

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Caracterización Molecular de Frutos de Chilacayote
(*Cucurbita ficifolia* Bouché) Mediante AFLP**

TESIS

Para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

PRESENTA

I.A. Araceli Moya Hernández

Comité tutorial:

Dra. Elsa Bosquez Molina
Dra. Alejandra Serrato Díaz
Dr. Gerardo Blancas Flores

Directora
Asesora
Asesor

México D.F., Julio 2015

México D.F. a 29 de Julio del 2015

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Caracterización Molecular de Frutos de Chilacayote (*Cucurbita
ficifolia* Bouché) Mediante AFLP**

que presentó

I.A. Araceli Moya Hernández

Comité Tutorial:

Director (a): Dra. Elsa Bosquez Molina

Asesor (a): Dra. Alejandra Serrato Díaz

Asesor: Dr. Gerardo Blancas Flores

Jurado:

Presidente (a): Claudia Barbosa Martínez

Claudia Barbosa Mtz.

Secretario (a): Alejandra Serrato Díaz

Alejandra

Vocal: Luz María Mera Ovando

Luz María Mera Ovando

Vocal: Gerardo Blancas Flores

Gerardo B.F.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-O”

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Poscosecha de Frutas y Hortalizas, el laboratorio Divisional de Biología Molecular y el laboratorio de Farmacología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Doctora Elsa Bosquez Molina.

México D.F. a 29 de Julio del 2015

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Caracterización Molecular de Frutos de Chilacayote (*Cucurbita ficifolia* Bouché) Mediante AFLP

que presentó

I.A. Araceli Moya Hernández

Comité Tutorial:

Director (a): Dra. Elsa Bosquez Molina

Asesor (a): Dra. Alejandra Serrato Díaz

Asesor: Dr. Gerardo Blancas Flores

Jurado:

Presidente (a): Claudia Barbosa Martínez _____

Secretario (a): Alejandra Serrato Díaz _____

Vocal: Luz María Mera Ovando _____

Vocal: Gerardo Blancas Flores _____

Agradecimientos

Dra. Elsa Bosquez Molina, mil gracias por haberme permitido trabajar con usted, por dedicar de su tiempo a aprender conmigo y a dirigirme con paciencia en este trabajo, por compartirme su conocimiento y por brindarme su invaluable amistad y apoyo.

Dra. Alejandra Serrato Díaz, gracias por tu asesoría en este proyecto, por tu infinita paciencia al enseñarme todo lo necesario para llevar a cabo mi trabajo dentro del LDBM y sobre todo por tu gran amistad y cariño.

Dr. Gerardo Blancas Flores, gracias por compartirme un poco de su conocimiento, por su paciencia con mis fobias y por ser parte de un logro más en mi vida académica.

Dra. Claudia Barbosa Martínez, gracias por su apoyo para la realización de este trabajo y sus observaciones posteriores para mejorar la calidad del mismo.

Mtra. Luz Ma. Mera Ovando, gracias por su colaboración y aportaciones a esta investigación.

A mis compañeros (as) y amigos (as) del laboratorio de Poscosecha y BM quienes hicieron los días de trabajo más amenos. Dení, Eli, Juan, Diana, Aline, Mayela, Memo, por mencionar algunos.

Oscar y Naye, gracias por ser mis compañeros de estudio y compartir esas tardes de retroalimentación para que esto pudiera empezar.

Gracias, porque este trabajo lleva un poco de cada uno de ustedes...

Dedicatoria

*A todos los que creyeron en mí y me han brindado su apoyo,
comprensión y cariño en todos los momentos de mi vida, ayudándome
a convertir un sueño más en realidad.*

*Sí supiese qué es lo que estoy haciendo, no le llamaría investigación,
¿verdad?*

Albert Einstein

Resumen

Cucurbita ficifolia Bouché (*C. ficifolia*) es un cultivo silvestre conocido en México como "chilacayote" cuyos frutos se utilizan como alimento. Los frutos presentan un pericarpio de diferentes colores (blanco, cremoso, varios tonos de verde, rayado o moteado) y semillas de color blanco o negro. Estudios recientes reportan que esta especie tiene propiedades hipoglucemiantes notables. Sin embargo, no hay ningún informe que demuestre si las propiedades hipoglucemiantes dependen de las características fenotípicas de la especie. Los objetivos de este estudio fueron: 1) Evaluar las características fenotípicas de *C. ficifolia* de diferentes zonas de producción a través de una diferenciación molecular. 2) Determinar si los extractos acuosos de los frutos de diferentes regiones tienen el mismo efecto hipoglucémico. Para lograr el primer objetivo, se recolectaron hojas jóvenes y frescas de chilacayote de los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Michoacán, Puebla y Estado de México. Se extrajo ADN de las muestras para analizar la diversidad genética mediante AFLP (por sus siglas en inglés Amplified Fragment Length Polymorphism). Se construyó una matriz binaria de presencia-ausencia, se calcularon las distancias genéticas y se obtuvo un dendrograma con el método UPGMA (por sus siglas en inglés Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Para el segundo objetivo, se obtuvo un extracto acuoso de la fruta y se administraron 500 mg de extracto/kg a ratones machos de 35 g (cepa CD-1). Se utilizó Glibenclamida (20 mg/kg) como control positivo y solución salina isotónica (4 ml/kg) como control negativo. Los resultados moleculares mostraron un 89.4-98.5% de similitud entre las muestras, lo cual indica que todos los frutos de chilacayote son genéticamente similares a pesar de sus diferencias morfológicas. Estos resultados sugieren que existe un importante efecto de las condiciones climáticas de cada región ya que el dendrograma agrupó a los frutos analizados por área geográfica. Todas las frutas mostraron un mayor efecto hipoglucémico que el de la glibenclamida siendo los frutos provenientes de Ixtapaluca, Edo. de México los que exhibieron un mejor efecto que los de Hidalgo, Michoacán, Tlaxcala y Puebla.

Abstract

Cucurbita ficifolia Bouché is a wild crop known in Mexico as "chilacayote" whose fruits are used as food. The fruits show a pericarp of different colors (whitish, creamy, various shades of green, striped or speckled) and seeds of white or black color. Recent studies report that this species has remarkable hypoglycemic properties. However, there is not any report which shows if the hypoglycemic properties depend on the phenotypic characteristics of the species. The objectives of this study were: 1) Evaluate the phenotypic characteristics of *C. ficifolia* of different producing areas through a molecular differentiation. 2) Determine if the aqueous extracts of the fruits from different regions have the same hypoglycemic effect. In order to achieve the first objective, young and fresh leaves of chilacayote from the states of Hidalgo, Tlaxcala, Michoacán, Puebla and Mexico State were collected. DNA samples were extracted to analyze the genetic diversity through AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). A binary matrix of presence-absence was built, the genetic distances were calculated and a dendrogram was obtained with the UPGMA method (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). For the second objective, an aqueous extract from the fruit was obtained and 500 mg extract/kg was administered to male mice of 35 g (strain CD-1). Glibenclamide (20 mg/kg) was used as positive control and an isotonic saline (4 ml per kg) as negative control. The molecular results showed an 89.4-98.5% of similarity among samples indicating that all the fruits of chilacayote are genetically similar despite their morphological differences. These results suggest that there is a significant effect of climatic conditions of each region as the dendrogram grouped by geographical area. All fruits showed better the hypoglycemic effect of glibenclamide. However the fruits from Ixtapaluca, Edo. De Mexico showed a healthier effect than Hidalgo, Michoacán, Tlaxcala and Puebla.

