociados.

- Sghaier, A. (2005). Genomic DNA isolation from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) leaves. *African Journal of Biotechnology* , 4, 862-866.
- Shahidi, F., Amarowicz, R., & Wettasinghe, M. (2007). Antioxidant activity of phenolic extracts of evening primrose (*Oenothera Biennis*): a preliminary study. *Journal of Food Lipids* , 4 (2), 75-86.
- Shahidi, S., Wettasingue, M., Amarowicz, R., & Yuehua, H. (2007). ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC EXTRACTS OF EVENING PRIMROSE (*OENOTHERA BIENNIS*): A PRELIMINARY STUDY. *Journal of Food Lipids.* , 4 (2), 75-86.
- Shankar, K., Chavan, L., Shinde, S., & Patil, B. (2011). An Improved DNA Extraction Protocol From Four in vitro Banana Cultivars. *Asian Journal of Biotechnonology* , 1, 84-90.
- Sharma, A. D., Gill, P. K., & Singhdna, P. (2002). Isolation from dey and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter* , 20 (4), 415.
- Sharma, P., Joshi, N., & Sharma, A. (2010). Isolation of genomic DNA from medicinal plants without liquid nitrogen. *Indian Journal of experimental biology* , 48, 610-614.
- SIDTA. (2002). *Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal*. Retrieved 07 02, 2013, from <http://www.jcyLes/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>
- Singh, B., Yadav, R., Singh, H., Singh, G., & Punia, A. (2010). Studies on effect of PCR-RAPD conditions for molecular analysis in asparagus (*Satawari*) and Aloe Vera medicinal plants. *Aust. J. Basic Applied Sci.* , 4, 6570-6574.
- Soeken, K. L., Miller, S. A., & Ernst, E. (2002). Herbal medicine for the treatment of reumatoid arthristis a systematic review. *Rheumatology* , 42 (5), 652-659.

Somma, M. (2012). *Extracción y Purificación de ADN*. Organización Mundial de la Salud - Oficina Regional para Europa.

Srivastava, A., Mansel, R. E., Arvind, N., Prasad, K., Dhar, A., & Chabra, A. (2007). Evidence-based management of Mastalgia: a meta-analysis of randomised trials. *Breast*, 16 (5), 503-512.

StatPoint. (2010). *Statgraphics Centurion*. Retrieved Marzo 01, 2013, from http://www.statgraphics.com/centurion_contents.htm

Sugano, M., Ishida, T., & Takashi, I. (1986). Effects of various polyunsaturated fatty acids on blood cholesterol and eicosanoids in rats. *Agric. Bio. Chem*, 50 (9), 2335-2340.

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA AND PROTEIN EXTRACTION: THE PAST AND THE PRESENT. *J. Biomed. Biotechnology*, 10.

Tanksley, S. (1993). Mapping polygenes. *Annual Review of genetics*, 27, 205-233.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17, 6463-6471.

Thangjam, R., Maibam, D., & Sharma, J. G. (2003). A simple and rapid method for isolation of DNA from imbibed embryos of *Parkia timoriana* (DC.) Merr. for PCR analysis. *WFL Publiser- Food, Agriculture & Environment*, 1 (3&4), 36-38.

Thermo Scientific. (2009). *Nanodrop 2000*. Retrieved 03 30, 2013, from <http://www.nanodrop.com/Productnd2000software.aspx>

Tiwari, K. L., Jadhav, S. K., & Gupta, S. (2012). Modified CTAB technique for isolation of DNA from some medicinal plants. *Research Journal of Meidicinal Plant*, 6 (1), 65-73.

USDA NRCS National Data Center. (2001). *Oenothera biennis* L. common evening primrose. Retrieved Febrero 27, 2013, from <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=oebi>

UTM. (2008). *Principios de investigación científica y estadísticas*. Retrieved 07 03, 2013, from http://www.sisman.utm.edu.ec/libros/FACULTAD%20DE%20CIENCIAS%20HUMANAS%20Y%20SOCIALES/CARRERA%20DE%20BIBLIOTECOLOGIA%20Y%20CIENCIAS%20DE%20LA%20INFORMACION/01/Investigacion_Formativa/PRINCIPIOS_%20DE_%20INVESTIGACION_CIENTIFICA%20Y%20E

Velasco Mosquera, R. (2005). MARCADORES MOLECULARES Y LA EXTRACCIÓN DE ADN. *Grupo de Investigación ASUBAGROIN FCA Unicauca.* , 3 (1), 15-17.

Vipranarayna, S., Prasad, T. V., Rajinikanth, A., & Damodharam, T. (2013). Genomic DNA isolation and purification of two endemic medicinal plants (*Pterocarpus santalinus* Linn.F & *Pimpinella Tirupatiensis* Bal&Subr) of Sesehachalam Hills, Tirumala. *Journal of Biology and Life Science* , 4 (1), 115-121.

Whittaker, J. C., Harbord, R. M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G., & Sibly, R. (2003). Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* , 164, 781-787.

Winfrey, M. R., Rott, M. A., & Wortman, A. T. (1997). *Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory*. California, US: Benjamin Cummins.

Zavala Castro, J. E. (2005). *Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular* (1era Ed. ed.). Yucatán: Merida.

Zhang, J., & Mcstewart, J. D. (2000). Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *Journal of Cotton Science.* , 4 (3), 193-201.

Ziegenhagen, B., & Scholz, F. (1993). Aprocedure for mini-preparation of genomic DNA from needles of silvers fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Mol. Bio. Rep.* , 11, 117-121.





ANEXOS

Anexo 1. Especies recolectadas de *Oenothera*.



Figura 21. Especies de *Oenothera* seleccionadas y recolectadas.

Fuente: Propia



Figura 22. Ejemplar de *Oenothera rosea* del Herbarium Arequipensis – Husa.

Fuente: Herbarium Arequipensis – Husa (UNSA)

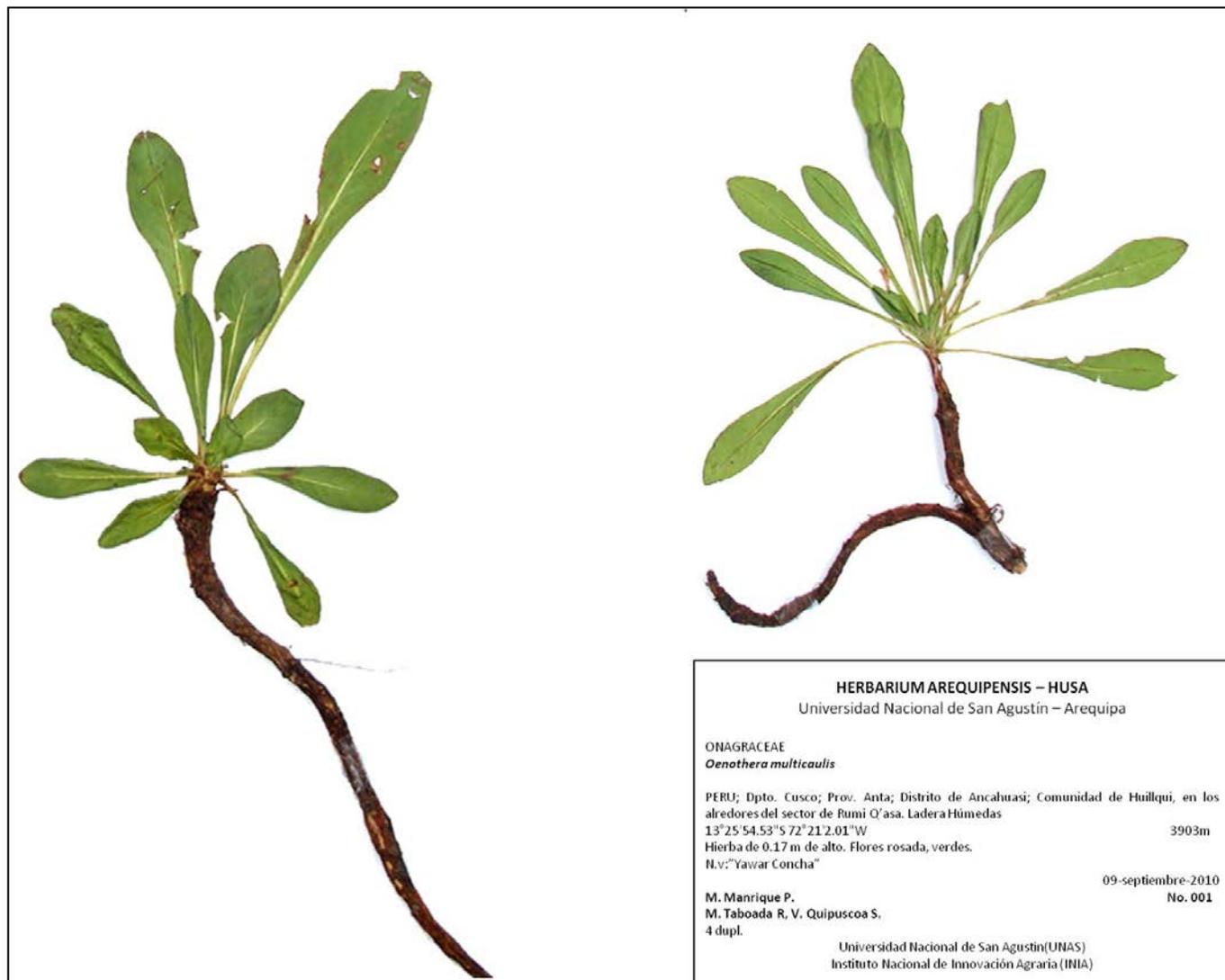


Figura 23. Ejemplar de *Oenothera multicaulis* del Herbarium Arequipensis – Husa.

Fuente: Herbarium Arequipensis – Husa (UNSA)

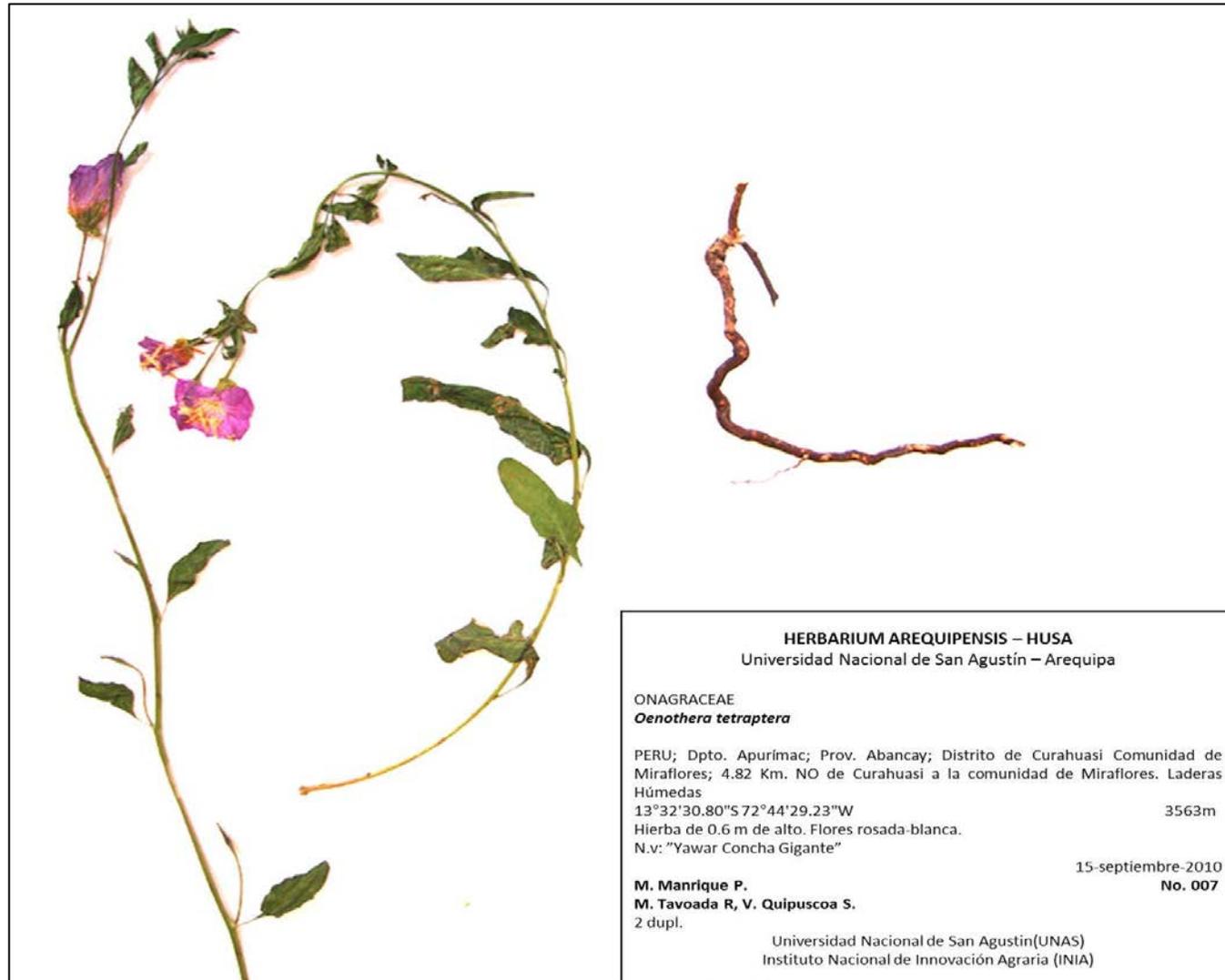


Figura 24. Ejemplar de *Oenothera tetraptera* del Herbarium Arequipensis – Husa.

Fuente: Herbarium Arequipensis – Husa (UNSA)

Anexo 2. Métodos de conservación de material vegetal.