Índice general

1. <i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché	2
1.1. DESCRIPCIÓN.....	3
1.2. IMPORTANCIA.....	4
1.2.1. Información Económica.....	4
1.2.2. Distribución.....	4
1.2.3. Características nutritivas.....	5
1.2.4. Usos.....	5
1.2.5. Propiedades hipoglucemiantes	5
2. PRIMEROS MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	9
2.1. ESPECIE	9
3. MARCADORES MOLECULARES.....	12
3.1. POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)	13
3.2. ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)	14
3.3. MINISATÉLITES Y MICROSATÉLITES.....	14
3.4. POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)	15
3.4.1. Digestión.....	16
3.4.2. Ligación.....	16
3.4.3. Pre amplificación y amplificación selectiva.....	16
4. RELEVANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE LOS TIPOS	17
4.1. IMPACTO.....	18
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS.....	19

7. METODOLOGÍA	19
7.1. COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO	19
7.2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	22
7.4. PROCEDENCIA, TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CHILACAYOTE	23
7.4.1. <i>Cuantificación de ADN</i>	24
7.4.2. <i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	24
7.5. AFLP	25
7.5.1. <i>Digestión</i>	25
7.5.2. <i>Ligación</i>	26
7.5.3. <i>Preamplificación</i>	27
7.5.4. <i>Combinaciones de primers</i>	27
7.5.5. <i>Amplificación selectiva</i>	28
7.5.6. <i>Secuenciación automática</i>	29
7.6. MATRIZ DE PRESENCIA/AUSENCIA Y MATRIZ DE SIMILITUD	30
7.6.1. <i>Obtención de dendrograma</i>	30
7.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD HIPOGLUCEMIANTE	30
7.8. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO	31
7.8.1. <i>Preparación de las dosis de las diferentes muestras</i>	32
7.9. PREPARACIÓN DE LOS RATONES	33
7.10. ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS	33
7.11. MEDICIÓN DE GLUCOSA.....	34
7.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
8.1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	35
8.1.1. <i>Características de los frutos empleados en el presente estudio</i>	<i>35</i>
8.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	36
8.2.1. <i>Electroforesis en gel de agarosas.....</i>	<i>37</i>
8.3. AFLP.....	37
8.3.1. <i>Digestión y ligación</i>	<i>37</i>
8.3.2. <i>Pre amplificación</i>	<i>38</i>
8.3.3. <i>Combinación de primers.....</i>	<i>39</i>
8.3.4. <i>Matriz de presencia ausencia.....</i>	<i>39</i>
8.3.5. <i>Matriz binaria.....</i>	<i>40</i>
8.3.6. <i>Dendrograma</i>	<i>41</i>
8.4. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE	41
8.4.1. <i>Mediciones de glucosa.....</i>	<i>41</i>
8.4.2. <i>Análisis estadístico.....</i>	<i>43</i>
9. CONCLUSIONES	44
10. PERSPECTIVAS.....	44
11. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS.....	45

Índice de cuadros

Cuadro 1. Producción de chilacayote 2012 SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera).....	4
Cuadro 2. Efecto hipoglucémico de diferentes extractos de especies de plantas comparados con tolbutamida.	7
Cuadro 3. Resultados de glucosa en sangre (mg/dL) tomada a diferentes tiempos.....	7
Cuadro 4. Características geográficas y climáticas de las localidades de procedencia de las muestras.....	20
Cuadro 5. Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción.....	25
Cuadro 6. Reacción de ligación de adaptadores al ADN digerido.....	26
Cuadro 7. Reacción de preamplificación del ADN mediante PCR.....	27
Cuadro 8. Programa del termociclador para la reacción de preamplificación de ADN.....	27
Cuadro 9. Combinaciones de primers.....	28
Cuadro10. Reacción de amplificación selectiva mediante PCR.....	28
Cuadro 11. Programa del termociclador para la reacción de amplificación selectiva de ADN.....	29
Cuadro 12. Preparación de las muestras para el secuenciador.....	29
Cuadro 13. Cantidad administrada de glibenclamida, extracto o solución salina con respecto al peso de cada ratón.	33
Cuadro 14. Características de frutos de chilacayote provenientes de diferentes regiones.....	36
Cuadro 15. Concentración y pureza de ADN extraído de 12 muestras de chilacayote.....	36
Cuadro 16. Combinaciones de primers que amplificaron un mayor número de fragmentos de ADN en las muestras.....	39
Cuadro 17. Número de bandas totales monomórficas y polimórficas obtenidas de cada combinación de primers.....	40
Cuadro 18. Matriz de similitud correspondiente a las muestras de chilacayote.....	40
Cuadro 19. Resultados de Tukey-Kramer.....	43

Índice de figuras

Figura 1. Hoja, flor y fruto	1
Figura 2. Especies cultivadas comercialmente que pertenecen a la familia Cucurbitaceae del Género <i>Cucurbita</i> (calabaza): A) <i>C. moschata</i> (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret (calabaza de castilla); B) <i>C. argyrosperma</i> Huber (ayote o pipián); C) <i>C. maxima</i> Duchesne ex Lam (calabaza kabosha); D) <i>C. pepo</i> L. (calabaza de india) y E) <i>C. ficifolia</i> Bouché (chilacayote) (Cerón González y cols., 2010).....	2
Figura 3. Flores y hojas de <i>C. ficifolia</i> Bouché; A) flor femenina; B) flor masculina y	4
Figura 4. Disminución de glucosa después de la administración de los tratamientos (Alarcon-Aguilar y cols., 2002).	8
Figura 5. A) Cromosoma, forma compacta del ADN, B) Cromátidas con alelos homo y heterocigoto.....	11
Figura 6. Amplificación de ADN mediante PCR	13
Figura 7. Esquema general del método AFLP	17
Figura 8. Reacción de 2, 3, 5-cloruro de trifenil tatrazolio	21
Figura 9. Fotografías de los frutos provenientes de los Estados de Hidalgo (Hb y Hv se utilizaron dos diferentes), Michoacán (Mi), Tlaxcala (Tx), Puebla (Pb) y Edo de Méx (Acolman Ac, Ixtapaluca IX y Metepec Me).....	35
Figura 10. Gel de electroforesis en donde se verifica la integridad del ADN	37
Figura 11. Gel de electroforesis en donde se verifica la digestión/ligación del ADN.....	38
Figura 12. Gel de electroforesis en donde se verifica la preamplificación de ADN	38
Figura 13. Dendrograma obtenido al realizar un bootstrap de 1000 repeticiones con el índice de Nei y Li con UPGMA.	41
Figura 14. Efecto hipoglucémico de <i>C. ficifolia</i> Bouché comparando con dos controles; glibenclamida y SSI (solución salina isotónica).....	42
Figura 15. Efecto hipoglucémico del chilacayote.....	42

Introducción

México, gracias a que presenta casi todos los climas del mundo y tiene una compleja geología y una accidentada topografía, permite que se desarrollen la mayoría de los ecosistemas terrestres que existen en el planeta. Por esta razón es considerado un país megadiverso y es la cuarta nación en cuanto a riqueza de especies (Sarukhán y cols., 2009). Esta riqueza se ve reflejada a nivel genético, cada especie contiene una gran cantidad de información que permite reconstruir la historia evolutiva y la relación que hay entre los diferentes organismos, así como identificarlos, caracterizarlos y clasificarlos (Cornejo Romero y cols., 2014).

Inicialmente la caracterización e identificación de variedades se basaba en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. Sin embargo, el uso de estos marcadores tiene muchas limitantes ya que su expresión depende de factores ambientales o fenológicos (estadios de desarrollo). Actualmente existen los marcadores moleculares (segmento de ADN con una ubicación física identificable), éstos pueden ser evaluados desde los primeros estadios de desarrollo, no dependen de la época del año y no requieren de otros caracteres para la identificación (Azofeifa-Delgado, 2006). Dentro de este grupo de marcadores se encuentran los AFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados) los cuales se utilizaron para llevar a cabo este estudio. En investigaciones anteriores se ha demostrado que es la mejor técnica para encontrar variabilidad genética entre plantas (Azofeifa-Delgado, 2006).

En este estudio se realizó un análisis genético de la especie de *Cucurbita ficifolia* Bouché (Figura 1) proveniente de diferentes regiones con el objetivo de identificar si existe variación genética, ya que se han encontrado algunas diferencias fenotípicas tanto en el color del pericarpio como en el color de las semillas. También se aborda el tema de la Diabetes Mellitus (DM) debido a que diferentes estudios han verificado que los frutos de esta especie poseen un efecto hipoglucémico (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Xia y Wang, 2006; Díaz-Flores y cols., 2012 y Fortis-Barrera y cols., 2013). Por lo que se planteó un segundo objetivo que fue determinar si estos frutos tienen dicho efecto.



Figura 1. Hoja, flor y fruto de *C. ficifolia*

1. *Cucurbita ficifolia* Bouché

La familia Cucurbitaceae comprende cerca de 90 géneros y 750 especies. Uno de los géneros más importantes es el de *Cucurbita* que cuenta con 27 especies. Las especies de este género forman un grupo conocido como calabazas, de las cuales cinco se cultivan comercialmente: *C. pepo* L. (calabacín), *C. ficifolia* Bouché (chilacayote), *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret (calabaza de castilla); *C. maxima* Duchesne ex Lam (calabaza kabosha) y *C. argyrosperma* Huber (ayote o pipián) (Figura 2) (Cerón González y cols., 2010).

C. ficifolia es conocida en México como chilacayote, nombre que procede del náhuatl (*tzilac* 'liso' *yayotli* 'calabaza') (<http://www.fondodeculturaeconomica.com>). Los frutos del chilacayote se caracterizan por su similitud con las sandías por la forma ovalada y la presencia de semillas negras (Nee, 1990). Éstos poseen una ligera variación en el color de la corteza, que puede ser de color blanco-cremoso y verde uniforme, reticulado o rayado. Normalmente presenta una capa gruesa fibrosa de pulpa blanca con semillas negras o blancas (Prohens y Nuez, 2008).

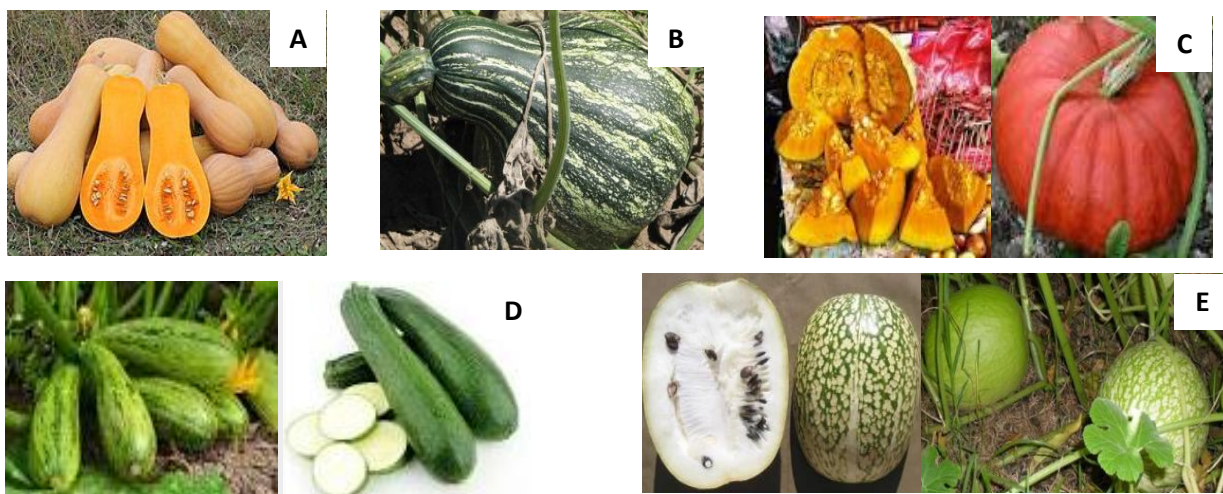


Figura 2. Especies cultivadas comercialmente que pertenecen a la familia Cucurbitaceae del Género *Cucurbita* (calabaza): A) *C. moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poiret (calabaza de castilla); B) *C. argyrosperma* Huber (ayote o pipián); C) *C. maxima* Duchesne ex Lam (calabaza kabosha); D) *C. pepo* L. (calabaza de india) y E) *C. ficifolia* Bouché (chilacayote) (Cerón González y cols., 2010).

De acuerdo con algunos autores el origen de *C. ficifolia* es centroamericano, debido a la amplia difusión de nombres de origen Náhuatl como chilacayote denotan un origen mexicano, otros sugieren que es de América del sur, específicamente de la zona de Los Andes y hay evidencias arqueológicas que apoyan este origen ya que los restos más antiguos se han encontrado en Perú. Sin embargo no se ha podido ratificar su origen. Hasta el momento se cuenta con la siguiente información taxonómica. (CONABIO, 2009).

REINO: Plantae
DIVISIÓN: Magnoliophyta
CLASE: Magnoliopsida
ORDEN: Violales
FAMILIA: Cucurbitaceae
GÉNERO: *Cucurbita* L., 1981
ESPECIE: *C. ficifolia* Bouché, 1837

1.1. Descripción

C. ficifolia es de hábito rastrero, monoica, herbácea anual en zonas templadas y perenne en zonas tropicales, resistente a bajas temperaturas, pero no a heladas severas. Presenta espinas cortas y afiladas dispersas en las partes vegetativas de los tallos vellosos que miden de 5 a 25 m de longitud, sus hojas son pecioladas con nervaduras, de color verde oscuro y dorso pubescente. Presentan zarcillos ramificados y las flores son solitarias, pentámeras y axilares; grandes y de pétalos carnosos con corola de hasta 7.5 cm de diámetro. Las flores masculinas son largas con cáliz acampanado, tienen tres estambres mientras que las flores femeninas tienen pedúnculos de 3 a 5 cm de largo, ovario ovoide multilocular y corola mayor que la de las flores masculinas (Figura 3). Una misma planta puede producir hasta 50 frutos en condiciones favorables (Lira, 1995; Lira y cols., 1998).