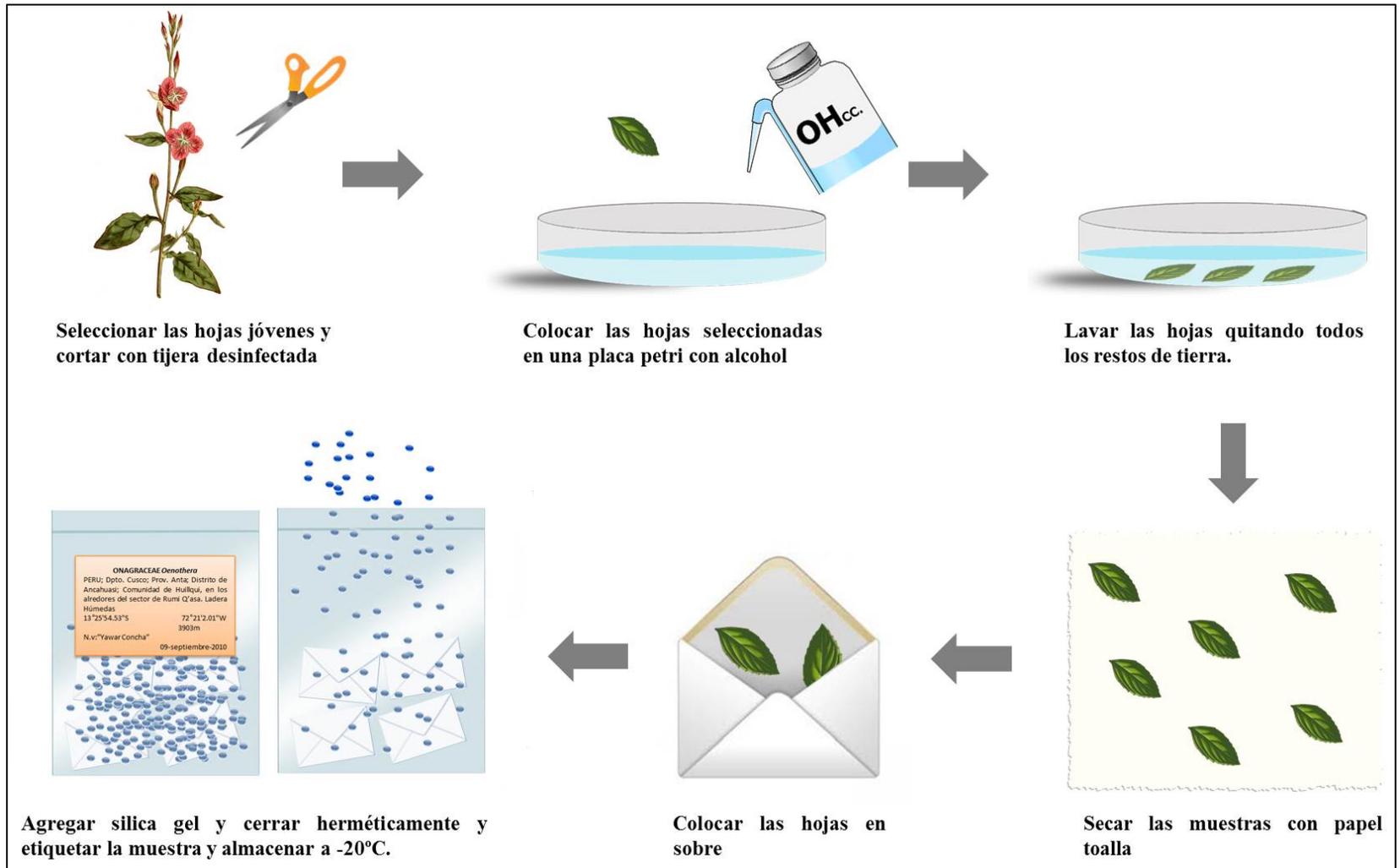


Figura 25. Método de conservación con silica gel.

Fuente: Propia

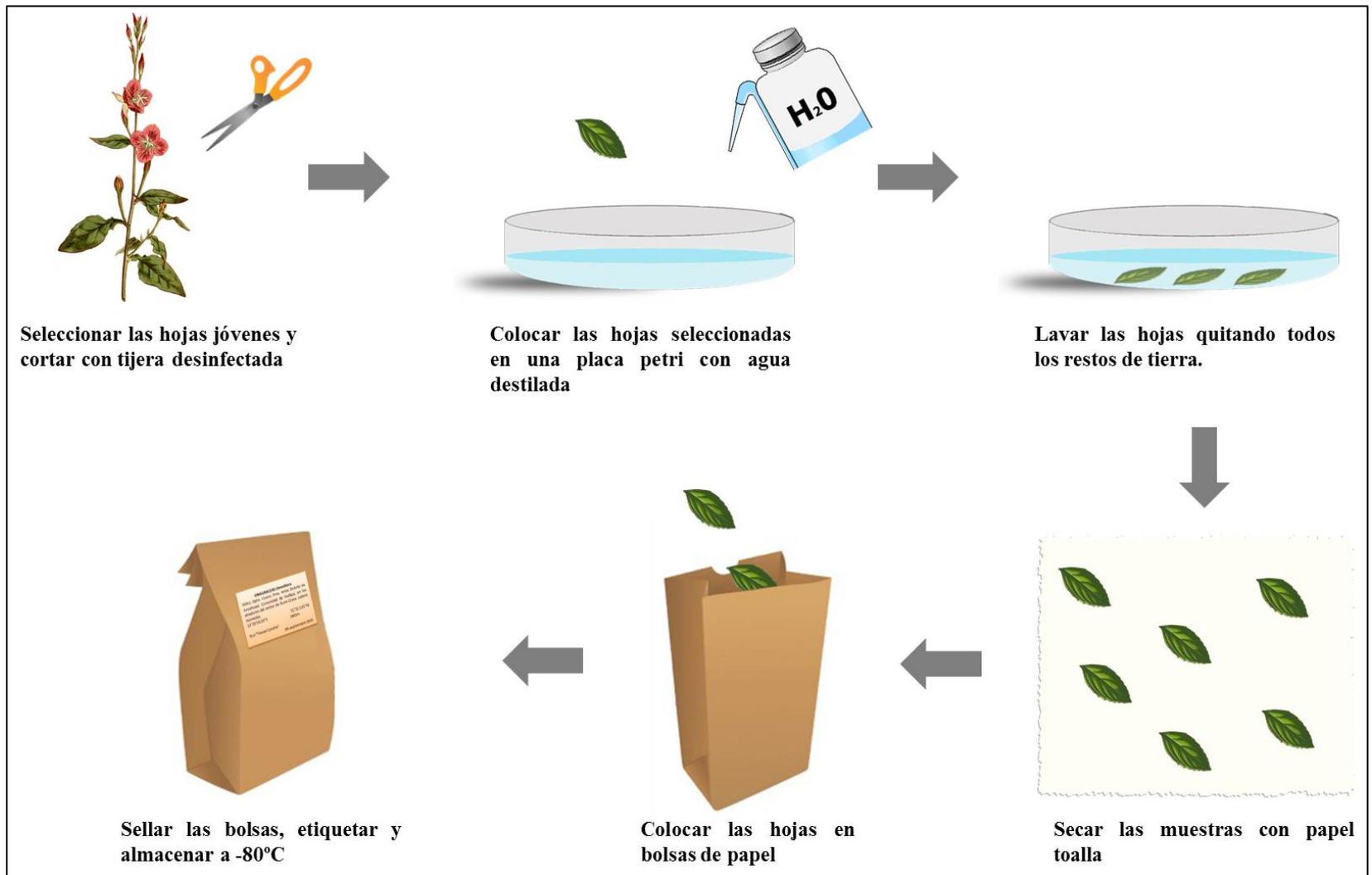


Figura 26. Método de conservación en fresco,

Fuente: Propia

Anexo 3. Protocolo de extracción comercial DNeasy Plant mini Kit.

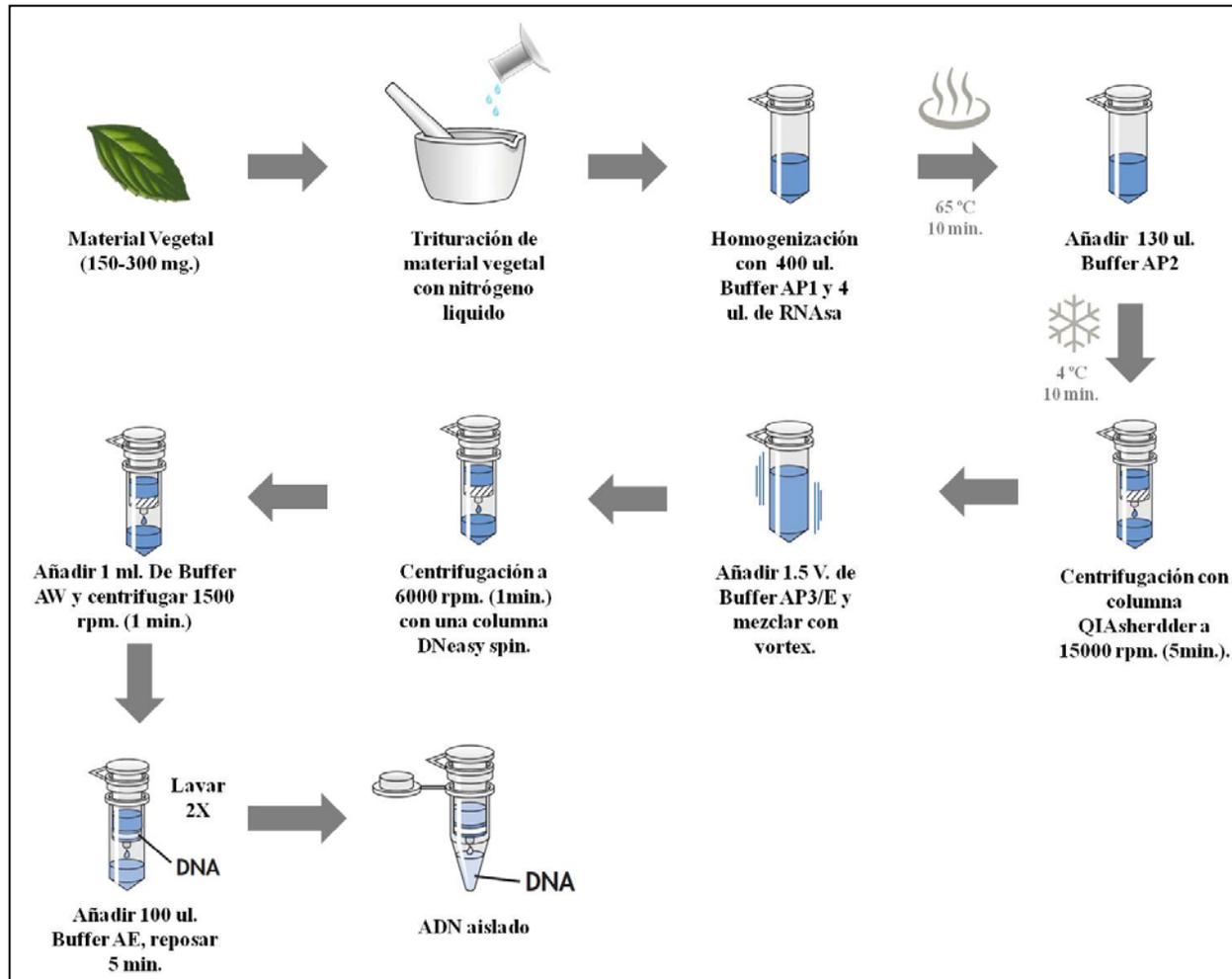


Figura 27. Método de extracción con ADNeasy Plant mini Kit (Qiagen).

Fuente: Propia

Anexo 4. Protocolo de extracción experimental con CTAB 1.

Tabla 19. Lista de reactivos necesarios para la técnica de extracción 1 con CTAB.

| REACTIVO | [CC.] _{FINAL} | pH | SOLUCIÓN DE 100 ml | OBSERVACIONES |
|--|------------------------|-----|-----------------------|---|
| BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB 2X * | | | | |
| Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) | 2X | - | 2 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 1.4M | 8.0 | 8.19 gr | Debe ser completamente disuelto en agua |
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) | 20mM | 8.0 | 4 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |
| Tris – HCl | 100mM | 8.0 | 10 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |
| Polivinilpirrolidona (PVP) | 1% | - | 1 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| OTROS REACTIVOS | | | | |
| β-Mercaptoetanol | 700:2 (ul) | - | 28.60 ul | Añadir al buffer CTAB antes de usar. |
| Cloroformo – OH isoamilico | 24:1 | - | 24:1 (ml) | Almacenado en botella acaramelada |
| Isopropanol | CC. | - | 100 ml | Almacenar a 4°C |
| Etanol | CC. | - | 100 ml | Almacenar a 4°C |
| *Todos los reactivos son mezclados a temperatura altas (60°C – 80°C), manteniendo el pH 8, autoclavar y almacenar. | | | | |
| ** La Composición y concentración de estas soluciones puede ser vista en la Tabla 6. | | | | |

Fuente: Propia.

Tabla 20. Lista de reactivos para la preparación de las soluciones de EDTA y Tris-base.

| REACTIVOS | CONCENTRACIÓN | PARA 100 ml |
|---------------------------------------|---------------|-------------|
| SOLUCIÓN EDTA 0.5 M (pH 8)* | | |
| EDTA | 0.5M. | 18.61 gr |
| NaOH | - | 5 pastillas |
| SOLUCIÓN TRIS-HCl 1 M (pH 8)** | | |
| Tris base | 1M. | 18.61 gr |
| HCl | Concentrado | gotas |

*La solución tiene que ser preparada con temperaturas altas (60°C-90°C), manteniendo el pH 8 (agregando pastillas de NaOH), autoclavar la solución y almacenar en frascos acaramelados.

***La solución tiene que ser preparada con temperaturas altas (60°C-90°C), manteniendo el pH 8 (agregando gotas de HCl_{cc.}), autoclavar la solución y almacenar en frascos acaramelados.