Figura 3. Flores y hojas de *C. ficifolia* Bouché; A) flor femenina; B) flor masculina y C) hoja y zarcillo (Lira, 1995; Lira y cols., 1998)

1.2. Importancia

1.2.1. Información Económica

En México, el chilacayote se encuentra entre las especies comestibles de menor importancia económica por la reducida superficie cosechada y el valor de la cosecha (Cuadro 1. Producción de chilacayote 2012 SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera)). A pesar de ello, las flores y los frutos forman parte de la alimentación en varias regiones del país. Se consume en pequeñas porciones como complemento del plato fuerte o como platillo especial para días festivos, principalmente en el Valle de México (Molina y Córdova, 2006).

Cuadro 1. Producción de chilacayote 2012 SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera)

<i>C. ficifolia</i> Bouché (chilacayote)	Morelos	Edo. México	Distrito Federal	Nacional
Superficie sembrada (Ha)	18	145	6	169
Superficie Cosechada (Ha)	18	145	6	169
Producción (Ton)	223.20	3,526.35	81	3,830.55
Rendimiento (Ton/Ha)	12.40	24.32	13.50	22.67
PMR (\$/Ton)	5,800	4,172.69	5,018.52	4,285.49
Valor de la Producción (Miles de Pesos)	1,294.56	14,714.37	406.50	16,415.43

<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

1.2.2. Distribución

De acuerdo con la FAO (por sus siglas en inglés: *Food and Agriculture Organization*), el cultivo del chilacayote se desarrolla en altitudes entre los 1000 y los 3000 m, en prácticamente todas las cordilleras de América Latina, desde el norte de México hasta Argentina y Chile.

La restricción del cultivo en zonas de notable altitud es un carácter distintivo respecto a las otras especies cultivadas del género *Cucurbita* ya que esto les permite crecer en un rango más amplio de condiciones ecológicas

(http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_3.htm#30).

1.2.3. Características nutritivas

En las semillas de los frutos de chilacayote se encuentra el valor nutritivo más importante por su aporte considerable de aceites y proteínas, mientras que la pulpa contiene una moderada cantidad de carbohidratos y bajo contenido en vitaminas y minerales (FAO, 1992).

1.2.4. Usos

En América, las diferentes partes de la planta de *C. ficifolia* se destinan a diversos usos alimenticios, los frutos inmaduros se consumen cocinados como hortaliza, mientras que la pulpa de los frutos maduros se destina a la elaboración de dulces y bebidas refrescantes o ligeramente alcohólicas, en algunas regiones se utiliza el fruto maduro como forraje para el ganado. Los tallos jóvenes (o puntas de las guías) y las flores también se consumen como verdura cocida y en sopas. Las semillas son también muy apreciadas y se emplean para preparar dulces con miel, conocidos como palanquetas (CONABIO, 1990).

1.2.5. Propiedades hipoglucemiantes

La práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales es conocida como herbolaria y tiene un gran arraigo en nuestro país, ya que estas plantas constituyen el recurso más conocido y accesible para la mayoría de la población. La OMS (Organización Mundial de la Salud) reconoce el valor de esta práctica y le otorga gran importancia en los sistemas públicos para la salud. La extraordinaria riqueza florística en México ha permitido que la herbolaria floreciera desde la época prehispánica, estos conocimientos han sido transmitidos durante siglos (Huerta, 1997).

Hoy en día las plantas son fuente de obtención de diferentes medicamentos, aproximadamente el 50 % de los productos farmacéuticos provienen de productos vegetales y el resto son productos químicos sintetizados. La mayoría de estas plantas parecen tener el carácter de una

panacea debido a la coexistencia de varios principios activos dentro de la misma especie, razón por la cual, botánicos, médicos y farmacólogos trabajan en conjunto para transformar a la herbolaria en un recurso valioso para la curación de enfermedades, mediante la caracterización e identificación de los principios activos y la discriminación de los compuestos que llegaran a resultar tóxicos (Cirilo Aguilar y cols., 2011).

En México es muy común el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades como la diabetes Mellitus (DM), caracterizada por un alto nivel de glucosa en la sangre, resultado de defectos en la capacidad del cuerpo para producir o usar insulina. La DM tipo 2 es la forma más común de esta enfermedad y se caracteriza por la producción insuficiente de la insulina o el mal uso de ésta por las células, razón por la cual se han realizado estudios para comprobar el efecto hipoglucémico de algunas plantas útiles para el tratamiento de esta enfermedad (Hayes Dorado, 2008).

Entre las diversas especies vegetales a las que se les atribuyen propiedades hipoglucémicas se encuentran la guayaba (*Psidium guajava*), la espinaca (*Spinacia oleracea*), el nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill), el pepino (*Cucumis sativus*), la cebolla (*Allium cepa*), el chilacayote (*Cucurbita ficifolia*), el comino (*Cuminum cyminum*), entre otros (Roman-Ramos y cols., 1995).

En un estudio realizado en la UAM-I por Roman-Ramos y cols (1995), se comparó el efecto hipoglucémico de extractos acuosos de diferentes órganos de 12 especies vegetales en conejos de laboratorio a los cuales se les administró previamente una solución de dextrosa al 50% en una dosis de 4 mL solución dextrosa/kg peso corporal y 4 mL extracto acuoso/kg peso corporal de cada especie vegetal (132 g de muestra seca en 1 L de agua). Los conejos control se trataron con una suspensión de tolbutamida (medicamento empleado para el control de la DM tipo 2) en una dosis 20 mg/kg.

Los resultados reportados mostraron que el extracto de frutos de chilacayote redujo en un 30.7 % el nivel de glucosa a partir de la tercera hora de haberse administrado la dosis (Cuadro 2). Cabe señalar que en este estudio el chilacayote utilizado se adquirió en el mercado de Sonora del D.F. y no se reporta ni la procedencia de este fruto ni el estado de desarrollo o la madurez del mismo.

Cuadro 2. Efecto hipoglucémico de diferentes extractos de especies de plantas comparados con tolbutamida.

Especie	%
Chilacayote	30.7
Frijol	20.8
Nopal	17.8
Tolbutamida	16.1
Espinaca	13.9
Pepino	13.6
Comino	12.9
Guayaba	8.4
Cebolla	6.8
Ajo	6.5
Coliflor	5.2
Lechuga	4
Col	3

(Roman-Ramos y col., 1995)

El resultado anterior motivó otro estudio para probar el efecto del extracto de chilacayote en personas. En este caso se formaron dos grupos de pacientes con DM tipo 2 a quienes se les suspendió el tratamiento de tolbutamida o glibenclamida por 24 h. A uno de los grupos (A) se le administró por vía oral una dosis de 4 mL de jugo de chilacayote/kg peso corporal, mientras que al grupo (B) se les administró únicamente agua en la misma dosis. Los pacientes del grupo A disminuyeron sus niveles de glucosa desde la primera hora llegando a ser significativa la disminución a partir de la tercera hora de haberse administrado el jugo (Cuadro 3) (Acosta-Patiño y cols., 2001).

Cabe señalar que los frutos utilizados en este estudio provenían del estado de Puebla (no se indica la región particular) y presentaban un tamaño pequeño (diámetro de 8 cm).

Cuadro 3. Resultados de glucosa en sangre (mg/dL) tomada a diferentes tiempos

Hora	0	1	2	3	4	5
Grupo A	12.07	11.67	10.58	9.42	8.83	8.37
Grupo B	10.59	10.83	10.67	10.67	10.89	12.06

(Acosta-Patiño y cols., 2001)

Otros investigadores reportaron el efecto del jugo de los frutos de chilacayote provenientes de Acolman, Edo. De México sobre ratones de laboratorio a los que se les indujo previamente diabetes. Dichos ratones se dividieron en tres grupos administrando las siguientes dosis: al primer grupo (Control negativo) se le administraron 4 mL de solución salina isotónica /kg peso corporal, al segundo grupo (Control positivo) 80 mg de tolbutamida/kg peso corporal y al tercer grupo (Tratado) 500 mg de jugo de chilacayote /kg peso corporal. La administración de las dosis se realizó por vía intraperitoneal (Aларcon-Aguilar y cols., 2002). En este reporte no se especifica el estado de desarrollo empleado de los frutos.

Los resultados corroboraron la propiedad hipoglucémica del fruto de chilacayote, como se puede apreciar en la Figura 4.

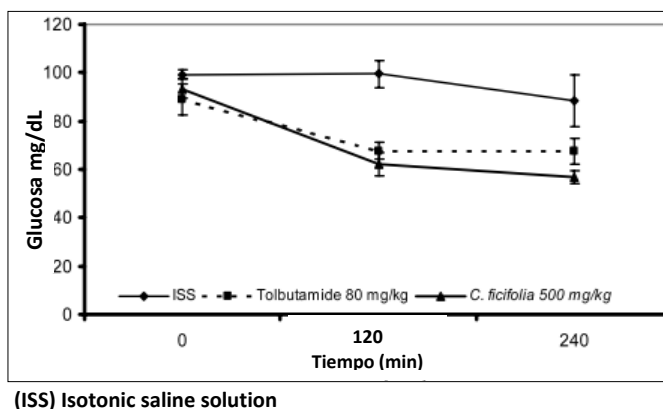


Figura 4. Disminución de glucosa después de la administración de los tratamientos (Aларcon-Aguilar y cols., 2002).

Los reportes anteriormente mencionados y reportes posteriores aportan evidencias objetivas del potencial de esta especie como alternativa para disminuir la glucosa en sangre (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Xia y Wang, 2006; Díaz-Flores y cols., 2012 y Fortis-Barrera y cols., 2013).

A pesar de las evidencias científicas mencionadas sobre la notable propiedad hipoglucemiante del chilacayote, en ninguna de ellas se menciona la variedad ni el estado de madurez de los frutos empleados, información que resulta relevante para determinar si las respuestas encontradas se pueden atribuir a la especie, variedad, estado de madurez u otra característica.

2. Primeros métodos empleados para la clasificación taxonómica

Debido a la gran diversidad de especies tanto de plantas como animales surgió la necesidad de clasificarlas, siendo Aristóteles (384-322 a.C.) quien publicó la primera clasificación conocida y se cree que es anterior a cualquier otra existente. Introdujo palabras como sustancia, especie y género, términos conservados y redefinidos por Carlos Linneo. También estudió a los animales y los clasificó de acuerdo a su método de reproducción, cosa que luego hizo Linneo con las plantas. Más adelante Andrea Caesalpino (1519-1603) propuso la primera organización metódica de plantas con base a su estructura, con respecto al tronco y fructificación, dividió las plantas en cincuenta "grandes géneros". John Ray (1627-1705), clasificó las plantas de acuerdo a similitudes y diferencias procedentes de su observación y la clasificación moderna nació con los trabajos de Carlos Linneo (1707-1778), quien en su trabajo *Systema Naturae* (primera ed. 1735), dividió la naturaleza en tres reinos: mineral, vegetal y animal y en cinco rangos: clase, orden, género, especie y variedad. Propuso la clasificación jerárquica de las especies y fórmula binominal (http://www.ecured.cu/index.php/Clasificaci%C3%B3n_biol%C3%B3gica#Historia).

2.1. Especie

De acuerdo con Darwin, el concepto de *especie* se refiere a un conjunto de organismos que se parecen mucho (Marzocca, 1985). Sin embargo este término ha sido materia de grandes polémicas, hasta el día de hoy existen muchas definiciones ya que se puede definir desde el punto de vista ecológico, biológico, evolutivo, taxonómico y de nomenclatura entre otros (Rodríguez, 2000). Una de las definiciones más aceptada para el termino especie es la siguiente; grupo de organismos que pueden entrecruzarse y que de esa cruce nazcan crías fértiles, es decir, que a su vez también puedan tener crías (Nabors, 2006).

El nombre de cada especie se escribe como una combinación binaria y siempre aparece en cursiva o subrayado. Se compone de una palabra que identifica el género y escrita con mayúscula y otra que designa la especie conocida como epíteto específico escrita en minúscula (Marzocca, 1985).

Dada la enorme variedad existente dentro de los grupos de organismos, se ha ampliado el número de niveles en la jerarquía taxonómica. Los niveles como subespecie, variedad, raza y cultivar sirven para identificar las variantes silvestres y domesticadas dentro de una especie (Nabors, 2006). En el capítulo III del ICBN (International Code of Botanical Nomenclature) se indica la nomenclatura de los taxones de acuerdo a su rango como se menciona (<http://www.bgbm.org/iapt/nomenclature/code/saintlouis/0001ICSLContents.htm>).

Los taxones (grupos de la clasificación) están sujetos a una permanente revisión para mejorar la consistencia con el principio de la descendencia común, que desde Charles Darwin es la base del agrupamiento. La sistemática molecular, que utiliza análisis de ADN genómico, ha conducido a muchas modificaciones recientes de acuerdo a lo consultado en la página (http://www.ecured.cu/index.php/Clasificaci%C3%B3n_biol%C3%B3gica#Historia).

Históricamente, los estudios relacionados con diversidad genética en plantas han estado relacionados con datos arqueológicos, botánicos, lingüísticos, históricos y morfológicos. Las principales limitantes de esta caracterización son la influencia ambiental, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el reducido número de genes involucrados en este proceso (Becerra y Paredes, 2000).

Anteriormente se utilizaban como marcadores los caracteres morfológicos en general fenotipos de fácil identificación visual los cuales eran utilizados en el estudio de la genética y mejoramiento que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Farinango, 2007).

En los últimos 30 años, las técnicas moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar su diversidad, las relaciones genéticas y el grado de similitud y clasificarlas. La caracterización molecular emplea como herramienta útil a los marcadores moleculares en el proceso de obtención y caracterización genética de nuevas variedades (Farinango, 2007).

2.2. Genes

En los organismos eucariontes el ADN (ácido desoxirribonucleico) está organizado en forma de cromosomas situados en el núcleo de la célula (Beas y cols., 2009), el conjunto de todos estos cromosomas se conoce como genoma celular. Cada cromosoma está formado por dos cromátidas y en estas se encuentran millones de genes, segmentos de material genético de secuencia específica de nucleótidos que contiene la información necesaria para controlar el metabolismo de un ser vivo, dirigen la síntesis de proteínas y su propia replicación. Cada gen tiene un sitio determinado llamado locus o loci (singular y plural). En organismos diploides (con dos juegos de cromosomas) se puede tener dos alelos o formas de un mismo gen en el mismo locus en cada cromosoma, si ambos tienen el mismo tipo de alelo se denomina homocigoto y si estos son diferentes, heterocigoto (Figura 5) (Swanson y cols. 2010).