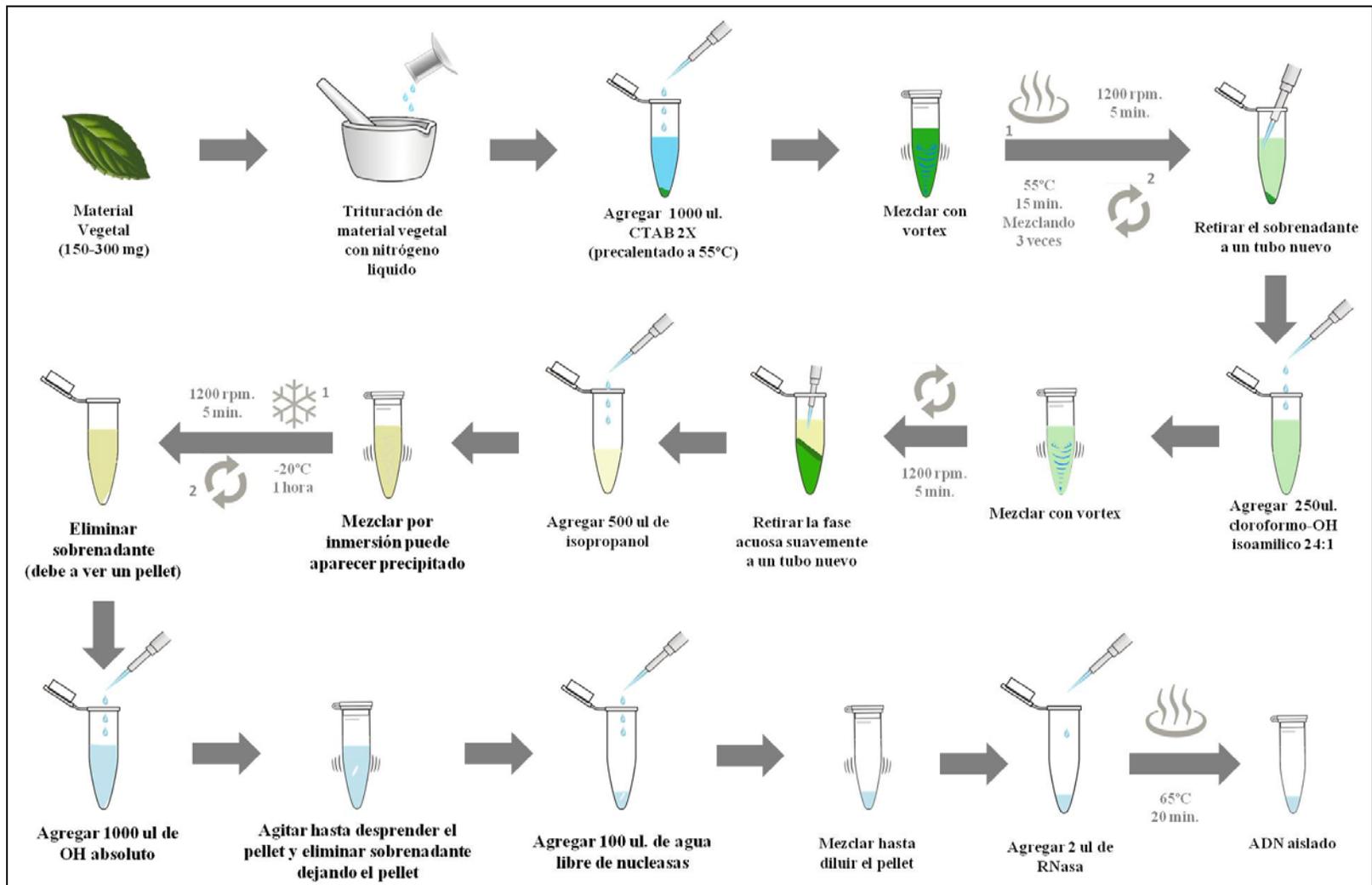


Figura 28. Metodología de extracción para la técnica de extracción 1.

Fuente: Propia

Anexo 5. Protocolo de extracción experimental con CTAB 2.

Tabla 21. Lista de reactivos necesarios para la técnica de extracción 2 con CTAB.

| REACTIVO | [CC.] _{FINAL} | pH | SOLUCIÓN DE 100 ml | OBSERVACIONES |
|--|------------------------|-----|--------------------|---|
| BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB 2X * | | | | |
| Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) | 3X | - | 3 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 2M | 8.0 | 11.7 gr | Debe ser completamente disuelto en agua |
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) | 25mM | 8.0 | 5 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |
| Tris – HCl | 100mM | 8.0 | 10 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |
| Polivinilpirrolidona (PVP) | 5% | - | 5 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| OTROS REACTIVOS | | | | |
| β-Mercaptoetanol | 700:2 (ul.) | - | 28.60 ul. | Añadir al buffer CTAB antes de usar |
| Proteinasa K | 20 mg/ml | - | 40 ul. | Añadir al buffer CTAB y almacenar a -20°C |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 5M | - | 29.25 gr | Almacenar a 4°C |
| Acetato de amonio (CH ₃ COONH ₄) | 5M | - | 38.54 gr | Almacenar a 4°C |
| Cloroformo – OH isoamilico | 24:1 | - | 24:1 (ml) | Almacenado en botella acaramelada |
| Isopropanol | CC. | - | 100 ml | Almacenar a 4°C |
| Etanol | 80% | - | 80 ml | Almacenar a 4°C |
| *Todos los reactivos son mezclados a temperatura altas (60°C – 80°C), manteniendo el pH 8, autoclavar y almacenar. | | | | |
| ** La Composición de estas soluciones puede ser vista en la Tabla 6. | | | | |

Fuente: Propia

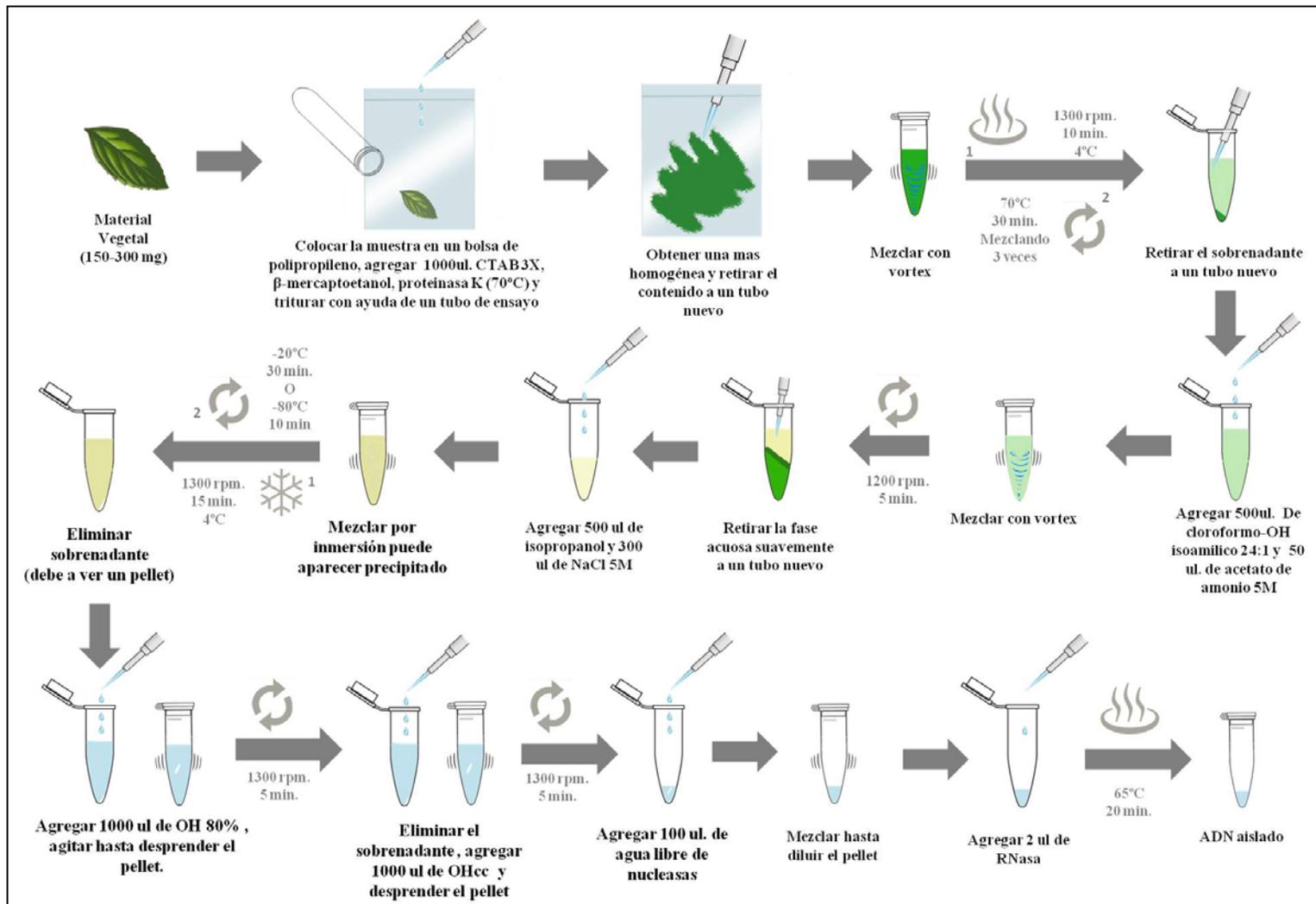


Figura 29. Metodología de extracción para la técnica de extracción 2.

Fuente: Propia

Anexo 6. Protocolo de extracción experimental con CTAB 3.

Tabla 22. Lista de reactivos necesarios para la técnica de extracción 3 con CTAB.

| REACTIVO | [CC.] _{FINAL} | pH | SOLUCIÓN DE 100 ml | OBSERVACIONES |
|--|------------------------|-----|--------------------|---|
| BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB 2X * | | | | |
| Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) | 2X | - | 2 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 1.4M | 8.0 | 8.19 gr | Debe ser completamente disuelto en agua |
| Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) | 20mM | 8.0 | 4 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |
| Tris – HCl | 100mM | 8.0 | 10 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |
| Polivinilpirrolidona (PVP) | 1% | - | 1 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB 10X * | | | | |
| Bromuro de cetiltrimetilamoni (CTAB) | 10X | - | 10 gr | Debe ser diluido con agitación y altas temperaturas (60°C – 80°C) |
| Cloruro de Sodio (NaCl) | 0.7M | 8.0 | 4.09 gr | Debe ser completamente disuelto en agua |
| Ácido | 25mM | 8.0 | 5 ml ** | Mantener el pH 8 es esencial |

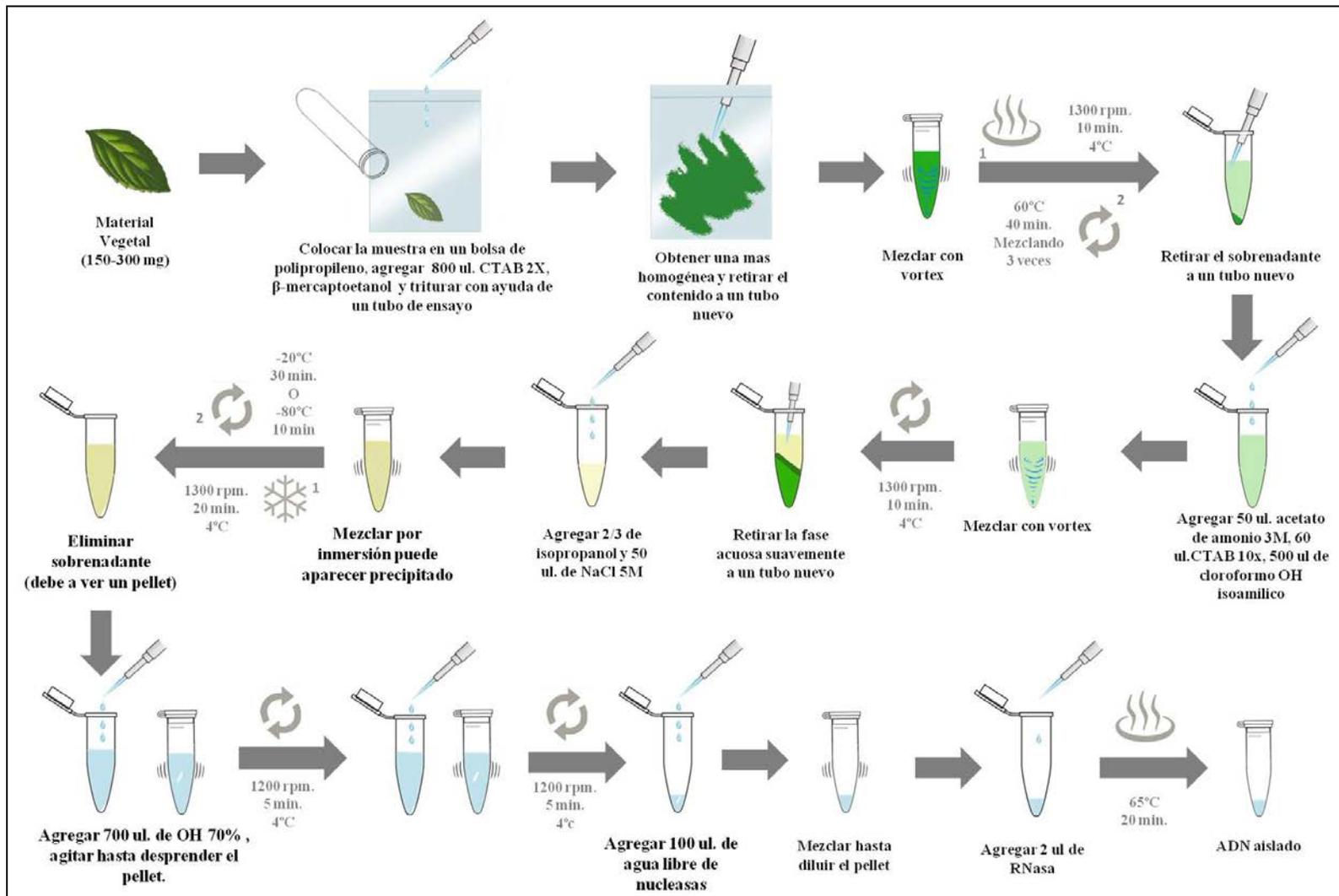


Figura 30. Metodología de extracción para la técnica de extracción 3.

Fuente: Propia

Anexo 7. Análisis de calidad y concentración de ADN.