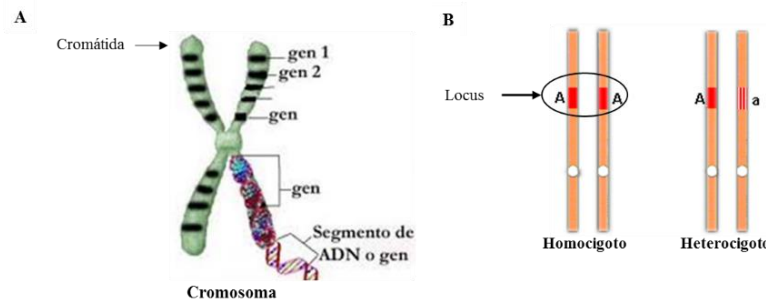


Figura 5. A) Cromosoma, forma compacta del ADN, B) Cromátidas con alelos homo y heterocigoto.

El ADN se forma por la unión de muchos desoxirribonucleótidos y posee dos cadenas antiparalelas (5'-3' y 3'-5') unidas entre sí mediante las bases nitrogenadas por medio de puentes de hidrógeno. La adenina forma dos puentes de hidrógeno con la timina y la citosina forma tres puentes de hidrógeno con la guanina formando una doble hélice (Beas y cols., 2009).

3. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas que permiten analizar la variación entre individuos. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar usando a todo el individuo o sólo parte de él. Existen dos tipos de marcadores: los marcadores bioquímicos (isoenzimas y las proteínas de reserva en semilla) y los marcadores moleculares como los Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RADP), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), Minisatélites y Microsatélites (Becerra y Paredes, 2000).

La mayoría de estos marcadores se obtienen por medio de la técnica PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y electroforesis, que hacen posible analizar la variación en la molécula del ADN con un detalle sin precedentes (Sambrook y Russell, 2001). Esta técnica fue creada por Kary Mullis en los años ochenta y ha revolucionado la genética molecular, haciendo posible el estudio y análisis de una amplia gama de genes, incluso se pueden obtener a partir de un genoma complejo. La técnica de PCR permite producir un enorme número de copias de una secuencia de ADN específica (proceso denominado amplificación del ADN), sin recurrir a la clonación ya que esta última requiere de vectores (moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN) (Torres y Eugenia, 1995).

La PCR consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de secuencias específicas de ADN en presencia de la enzima *Thermus aquaticus* polimerasa (*Taq* polimerasa), esta enzima es un tipo de ADN polimerasa termoestable aislada de la eubacteria termofílica *Thermus aquaticus*. Esta reacción se basa en el apareamiento y polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos también llamados primers o cebadores, utilizados como iniciadores (Farinango, 2007).

La reacción de PCR se basa en tres etapas o ciclos: 1) desnaturalización; separación de las hebras de ADN, 2) alineamiento; unión de los iniciadores a una secuencia complementaria de ADN molde y 3) extensión del ADN; síntesis semi conservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa. Cada una de las etapas está determinada por una temperatura específica. El proceso permite generar en 30 ciclos de

amplificación, más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula (Figura 6) (Bohinski, 1991).

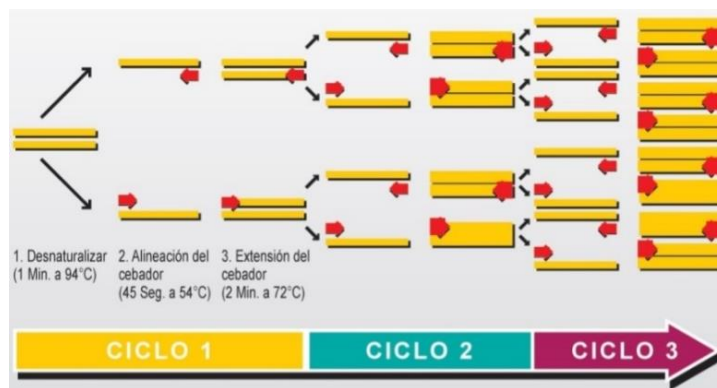


Figura 6. Amplificación de ADN mediante PCR

En especies para las que no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados, como es el caso en esta investigación, o bien para las cuales se quiere obtener información genética de manera rápida y relativamente económica, se pueden emplear marcadores moleculares inespecíficos. Estos marcadores también usan iniciadores que amplifican al azar diferentes regiones en el genoma y generan un patrón de productos de PCR o huella genética (Sambrook y Russell, 2001).

3.1. Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

El análisis de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se basa en expresar diferencias específicas de ADN que fueron reconocidas por enzimas de restricción, cada una de ellas reconoce y corta solo una secuencia específica de bases nitrogenadas, siempre y cuando no se encuentren metiladas (Eguiarte y cols., 2007).

Las principales ventajas de los RFLPs radican en la presencia de un número ilimitado de fragmentos de diferente longitud y no son afectados por el medio ambiente. Y dentro de las principales desventajas de los RFLP están la clonación de los fragmentos de ADN, detección de RFLP en las membranas y el uso de radioactividad; tareas consideradas laboriosas, lentas y caras (Becerra y Paredes, 2000).

3.2. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Los marcadores conocidos como RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic ADN), son útiles para fines de los estudios de genética de poblaciones, estos marcadores son dominantes, lo cual significa que bajo el modelo de un locus con dos alelos, la presencia de una banda representa al genotipo dominante, mientras que una ausencia de la banda representa al genotipo homocigoto recesivo. Los RAPDs son una técnica que consiste en la amplificación de segmentos de ADN con iniciadores pequeños (generalmente de 10 nucleótidos de longitud) de secuencias aleatorias no-palindrómicas (secuencia de ADN que se leen igual de 5' a 3' y de 3' a 5'), con un contenido de G + C entre 50 y 80 % (Sambrook y Russell, 2001).

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo tienen la desventaja de ser marcadores dominantes, cuyo uso ha sido cuestionado debido a las suposiciones que se deben hacer para efectuar los análisis de frecuencias alélicas, de estructura genética y de diversidad (Becerra y Paredes, 2000).

3.3. Minisatélites y Microsatélites

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) ADN están constituidas por repeticiones de 1 a 6 a pares de bases. Se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos, consecuencia de una elevada tasa de mutación. (Cornejo Romero y cols., 2014).

Los minisatélites están compuestos por una unidad básica de secuencia de 6-25 nucleótidos que se repite en tándem (repeticiones de una determinada secuencia de aminoácidos) generando secuencias de entre 100 y 20 000 pares de bases. Algunos minisatélites por su gran inestabilidad presentan una notable variabilidad entre individuos distintos. Se consideran polimorfismos multi alélicos, dado que pueden presentarse en un número de repeticiones muy variable, y se denominan VNTR (por sus siglas en inglés Variable Number Tandem Repeat). Son marcadores muy utilizados en genética forense, ya que permiten establecer una huella genética característica de cada individuo (Cornejo Romero y cols., 2014).

El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsátélite) (Azofeifa-Delgado, 2006).

3.4. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

La técnica molecular denominada AFLP (por sus siglas en inglés Amplified Fragment Length Polymorphism) pertenece al grupo de marcadores moleculares multi-locus que permiten analizar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de este (Cornejo Romero y cols., 2014). Esta técnica se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción digeridos a partir del ADN genómico total utilizando la PCR (Castañon-Najera y cols., 2011).