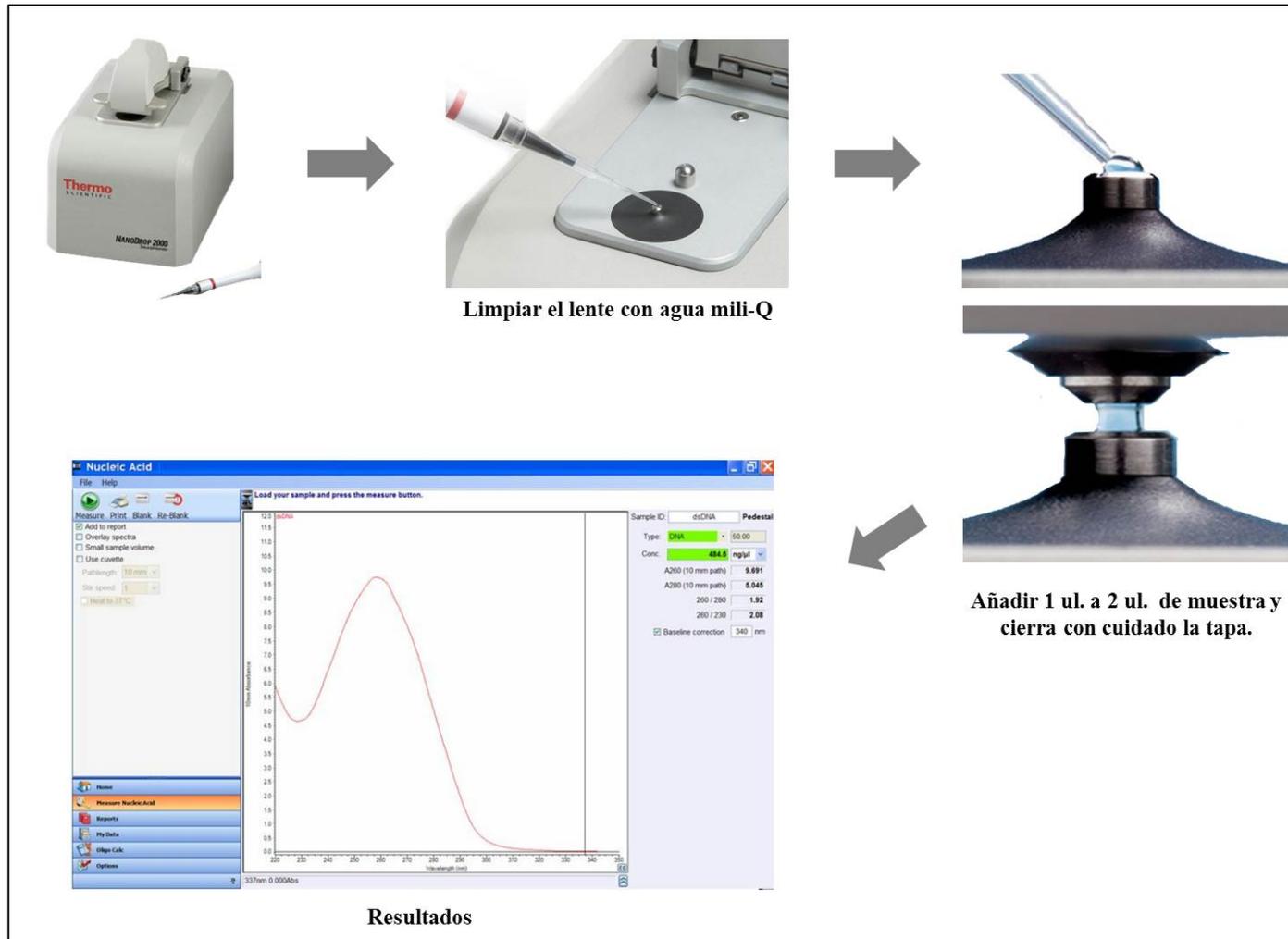


Figura 31. Metodología de uso del Nanodrop 2000 para el análisis de calidad de concentración de ADN.

Fuente: (Thermo Scientific, 2009)

Protocolo para determinar la calidad y concentración del ADN por electroforesis en geles de agarosa al 1%

Para la preparación de los geles de agarosa, en primer lugar se preparó una solución stock de buffer TBE 10X (Tabla 9).

Tabla 23. Reactivos y concentraciones usadas para el buffer TBE 10X.

| REACTIVO | CONCENTRACIÓN | PARA 1l. |
|---|---------------|----------|
| Tris base | 0.9 M | 108 gr |
| Ácido bórico | 0.9 M | 55 gr |
| 0.5 M. EDTA (pH 8.0) | 20 mM | 40 ml |
| *Ajustar el pH 8.0 con HCl o Ácido acético. | | |

Preparación de gel de agarosa 1%

Se Agregó 0.7 gr de agarosa en 70 ml de buffer TBE 1X, el cual es colocado en el microondas por 1.5 minutos hasta ver el buffer se encontró completamente transparente, inmediatamente se enfrió un poco el buffer en un caño, en seguida se agregó 1 ul. de bromuro de etidio y se procedió a añadir el buffer en el molden hasta llenarlo completamente colocando el peine para formar los pozos de carga

Preparación del material genético

Se tomó 2 ul. de ADN los cuales fueron diluidos en un placa de poliacrilamida con 8 ul. de loading buffer 1X. Las muestras fueron cargadas en los pozos de carga del gel de agarosa y en los pocillos extremos se colocó 10 ul. de marcador (λ) Pst I (el cual tiene un peso de 280 ng/ul en la primera banda).

En seguida se realizó la corrida electroforética a 80 V. por 5 minutos y 130 V. por 30 a 40 minutos, luego de la corrida electroforética se colocó el gel al fotodocumentador Chemidoc (Biorad) y se capturaron las imágenes para ser evaluadas.

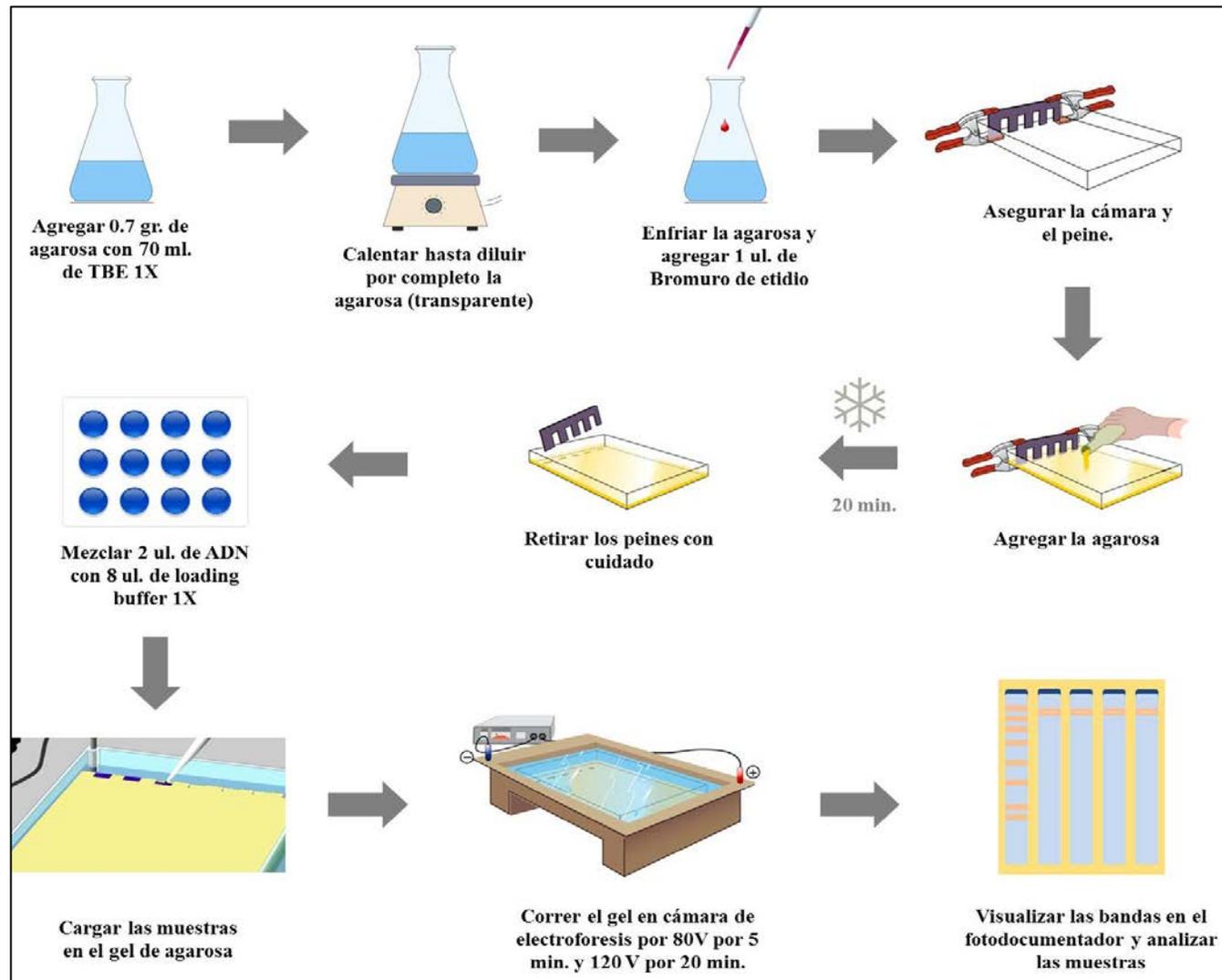


Figura 32. Metodología con geles de agarosa al 1% para el análisis de calidad de concentración de ADN.

Fuente: Propia

Anexo 8. Amplificación de marcadores microsatélites (SSR) específicos para *Oenothera*.

Reacción de PCR

Para la amplificación de las muestras obtenidas con los primers diseñados y estandarizados por Larson et al. (2008), se usó una reacción de PCR estándar para todas las muestras (Tabla 10).

Tabla 24. Reactivos y concentraciones usadas para la reacción de PCR.

| REACTIVO | STOCK | [CC.] FINAL | PARA 10 ul. |
|-----------------------------|-------|--------------|-------------|
| MgCl ₂ | 50 mM | 2 mM | 0.4 ul. |
| DNTP's | 5 mM | 0.2 mM | 0.4 ul. |
| Primer (F) | 10 uM | 0.2 uM | 0.2 ul. |
| Primer (R) | 10 uM | 0.2 uM | 0.2 ul. |
| Hot start Taq Polimerasa | 5 U | 0.25 U | 0.05 ul. |
| PCR Buffer | 10X | 1X | 1 ul. |
| ADN | 10 ug | 50 ug | 5 ul. |
| Agua | - | - | 2.75 ul. |

Anexo 9. Bases de datos para cada una de las técnicas de extracción evaluadas con respecto a las tres especies de *Oenothera*.

Tabla 25. Base de datos para cada una de las técnicas de extracción con respecto a *Oenothera rosea*.

| Protocolo | Conservación | Enfriamiento (°C) | Nanodrop 2000 | | | | Gel de Agarosa | | Código |
|-------------------------|--------------|----------------------|--------------------------|--------|-------|---------|----------------|--------------------------|--------|
| | | | Concentración (ng/ul) | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Concentración (ng/ul) | |
| Dneasy | Silica Gel | -20 | 2.900 | 0.059 | 0.014 | 4.07 | 1.18 | 0.000 | DRS20 |
| | Silica Gel | -20 | 2.000 | 0.039 | 0.007 | 6.07 | 1.14 | 0.000 | DRS20 |
| | Fresco | -20 | 28.300 | 0.566 | 0.341 | 1.66 | 0.59 | 10.510 | DRF20 |
| | Fresco | -20 | 31.800 | 0.636 | 0.391 | 1.63 | 0.68 | 11.200 | DRF20 |
| Técnica de extracción 1 | Silica Gel | -20 | 71.800 | 1.440 | 2.010 | 0.72 | 0.64 | 23.940 | P1RS20 |
| | Silica Gel | -20 | 69.000 | 1.381 | 1.184 | 1.17 | 0.73 | 22.840 | P1RS20 |
| | Fresco | -80 | 329.900 | 6.600 | 4.040 | 1.63 | 1.56 | 109.970 | P1RF20 |
| | Fresco | -80 | 303.900 | 6.080 | 3.610 | 1.68 | 1.59 | 101.300 | P1RF20 |
| Técnica de extracción 2 | Silica Gel | -20 | 227.700 | 4.553 | 2.481 | 1.88 | 1.73 | 75.900 | P2RS20 |
| | Silica Gel | -20 | 281.800 | 5.637 | 3.166 | 1.78 | 1.86 | 93.930 | P2RS20 |
| | Silica Gel | -80 | 344.600 | 6.891 | 4.121 | 1.67 | 1.79 | 114.870 | P2RS80 |
| | Silica Gel | -80 | 337.600 | 6.753 | 4.025 | 1.68 | 1.85 | 112.530 | P2RS80 |
| | Fresco | -20 | 647.200 | 12.940 | 6.750 | 1.92 | 1.87 | 161.800 | P2RF20 |
| | Fresco | -20 | 650.000 | 13.000 | 7.060 | 1.84 | 1.99 | 162.500 | P2RF20 |
| | Fresco | -80 | 688.400 | 13.770 | 7.600 | 1.81 | 1.78 | 172.100 | P2RF80 |
| | Fresco | -80 | 792.300 | 15.850 | 8.560 | 1.85 | 1.99 | 198.080 | P2RF80 |
| Técnica de extracción 3 | Silica Gel | -20 | 104.050 | 2.089 | 1.076 | 1.94 | 2.19 | 100.410 | P3RS20 |
| | Silica Gel | -20 | 106.200 | 2.124 | 1.097 | 1.94 | 1.98 | 97.840 | P3RS20 |
| | Silica Gel | -80 | 284.400 | 5.688 | 3.174 | 1.79 | 2.04 | 102.540 | P3RS80 |
| | Silica Gel | -80 | 173.900 | 3.478 | 1.774 | 1.96 | 2.21 | 98.570 | P3RS80 |
| | Fresco | -20 | 688.500 | 13.769 | 7.440 | 1.85 | 1.99 | 212.840 | P3RF20 |
| | Fresco | -20 | 822.700 | 16.453 | 8.605 | 1.91 | 2.03 | 205.680 | P3RF20 |
| | Fresco | -80 | 807.600 | 16.153 | 8.662 | 1.86 | 1.98 | 201.900 | P3RF80 |
| | Fresco | -80 | 880.100 | 17.602 | 9.565 | 1.84 | 2.17 | 220.030 | P3RF80 |