La eficacia para detectar polimorfismo es mayor que la obtenida con RAPD y RFLP. Anteriormente era una desventaja el tiempo necesario para el análisis ya que se realizaba en forma no automatizada, se realizaban geles de poliacrilamida en los cuales se tenían que identificar las bandas (Becerra y Paredes, 2000). En la actualidad ya se cuenta con programas como GeneMarker® V1.5 The Biologist Friendly Software SoftGenetics, Free Tree y Tree View para el análisis de los datos obtenidos con el secuenciador automático, con los que se pueden identificar las bandas, construir la matriz binaria y el dendrograma (Cornejo Romero y cols., 2014).

Ya que los marcadores AFLP tiene una mayor eficiencia debido al gran número de bandas polimórficas, que no se requiere de un conocimiento previo del genoma a estudiar (como es el caso que nos ocupa) y debido a que la posibilidad de usar diferentes combinaciones de *primers* selectivos y diferentes enzimas de restricción, éstos constituyen una herramienta de gran utilidad para la detección de polimorfismos en todo el genoma. Una vez estandarizada la técnica, puede realizarse a gran velocidad. Estos marcadores desde sus inicios han sido utilizados principalmente para determinar la diversidad genética especialmente en plantas, bacterias y hongos (Cornejo Romero y cols., 2014). Por lo cual, es la técnica que se utilizó en esta investigación para la caracterización de *C. ficifolia*. El desarrollo de la técnica consiste en tres etapas principales descritas a continuación.

3.4.1. Digestión

Digestión del ADN genómico total con dos enzimas de restricción; generalmente *Mse* I que reconoce y corta cuatro pares de bases y *Eco* RI que reconoce y corta cada seis pares de bases, generando un gran número de fragmentos (Cornejo Romero y cols., 2014).

3.4.2. Ligación

Es la unión de secuencias específicas (adaptadores) a los bordes de los fragmentos generados por restricción; estas son reconocidas por *primers* que al unirse a los bordes de los fragmentos generados por la digestión generan extremos con una secuencia conocida permitiendo que el fragmento sea amplificado por PCR (Cornejo Romero y cols., 2014).

3.4.3. Pre amplificación y amplificación selectiva

Dos reacciones de PCR; la primera es una amplificación preselectiva que se llevará a cabo con *primers* que corresponden a la secuencia específica del adaptador, éstos contienen una base extra en el extremo 3' dando como resultado un conjunto de fragmentos que llevan la secuencia complementaria al iniciador y complementan la base extra adicionada. Este proceso permite discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman y amplificar solo aquellos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional. Con los productos obtenidos de la amplificación preselectiva se realiza una segunda PCR (amplificación selectiva). Aquí se utilizan iniciadores con la misma secuencia que los usados en la amplificación preselectiva más dos o tres bases adicionales, por lo que sólo se amplificará una porción del genoma fragmentado (Cornejo Romero y cols., 2014).

El iniciador homólogo al sitio de restricción *Mse* I es etiquetado con un fluoróforo para poder detectar el fragmento. Finalmente se obtienen fragmentos de diferentes tamaños que serán separados en el secuenciador automático (Simpson y cols., 1999). En la figura 7 se muestra un esquema general de las principales etapas de la técnica de AFLP.

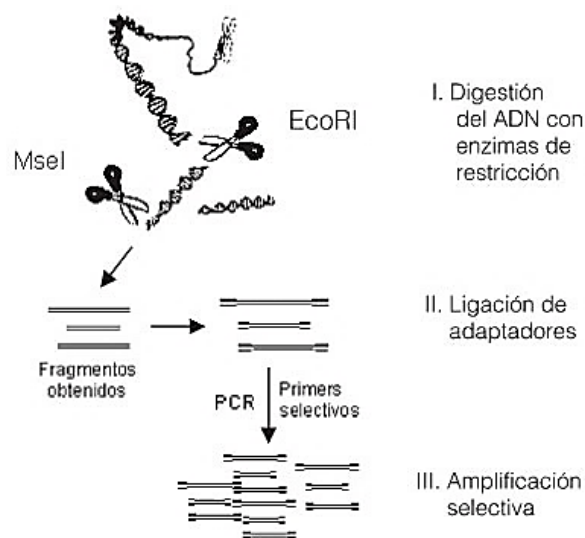


Figura 7. Esquema general del método AFLP

4. Relevancia de la identificación de los tipos

La gran diversidad de especies de plantas, animales, hongos y bacterias se refleja a nivel de ADN, ya que cada especie tiene una gran cantidad de genes y alelos (forma alterna de un gen que difiere en secuencia o función). El ADN constituye un riquísimo archivo de información que permite reconstruir la historia evolutiva de los grupos y las relaciones entre los organismos, es decir, proporciona la mejor herramienta para entender su evolución y sistemática (Schlötterer, 2004).

Los genes de las diferentes especies se han modificado a lo largo del tiempo por la selección natural, adaptándose a las condiciones climáticas y biológicas de su entorno (Schlötterer, 2004). Dando como resultado diferencias en el fenotipo (características físicas) y en el genotipo.

En el caso particular de las especies de la familia Cucurbitácea, cinco, forman un grupo conocido como calabazas (Prohens y Nuez, 2008). El número básico de cromosomas de todas las especies de *Cucurbita* es $2n = 2x = 40$, el patrón cromosómico o cariotipo sugieren que estas especies son de origen alopoliploide, es decir, que contienen tres o más juegos de cromosomas provenientes de dos o más especies diferentes causado por el cruzamiento (hibridación) entre especies (Cerón González y cols., 2010).

Los frutos de las diferentes regiones en donde se encuentra cultivado presentan diferencias principalmente en el color de exocarpo y en el color de sus semillas (CONABIO, 1990). Para poder determinar si dichas variaciones se deben a condiciones ecológicas, o si son tipos o variedades diferentes de chilacayote, se propone realizar una caracterización molecular del chilacayote de diferentes regiones en donde crece y se desarrolla: Hidalgo, Edo. de México, Michoacán, Puebla y Tlaxcala. Al conocer estos datos se podrá determinar cuál o cuáles variedades (en caso de ser diferentes) tiene mayor capacidad hipoglucémica. De esta forma se tendrá la seguridad de hablar de un tipo o variedad específica para estudios posteriores donde se analice su capacidad hipoglucemiante.

4.1. Impacto

La escasa información bibliográfica disponible en torno a las propiedades funcionales del chilacayote reduce el interés de las personas que al no conocer las ventajas de este fruto, no lo consumen y lo descartan como un cultivo que merezca una mayor atención para producirlo en volúmenes con mayor impacto económico.

De comprobarse la propiedad hipoglucémica que se le atribuye a este fruto en los diferentes tipos o variedades, el impacto científico-tecnológico-económico se reflejara en un incentivo para la producción formal de su cultivo y aumentar su consumo más allá de un dulce o forraje para ganado.

5. Hipótesis

- La caracterización molecular por medio de la técnica de AFLP de *Cucurbita ficifolia* Bouché de regiones diferentes, podrá determinar si pertenecen a diferentes tipos o variedades.
- La capacidad hipoglucemiante del chilacayote depende del tipo o variedad de dicho fruto.

6. Objetivos

1. Caracterización molecular mediante AFLP de diferentes tipos de chilacayote procedentes de los estados de Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala, Puebla y Michoacán
2. Determinar la capacidad hipoglucemiante de estas variedades o tipos de chilacayote.

7. Metodología

7.1. Colecta del material biológico

Se recolectaron hojas frescas y en buen estado de plantas de chilacayote procedentes de Atitalaquia, Hidalgo; Acolman, Metepec e Ixtapaluca, Estado de México, en el Cuadro 4 se muestran algunas características geográficas de dichos estados.