Fuente: Propia

Tabla 26. Base de datos para cada una de las técnicas de extracción con respecto a *Oenothera multicaulis*.

| Protocolo | Conservación | Enfriamiento (°C) | Nanodrop 2000 | | | | Gel de Agarosa | | Código |
|-------------------------|--------------|----------------------|--------------------------|--------|--------|---------|----------------|--------------------------|--------|
| | | | Concentración (ng/ul) | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Concentración (ng/ul) | |
| Dneasy | Silica Gel | -20 | 0.100 | 0.001 | -0.023 | -0.04 | 0.18 | 0.000 | DMS20 |
| | Silica Gel | -20 | 0.200 | 0.004 | -0.006 | -0.61 | 0.11 | 0.000 | DMS20 |
| | Fresco | -20 | 16.500 | 0.331 | 0.153 | 2.17 | 1.26 | 5.210 | DMF20 |
| | Fresco | -20 | 25.200 | 0.204 | 0.297 | 1.70 | 0.56 | 9.510 | DMF20 |
| Técnica de extracción 1 | Silica Gel | -20 | 8.700 | 0.039 | 0.690 | 2.53 | 1.61 | 9.250 | P1MS20 |
| | Silica Gel | -20 | 9.900 | 0.199 | 0.096 | 2.07 | 0.88 | 9.340 | P1MS20 |
| | Fresco | -20 | 41.700 | 0.834 | 0.474 | 1.76 | 0.84 | 12.540 | P1MF20 |
| | Fresco | -20 | 39.400 | 0.788 | 0.452 | 1.74 | 0.85 | 9.520 | P1MF20 |
| Técnica de extracción 2 | Silica Gel | -20 | 175.300 | 3.507 | 1.871 | 1.87 | 1.76 | 154.25 | P2MS20 |
| | Silica Gel | -20 | 292.600 | 5.853 | 3.343 | 1.75 | 1.85 | 97.53 | P2MS20 |
| | Silica Gel | -80 | 376.800 | 7.535 | 3.604 | 2.09 | 1.64 | 121.25 | P2MS80 |
| | Silica Gel | -80 | 346.200 | 6.923 | 3.387 | 2.04 | 1.39 | 110.59 | P2MS80 |
| | Fresco | -20 | 1367.500 | 27.350 | 17.040 | 1.61 | 1.83 | 341.88 | P2MF20 |
| | Fresco | -20 | 1104.900 | 22.100 | 12.690 | 1.77 | 2.00 | 276.23 | P2MF20 |
| | Fresco | -80 | 1352.600 | 27.050 | 16.690 | 1.62 | 1.81 | 338.15 | P2MF80 |
| | Fresco | -80 | 1550.400 | 31.010 | 24.690 | 1.26 | 1.51 | 387.6 | P2MF80 |
| Técnica de extracción 3 | Silica Gel | -20 | 608.3 | 12.17 | 6.36 | 1.91 | 2.01 | 175.24 | P3MS20 |
| | Silica Gel | -20 | 635.7 | 12.71 | 6.73 | 1.89 | 2.02 | 168.93 | P3MS20 |
| | Silica Gel | -80 | 729 | 14.58 | 7.93 | 1.84 | 1.99 | 203.18 | P3MS80 |
| | Silica Gel | -80 | 828.6 | 16.571 | 9.046 | 1.83 | 2.04 | 227.15 | P3MS80 |
| | Fresco | -20 | 722.100 | 14.442 | 7.507 | 1.92 | 2.12 | 208.53 | P3MF20 |
| | Fresco | -20 | 633.300 | 12.666 | 6.903 | 1.83 | 2.09 | 185.33 | P3MF20 |
| | Fresco | -80 | 927.400 | 18.548 | 10.110 | 1.84 | 2.08 | 231.85 | P3MF80 |
| | Fresco | -80 | 929.800 | 18.595 | 9.983 | 1.86 | 2.01 | 252.45 | P3MF80 |

Fuente: Propia

Tabla 27. Base de datos para cada una de las técnicas de extracción con respecto a *Oenothera tetraptera*.

| Protocolo | Conservación | Enfriamiento (°C) | Nanodrop 2000 | | | | Gel de Agarosa | | Código |
|----------------------------|--------------|----------------------|--------------------------|--------|--------|---------|----------------|--------------------------|--------|
| | | | Concentración (ng/ul) | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Concentración (ng/ul) | |
| Dneasy | Silica Gel | -20 | -0.100 | -0.003 | 0.029 | 0.1 | -0.26 | 0.000 | DTS20 |
| | Silica Gel | -20 | 0.500 | 0.011 | -0.014 | -0.77 | 0.45 | 0.000 | DTS20 |
| | Fresco | -20 | 12.600 | 0.252 | 0.143 | 1.76 | 0.77 | 0.000 | DTF20 |
| | Fresco | -20 | 10.800 | 0.216 | 3.313 | 0.07 | 0.17 | 0.000 | DTF20 |
| Técnica de extracción 1 | Silica Gel | -20 | 71.800 | 1.436 | 1.039 | 1.38 | 0.42 | 25.48 | P1TS20 |
| | Silica Gel | -20 | 59.200 | 1.184 | 0.683 | 1.73 | 1.39 | 31.51 | P1TS20 |
| | Fresco | -20 | 160.200 | 3.205 | 2.079 | 1.54 | 0.68 | 75.59 | P1TF20 |
| | Fresco | -20 | 151.500 | 3.029 | 2.064 | 1.47 | 0.43 | 87.52 | P1TF20 |
| Técnica de extracción 2 | Silica Gel | -20 | 186.5 | 3.73 | 1.773 | 2.1 | 1.01 | 85.24 | P2TS20 |
| | Silica Gel | -20 | 277.4 | 5.547 | 2.537 | 2.19 | 1.58 | 115.27 | P2TS20 |
| | Silica Gel | -80 | 323.6 | 6.471 | 3.339 | 1.94 | 1.13 | 98.58 | P2TS80 |
| | Silica Gel | -80 | 315.3 | 6.31 | 3.45 | 1.83 | 1.81 | 99.47 | P2TS80 |
| | Fresco | -20 | 470.6 | 9.412 | 4.249 | 2.22 | 2.3 | 134.51 | P2TF20 |
| | Fresco | -20 | 497.1 | 9.942 | 4.555 | 2.18 | 1.93 | 165.7 | P2TF20 |
| | Fresco | -80 | 640.1 | 12.802 | 6.12 | 2.09 | 1.95 | 201.75 | P2TF80 |
| | Fresco | -80 | 564.5 | 11.29 | 6.362 | 1.77 | 1.82 | 188.17 | P2TF80 |
| Técnica de extracción 3 | Silica Gel | -20 | 187.6 | 3.752 | 2.009 | 1.87 | 1.96 | 167.21 | P3TS20 |
| | Silica Gel | -20 | 232.8 | 4.656 | 4.552 | 1.82 | 1.95 | 205.21 | P3TS20 |
| | Silica Gel | -80 | 164.8 | 3.295 | 1.666 | 1.98 | 2.14 | 125.24 | P3TS80 |
| | Silica Gel | -80 | 117.1 | 2.342 | 1.232 | 1.9 | 2.02 | 114.15 | P3TS80 |
| | Fresco | -20 | 688.5 | 13.769 | 7.44 | 1.85 | 1.99 | 245.21 | P3TF20 |
| | Fresco | -20 | 761.3 | 15.225 | 8.24 | 1.85 | 2.08 | 194.25 | P3TF20 |
| | Fresco | -80 | 865 | 17.3 | 9.052 | 1.91 | 2.14 | 216.25 | P3TF80 |
| | Fresco | -80 | 765.1 | 15.303 | 8.305 | 1.84 | 2.11 | 201.28 | P3TF80 |

Fuente: Propia

Anexo 10. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* para cada una de las técnicas de conservación.

Tabla 28. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* para cada una de las técnicas de conservación.

| <i>Técnica de extracción</i> | <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------------|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| DNeasy | Entre grupos | 117.831 | 1 | 117.831 | 989.97 | 0.0010 |
| | Intra grupos | 0.23805 | 2 | 0.119 | | |
| | Total (Corr.) | 118.069 | 3 | | | |
| Técnica 1 | Entre grupos | 6764.24 | 1 | 6764.24 | 354.25 | 0.0028 |
| | Intra grupos | 38.1895 | 2 | 19.095 | | |
| | Total (Corr.) | 6802.43 | 3 | | | |
| Técnica 2 | Entre grupos | 11044.7 | 1 | 11044.7 | 35.67 | 0.0010 |
| | Intra grupos | 1857.82 | 6 | 309.637 | | |
| | Total (Corr.) | 12902.5 | 7 | | | |
| Técnica 3 | Entre grupos | 24320.0 | 1 | 24320.0 | 707.95 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 206.116 | 6 | 34.3527 | | |
| | Total (Corr.) | 24526.2 | 7 | | | |

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 11. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de *Oenothera rosea* con respecto a las técnicas de conservación.

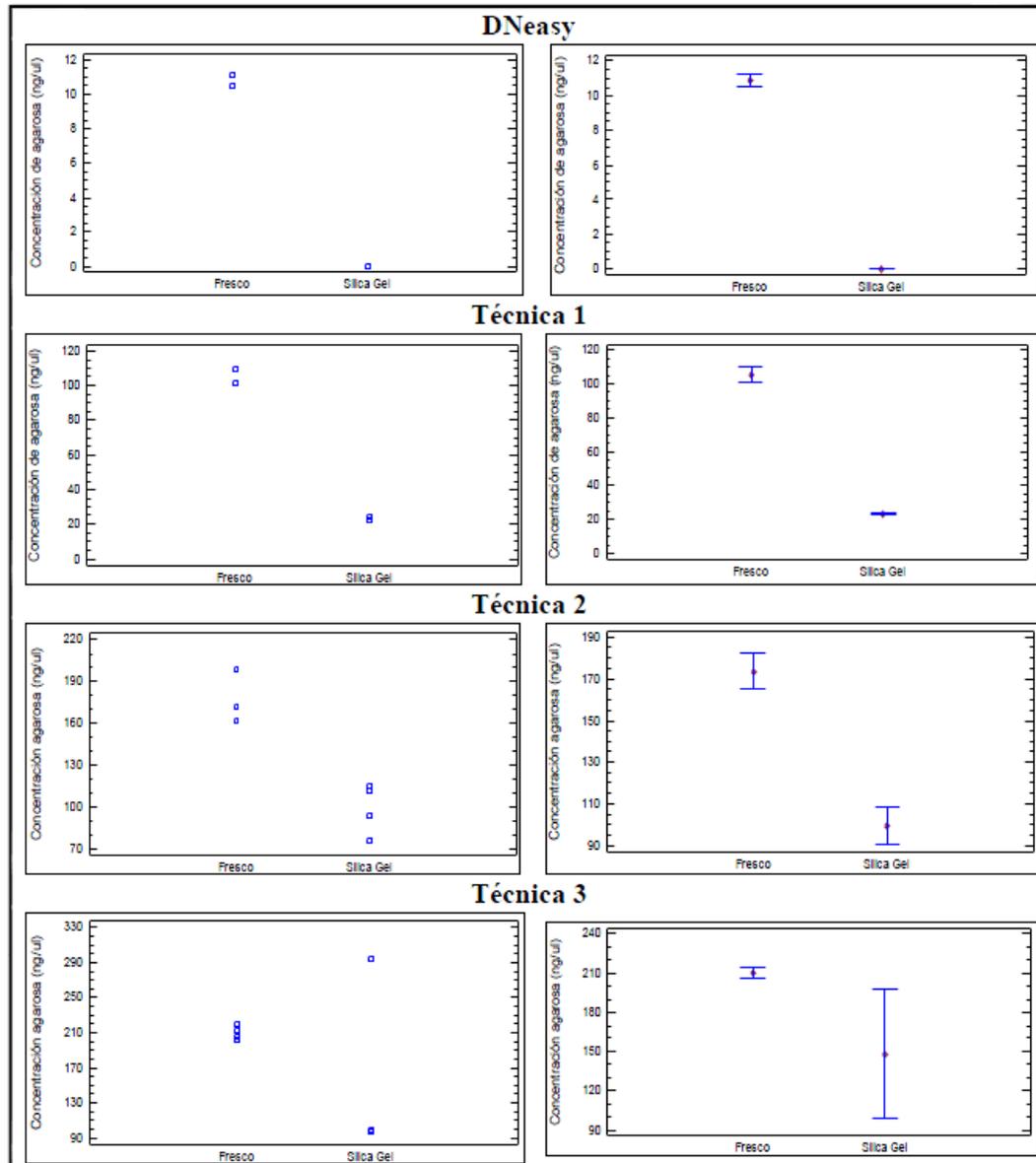


Figura 33. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* con respecto a la conservación.

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 12. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* para cada una de las técnicas de conservación.

Tabla 29. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* para cada una de las técnicas de conservación.

| <i>Técnica de extracción</i> | <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------------|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| DNeasy | Entre grupos | 54.1696 | 1 | 54.1696 | 11.72 | 0.0758 |
| | Intra grupos | 9.245 | 2 | 4.6225 | | |
| | Total (Corr.) | 63.4146 | 3 | | | |
| Técnica 1 | Entre grupos | 3.01022 | 1 | 3.01022 | 1.32 | 0.3696 |
| | Intra grupos | 4.56425 | 2 | 2.28212 | | |
| | Total (Corr.) | 7.57447 | 3 | | | |
| Técnica 2 | Entre grupos | 92501.6 | 1 | 92501.6 | 69.04 | 0.0002 |
| | Intra grupos | 8039.0 | 6 | 1339.83 | | |
| | Total (Corr.) | 100541. | 7 | | | |
| Técnica 3 | Entre grupos | 1343.17 | 1 | 1343.17 | 1.72 | 0.2378 |
| | Intra grupos | 4689.22 | 6 | 781.537 | | |
| | Total (Corr.) | 6032.4 | 7 | | | |

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 13. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de *Oenothera multicaulis* con respecto a las técnicas de conservación.

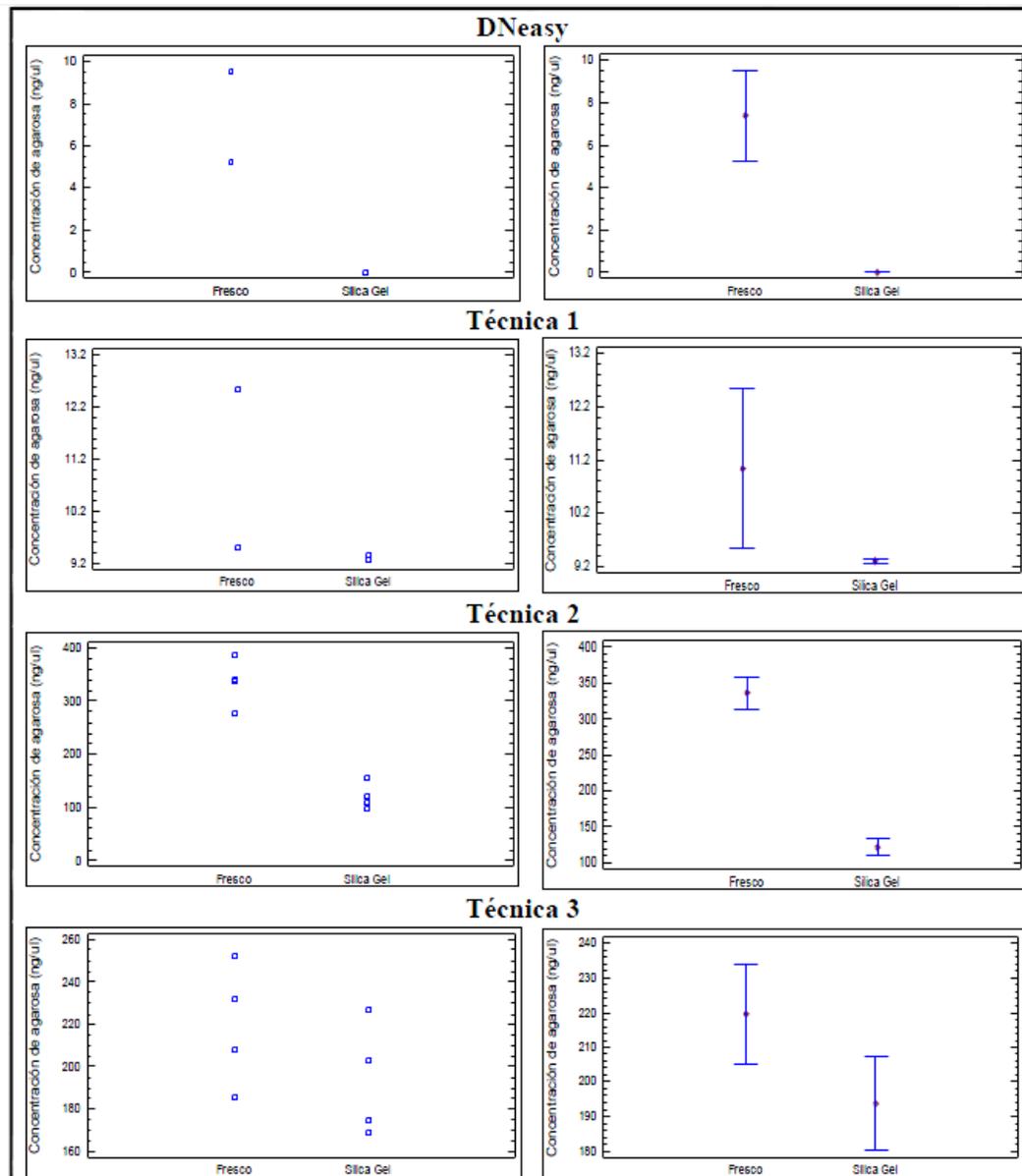


Figura 34. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* con respecto a la conservación.

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 14. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* para cada una de las técnicas de conservación.

Tabla 30. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* para cada una de las técnicas de conservación.

| <i>Técnica de extracción</i> | <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------------------|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| DNeasy | Entre grupos | - | - | - | - | - |
| | Intra grupos | - | - | - | - | - |
| | Total (Corr.) | - | - | - | - | - |
| Técnica 1 | Entre grupos | 2815.36 | 1 | 2815.36 | 63.02 | 0.0155 |
| | Intra grupos | 89.3429 | 2 | 44.6714 | | |
| | Total (Corr.) | 2904.71 | 3 | | | |
| Técnica 2 | Entre grupos | 10626.6 | 1 | 10626.6 | 20.95 | 0.0038 |
| | Intra grupos | 3043.4 | 6 | 507.233 | | |
| | Total (Corr.) | 13670.0 | 7 | | | |
| Técnica 3 | Entre grupos | 7514.15 | 1 | 7514.15 | 6.69 | 0.0414 |
| | Intra grupos | 6738.48 | 6 | 1123.08 | | |
| | Total (Corr.) | 14252.6 | 7 | | | |

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 15. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de *Oenothera tetraptera* con respecto a las técnicas de conservación.

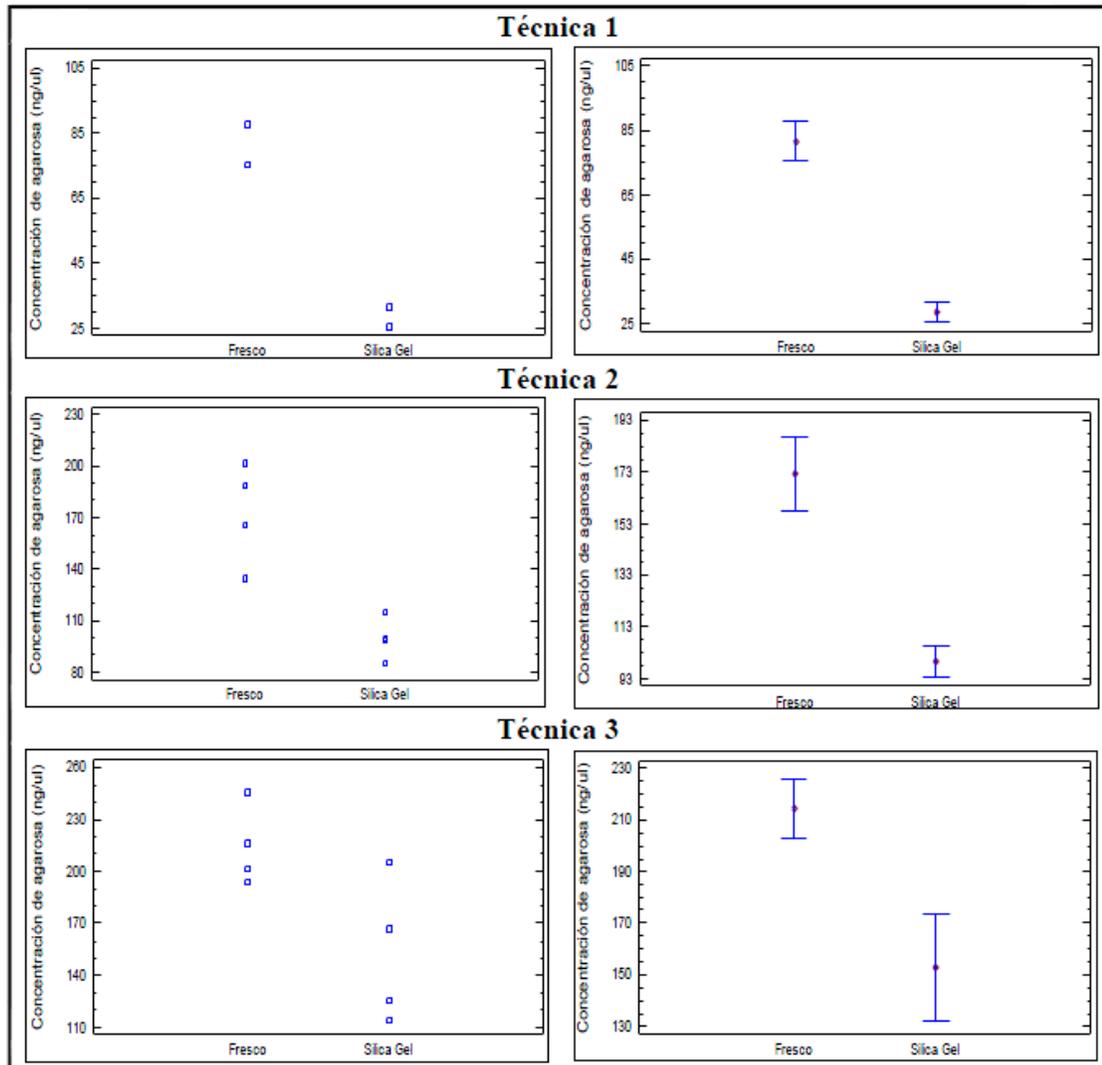


Figura 35. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* con respecto a la conservación.

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 16. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* para cada una de las técnicas de extracción.

Tabla 31. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* para cada una de las técnicas de extracción.

| <i>Variables</i> | <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Concentración | Entre grupos | 22.0329 | 11 | 2.0030 | 11.29 | 0.0001 |
| | Intra grupos | 2.1285 | 12 | 0.1774 | | |
| | Total (Corr.) | 24.1614 | 23 | | | |
| A _{260/280} | Entre grupos | 6.2315 | 11 | 0.5665 | 65.24 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 0.1042 | 12 | 0.0087 | | |
| | Total (Corr.) | 6.3357 | 23 | | | |
| A _{260/230} | Entre grupos | 117376. | 11 | 10670.5 | 172.43 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 742.595 | 12 | 61.8829 | | |
| | Total (Corr.) | 118118. | 23 | | | |

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 17. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de *Oenothera rosea* con respecto a las técnicas de extracción.

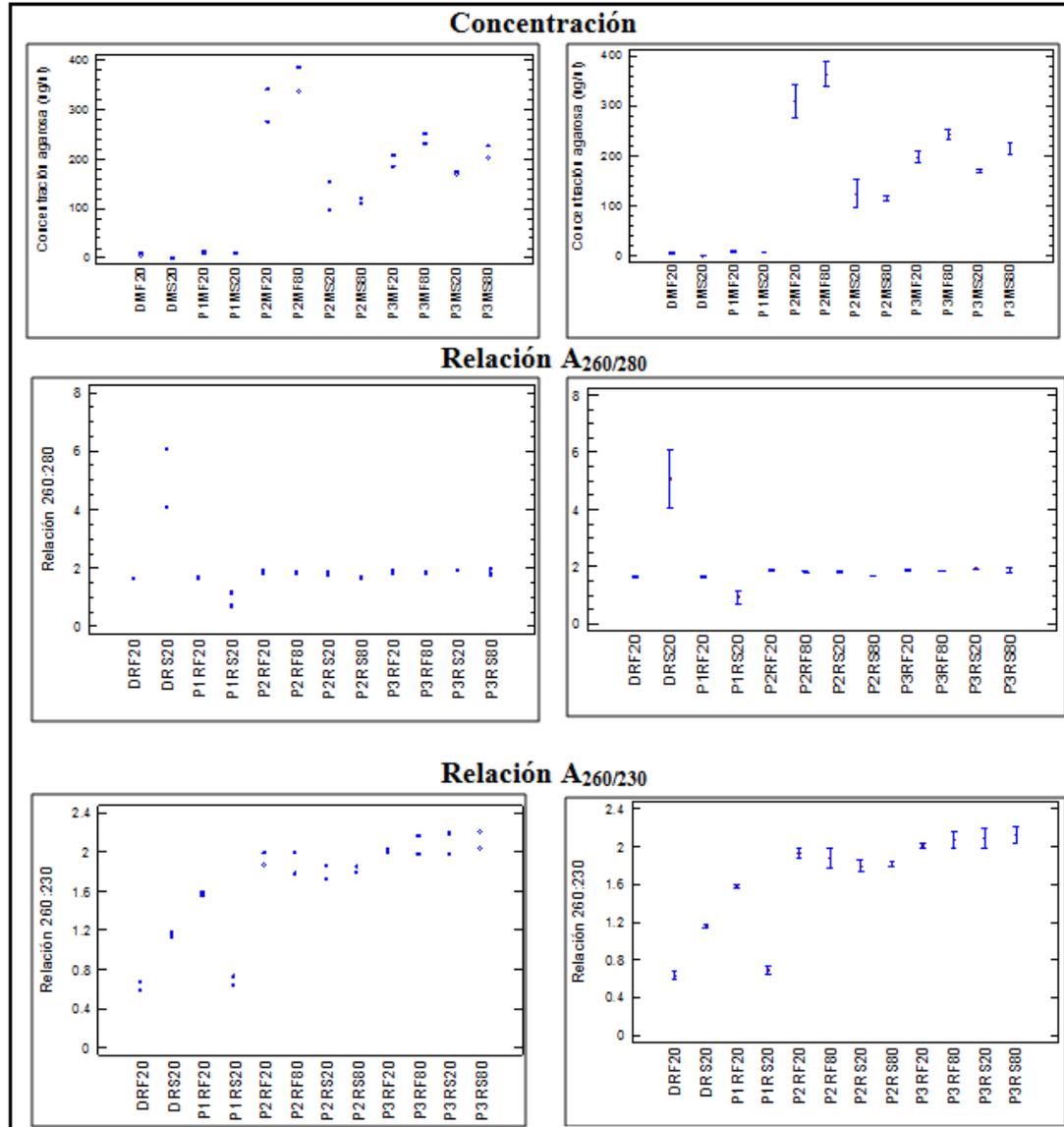


Figura 36. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera rosea* respecto a la técnica de extracción.

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 18. Imágenes de los geles de agarosa de *Oenothera rosea* para las diferentes técnicas de extracción.

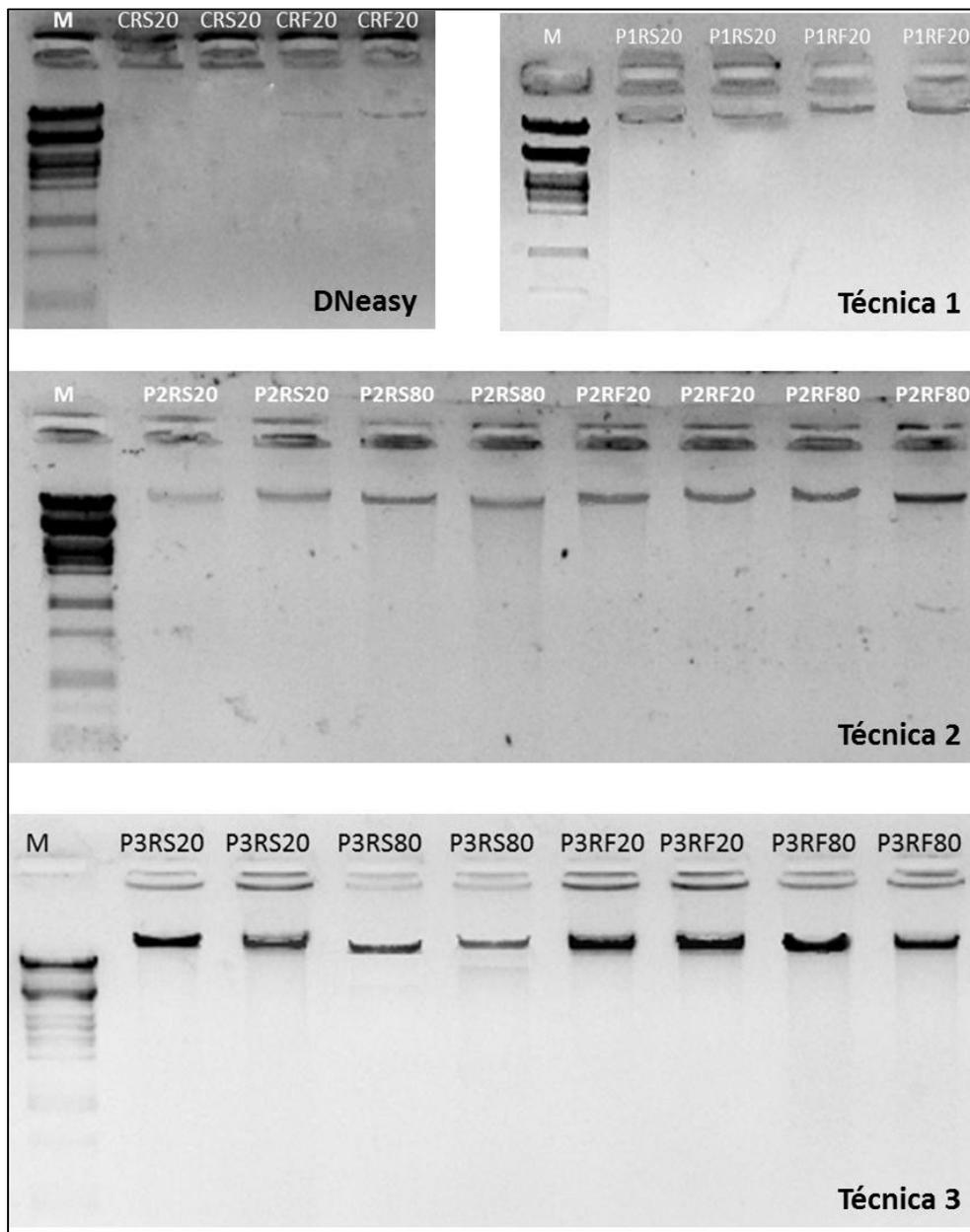


Figura 37. Geles de agarosa *Oenothera multicaulis* respecto a la técnica de extracción.

Fuente: Quantity One.

Anexo 19. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* para cada una de las técnicas de extracción.

Tabla 32. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* para cada una de las técnicas de extracción.

| <i>Variables</i> | <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Concentración | Entre grupos | 339311. | 11 | 30846.4 | 63.33 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 5845.31 | 12 | 487.109 | | |
| | Total (Corr.) | 345156. | 23 | | | |
| A260/280 | Entre grupos | 9.6729 | 11 | 0.8793 | 22.48 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 0.4695 | 12 | 0.0391 | | |
| | Total (Corr.) | 10.1423 | 23 | | | |
| A260/230 | Entre grupos | 8.3174 | 11 | 0.7561 | 14.80 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 0.6129 | 12 | 0.0511 | | |
| | Total (Corr.) | 8.9303 | 23 | | | |

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 20. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de *Oenothera multicaulis* con respecto a las técnicas de extracción.

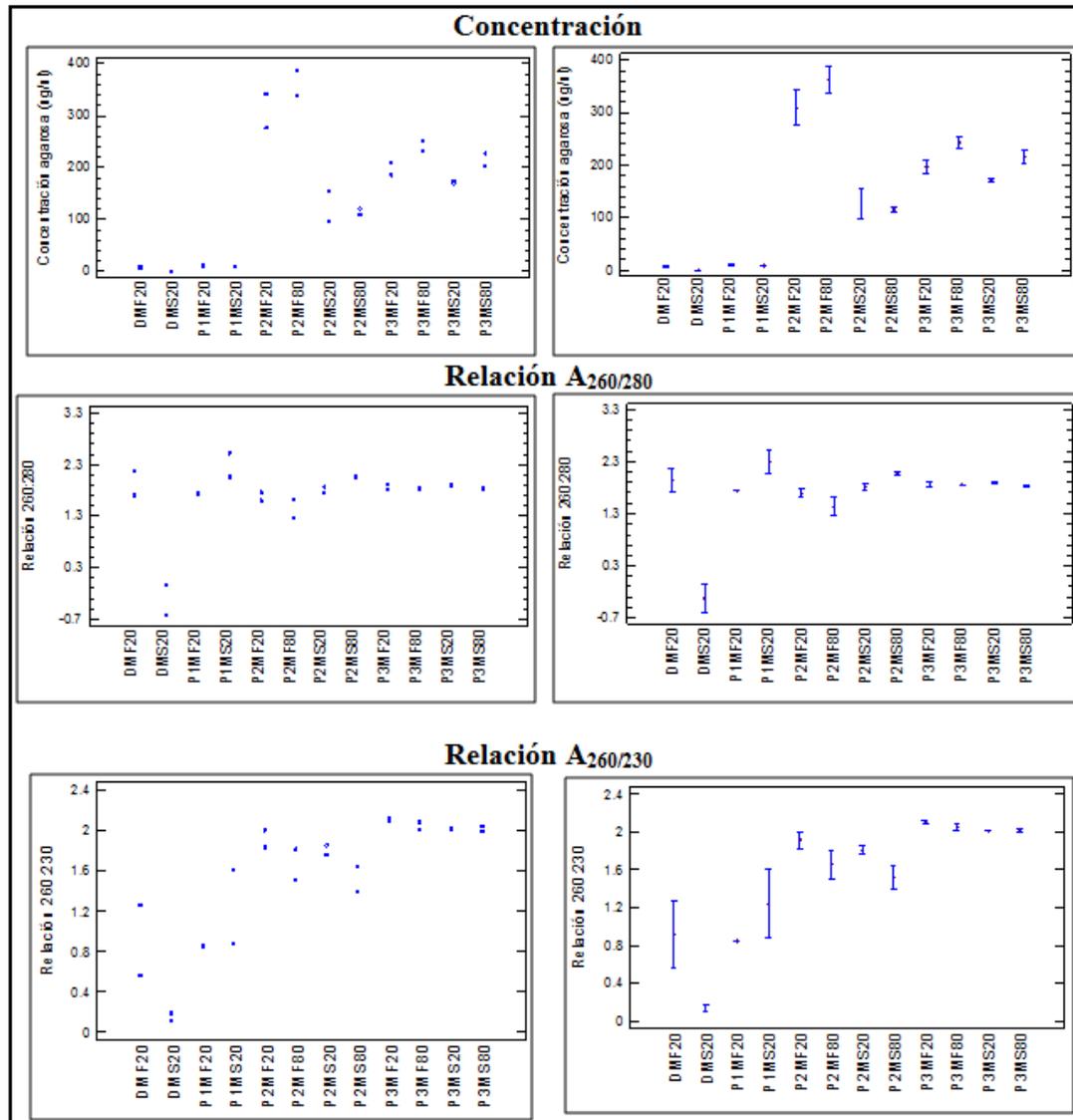


Figura 38. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera multicaulis* respecto a la técnica de extracción.

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 21. Imágenes de los geles de agarosa de *Oenothera multicaulis* para las diferentes técnicas de extracción.

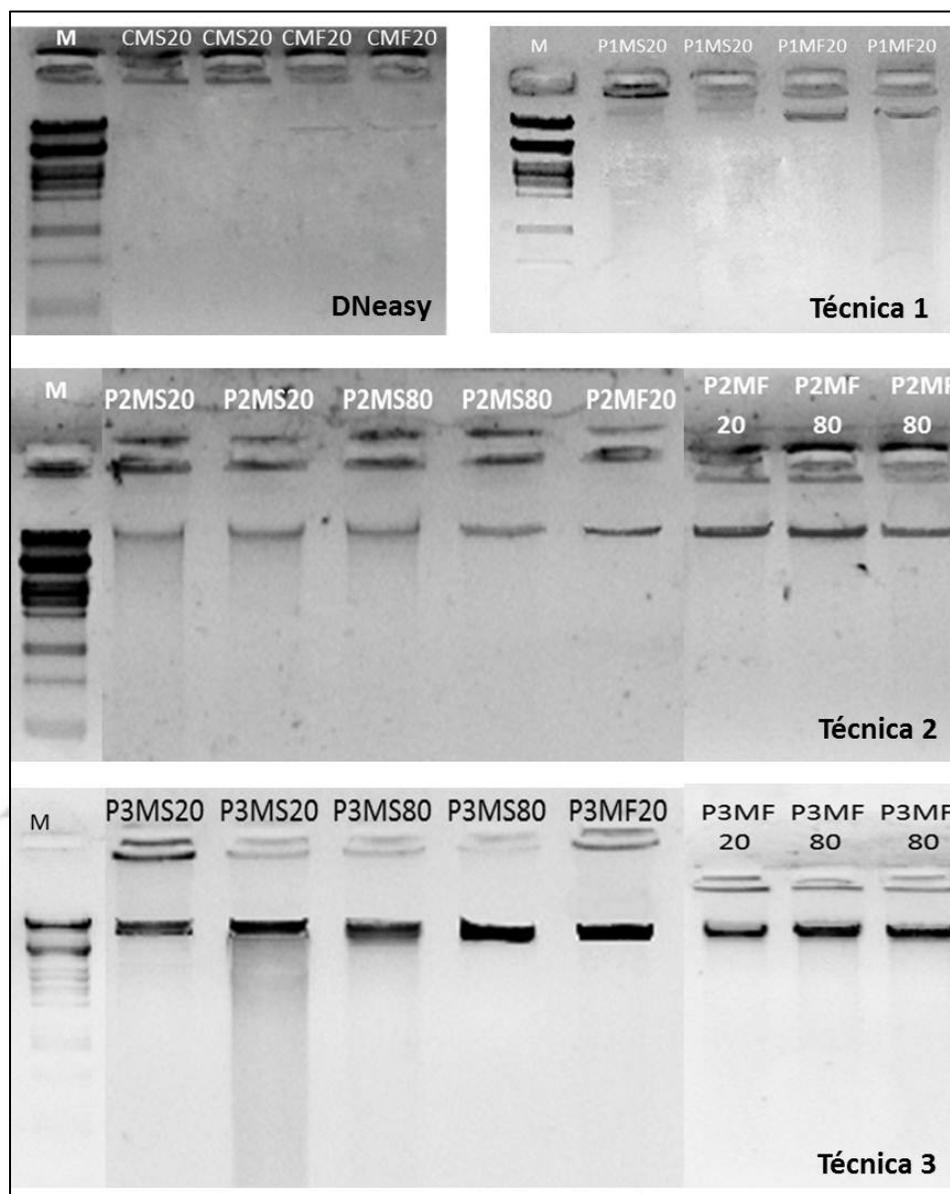


Figura 39. Geles de agarosa de *Oenothera multicaulis* respecto a la técnica de extracción.

Fuente: Quantity One.

Anexo 22. Análisis de varianza simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* para cada una de las técnicas de extracción.

Tabla 33. ANOVA simple para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* para cada una de las técnicas de extracción.

| <i>Variables</i> | <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|------------------|---------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| Concentración | Entre grupos | 135994. | 11 | 12363.1 | 44.78 | 0.0000 |
| | Intra grupos | 3313.26 | 12 | 276.105 | | |
| | Total (Corr.) | 139307. | 23 | | | |
| A260/280 | Entre grupos | 10.7688 | 11 | 0.97898 | 6.06 | 0.0021 |
| | Intra grupos | 1.9392 | 12 | 0.1616 | | |
| | Total (Corr.) | 12.708 | 23 | | | |
| A260/230 | Entre grupos | 11.9715 | 11 | 1.08832 | 9.22 | 0.0003 |
| | Intra grupos | 1.41605 | 12 | 0.118004 | | |
| | Total (Corr.) | 13.3876 | 23 | | | |

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 23. Gráficos de dispersión y gráficos de error estándar para el contenido de ADN de *Oenothera tetraptera* con respecto a las técnicas de extracción.

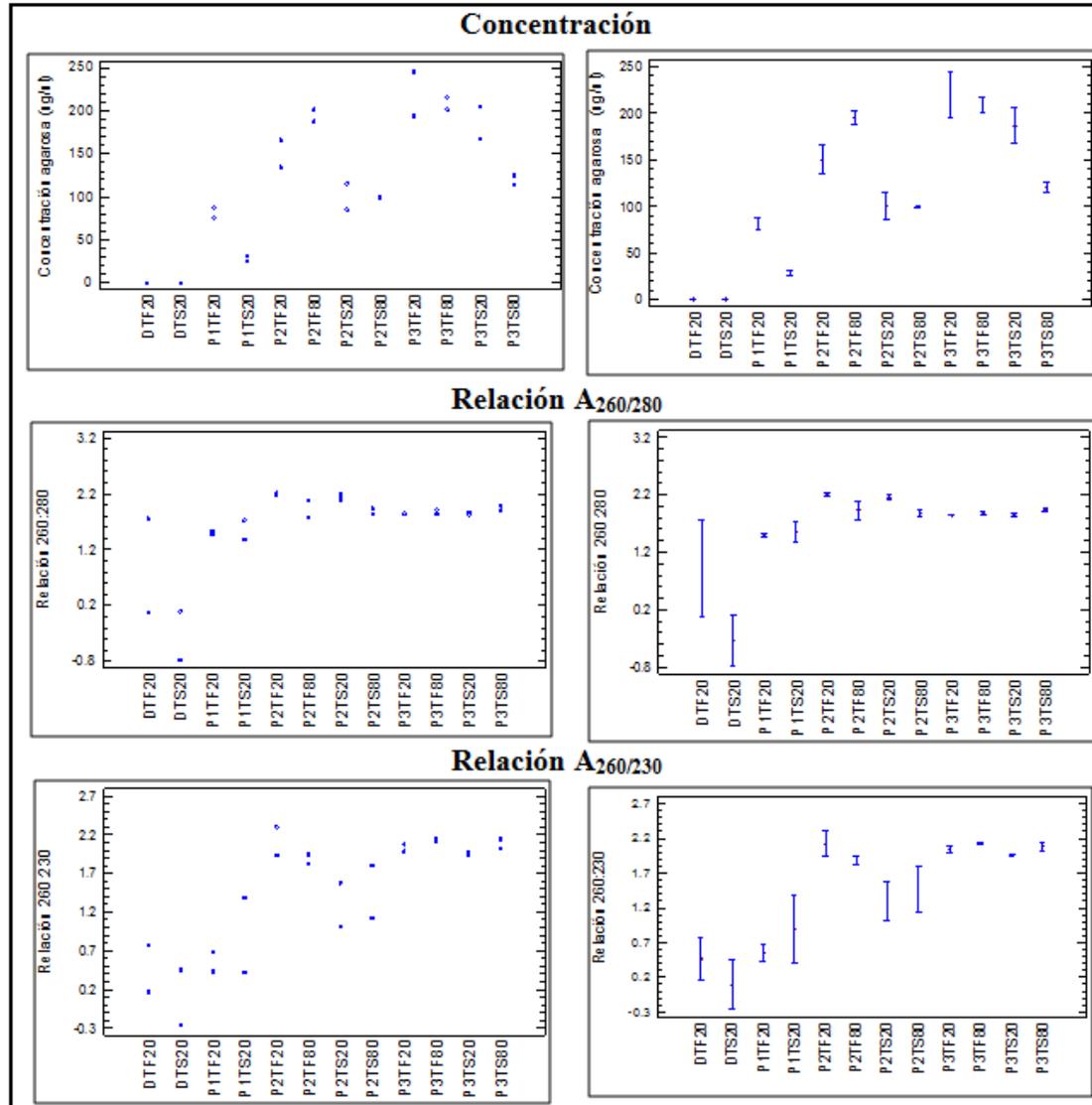


Figura 40. Gráficos de dispersión (Izquierda) y gráficos de error estándar (derecha) con intervalos de confianza al 95% para el contenido de ADN genómico de *Oenothera tetraptera* respecto a la técnica de extracción.

Fuente: Statgraphics Centurion XV.

Anexo 24. Imágenes de los geles de agarosa de *Oenothera tetraptera* para las diferentes técnicas de extracción.

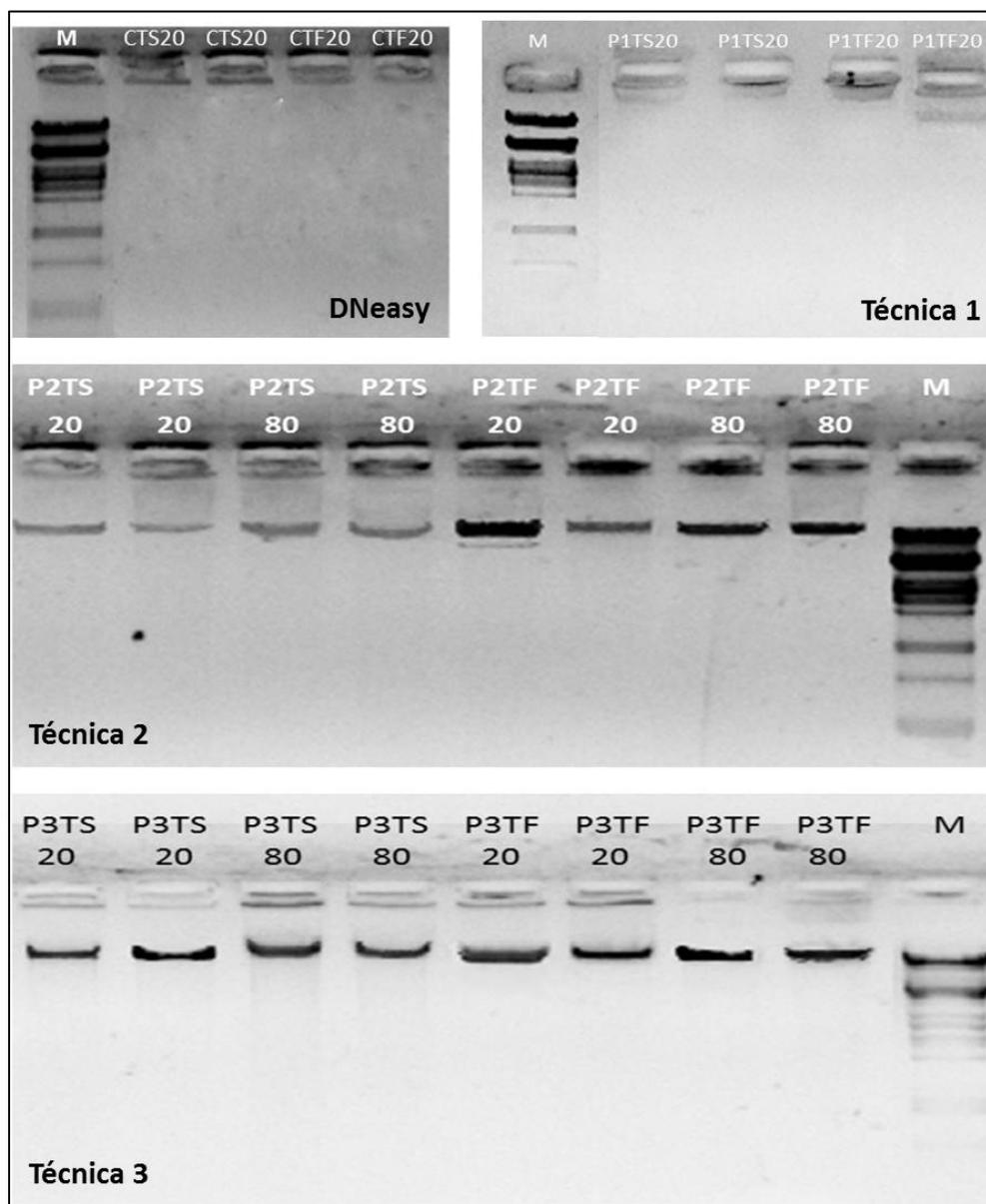


Figura 41. Geles de agarosa de *Oenothera tetraptera* respecto a la técnica de extracción.

Fuente: Quantity One.

Anexo 25. Análisis de costos comparativo para las técnicas de extracción evaluadas.

Tabla 34. Análisis presupuestal de costos por reactivos para cada técnica de extracción 1.

| REACTIVO | Técnica de extracción 1 | | | | | |
|---|-------------------------|----|---------------|------------------|----|---------------|
| | Para 100 reacción. | | | Para 1 reacción. | | |
| | CANTIDAD | | COSTO (\$) | CANTIDAD | | COSTO (\$) |
| Nitrógeno Líquido | 5.00 | l | 29.81 | 0.05 | l | 0.30 |
| Alcohol isoamilico | 100.00 | ul | 0.01 | 1.00 | ul | 0.00 |
| Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) | 2.00 | gr | 2.68 | 0.02 | gr | 0.03 |
| B-mercaptoetanol | 140.00 | ul | 0.10 | 1.40 | ul | 0.00 |
| Cloroformo | 2400.00 | ul | 0.20 | 24.00 | ul | 0.00 |
| EDTA | 2.34 | gr | 0.84 | 0.02 | gr | 0.01 |
| Etanol absoluto | 70.00 | ml | 0.00 | 0.70 | ml | 0.00 |
| Isopropanol | 50.00 | ml | 0.00 | 0.50 | ml | 0.00 |
| RNAse | 200.00 | ul | 5.64 | 2.00 | ul | 0.06 |
| PVP | 1.00 | gr | 0.61 | 0.01 | gr | 0.01 |
| Tris-HCl | 1.26 | gr | 0.67 | 0.01 | gr | 0.01 |
| Agua libre de nucleasas | 5.00 | ml | 0.53 | 0.05 | ml | 0.01 |
| Acetato de amonio | 0.00 | gr | 0.00 | 0.00 | | 0.00 |
| Cloruro de sodio | 8.19 | gr | 1.01 | 0.08 | gr | 0.01 |
| Proteinasa K | 0.00 | ul | 0.00 | 0.00 | | 0.00 |
| Gastos material (tips, tubos) | - | - | 600.84 | - | - | 6.01 |
| TOTAL \$ | | | 642.94 | | | 6.43 |
| TOTAL S/. | | | 1735.95 | | | 17.36 |

Fuente: Propia

Tabla 35. Análisis presupuestal de costos por reactivos para cada técnica de extracción

2.

| REACTIVO | Técnica de extracción 2 | | | | | |
|---|-------------------------|----|---------------|------------------|----|---------------|
| | Para 100 reacción. | | | Para 1 reacción. | | |
| | CANTIDAD | | COSTO (\$) | CANTIDAD | | COSTO (\$) |
| Nitrógeno Liquido | 0.00 | l | 0.00 | 0.00 | l | 0.00 |
| Alcohol isoamilico | 100.00 | ul | 0.01 | 1.00 | ul | 0.00 |
| Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) | 3.00 | gr | 4.02 | 0.03 | gr | 0.04 |
| B-mercaptoetanol | 570.00 | ul | 0.39 | 5.70 | ul | 0.00 |
| Cloroformo | 2400.00 | ul | 0.20 | 24.00 | ul | 0.00 |
| EDTA | 2.92 | gr | 1.04 | 0.03 | gr | 0.01 |
| Etanol absoluto | 180.00 | ml | 0.01 | 1.80 | ml | 0.00 |
| Isopropanol | 40.00 | ml | 0.00 | 0.40 | ml | 0.00 |
| RNAse | 200.00 | ul | 5.64 | 2.00 | ul | 0.06 |
| PVP | 5.00 | gr | 3.07 | 0.05 | gr | 0.03 |
| Tris-HCl | 1.26 | gr | 0.67 | 0.01 | gr | 0.01 |
| Agua libre de nucleasas | 5.00 | ml | 0.53 | 0.05 | ml | 0.01 |
| Acetato de amonio | 1.93 | gr | 0.46 | 0.02 | gr | 0.00 |
| Cloruro de sodio | 20.47 | gr | 2.52 | 0.20 | gr | 0.03 |
| Proteínasa K | 400.00 | ul | 40.64 | 4.00 | ul | 0.41 |
| Gastos material (tips, tubos) | - | - | 733.96 | - | - | 7.34 |
| TOTAL \$ | | | 793.18 | | | 7.93 |
| TOTAL S/. | | | 2141.59 | | | 21.42 |

Fuente: Propia

Tabla 36. Análisis presupuestal de costos por reactivos para cada técnica de extracción

3.

| REACTIVO | Técnica de extracción 3 | | | | | |
|---|-------------------------|----|---------------|------------------|----|---------------|
| | Para 100 reacción. | | | Para 1 reacción. | | |
| | CANTIDAD | | COSTO (\$) | CANTIDAD | | COSTO (\$) |
| Nitrógeno Liquido | 0.00 | l | 0.00 | 0.00 | l | 0.00 |
| Alcohol isoamilico | 100.00 | ul | 0.01 | 1.00 | ul | 0.00 |
| Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) | 2.50 | gr | 3.35 | 0.03 | gr | 0.03 |
| B-mercaptoetanol | 340.00 | ul | 0.23 | 3.40 | ul | 0.00 |
| Cloroformo | 2400.00 | ul | 0.20 | 24.00 | ul | 0.00 |
| EDTA | 2.34 | gr | 0.84 | 0.02 | gr | 0.01 |
| Etanol absoluto | 119.00 | ml | 0.01 | 1.19 | ml | 0.00 |
| Isopropanol | 40.00 | ml | 0.00 | 0.40 | ml | 0.00 |
| RNAse | 200.00 | ul | 5.64 | 2.00 | ul | 0.06 |
| PVP | 0.80 | gr | 0.49 | 0.01 | gr | 0.00 |
| Tris-HCl | 1.35 | gr | 0.72 | 0.01 | gr | 0.01 |
| Agua libre de nucleasas | 5.00 | ml | 0.53 | 0.05 | ml | 0.01 |
| Acetato de amonio | 4.62 | gr | 1.11 | 0.05 | gr | 0.01 |
| Cloruro de sodio | 15.58 | gr | 1.92 | 0.16 | gr | 0.02 |
| Proteínasa K | 0.00 | ul | 0.00 | 0.00 | ul | 0.00 |
| Gastos material (tips, tubos) | - | - | 600.84 | - | - | 6.01 |
| TOTAL \$ | | | 615.89 | | | 6.16 |
| TOTAL S/. | | | 1662.89 | | | 16.63 |

Fuente: Propia