Las hojas se lavaron con agua potable para eliminar tierra o insectos y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis.

Debido a condiciones climáticas, y a que esta especie crece de forma silvestre no se encontraron hojas con las características requeridas (frescas y en buen estado) de chilacayote procedente tanto del Edo. de Tlaxcala (Mpo. de Contla de Juan Cuamatzi), Michoacán (Mpo. Maravatío) y Puebla (Xochitlán de Vicente Suárez) por lo que para obtenerlas se utilizaron frutos maduros de estos lugares.

Cuadro 4. Características geográficas y climáticas de las localidades de procedencia de las muestras.

Lugar de procedencia	Latitud	Longitud	Altitud msm	Temperatura promedio °C	Precipitación pluvial mm
Atitalaquia, Hidalgo	20°02'59"	099°13'01"	2080	13.2 a 19.0 °C 16.50 °C	947 mm
Ixtapaluca, Estado de México	19°19'23"	098°45'38"	2900	-8 a 39 °C 15.1 °C	660 mm
Meteppec, Estado de México	19°15'04"	099°36'17"	2620	3.5 a 28 °C 14 °C	822 mm
Acolman, Estado de México	19°38'18"	098°54'35"	2260	-4 a 36 °C 15.4 °C	602.9 mm
Xochitlán de Vicente Suárez, Puebla	19°56'04"	097°37'13"	1620	15.3 a 23.1 °C 19.8 °C	3293 mm
Contla de Juan Cuamatzi, Tlaxcala	19°20'00"	098°10'04"	2320	1.1 a 27.6 °C 25.4 °C	165.8 mm
Maravatío, Michoacán	19°53'36"	100°26'34"	2020	14.1-29.9 °C	897.7 mm

<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/Datos.aspx>

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/>

<http://es.climate-data.org/>

Se determinó el peso y se midieron los diámetros ecuatorial y longitudinal de cada uno de los frutos. Las semillas se extrajeron de los frutos y se lavaron con agua destilada para eliminar el jugo del chilacayote, se dejaron secar a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y se pesaron. Se determinó cualitativamente la viabilidad de las semillas con 2, 3, 5-cloruro de trifeníl tatrazolio (CTT) (Ruiz, 2009). A 10 semillas de cada fruto se les retiró la testa (cubierta o envoltura de la semilla) y se colocaron en un vaso de precipitados de 25 mL por separado, se añadió una solución de CTT al 1 % de manera que las semillas quedaran cubiertas por dicha solución y se dejaron reposar durante 24 h.

En los embriones de las semillas, los tejidos vivos se diferencian por la actividad de enzimas deshidrogenasas (enzimas de la respiración). Al ser hidratadas las semillas la actividad de estas enzimas incrementa teniendo como resultado la liberación de iones hidrógeno, lo que reduce a la solución de tatrazolio (incolore) a formazán (rojo) (Figura 8). Por lo que las células vivas se tiñen de rojo mientras que las muertas permanecen sin colorear.

Una semilla viable indica que es capaz de germinar y producir una plántula normal, sin embargo, podría estar latente y en este caso tardarían en germinar (Ruiz, 2009).

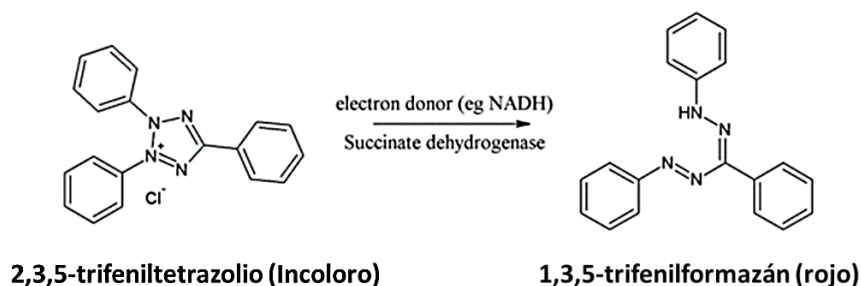


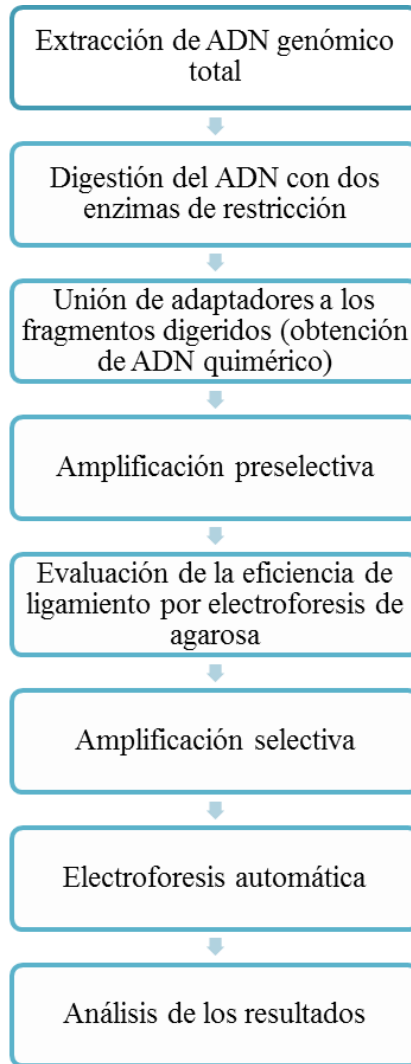
Figura 8. Reacción de 2, 3, 5-cloruro de trifenil tatrazolio

Para la obtención de la muestra biológica, se sembraron 10 semillas de cada fruto en vasos de precipitados de 100 mL por separado con algodón y papel filtro para dar soporte. Cuando brotaron las plántulas se trasplantaron a macetas con tierra, en el momento en el que las plántulas tuvieron entre 10 y 15 hojas, se cortaron y congelaron a -80 °C.

La germinación de las semillas de los frutos provenientes de Michoacán y Tlaxcala (de donde no se pudieron obtener las hojas frescas) se presentó a los dos días después de la siembra, en ese momento se trasplantaron a tierra (en maceta) y después de 3-5 días brotaron las hojas, las cuales se cortaron para posteriormente realizar la extracción de ADN. Aunque no se realizó de forma simultánea, las semillas de Puebla tardaron un tiempo similar en germinar.

7.2. Caracterización molecular

A continuación se ilustra en el diagrama de bloques el protocolo de AFLP.



7.3. Extracción de ADN

Se homogeneizó y se efectuó la lisis celular del tejido de hoja con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se trabajó con un total de 12 muestras procedentes de 5 estados de la República Cuadro 4.

7.4. Procedencia, toma y preparación de las muestras de chilacayote

La pureza y concentración del ADN depende de diferentes factores como la cantidad de muestra, que en este caso al tratarse de cantidades muy pequeñas (100 mg) no se recomienda pesar antes de triturar con el nitrógeno líquido ya que parte de la muestra se perdería quedándose en las paredes del mortero y tampoco después de triturarse porque el ADN se desnaturaliza al aumentar su temperatura. Otros factores que se deben considerar son las columnas proporcionadas en el kit de extracción o realizar una mala extracción, el estado de desarrollo de las hojas razón por la cual se colectaron las hojas más tiernas ya que este material contiene menos compuestos que pudieran interferir con los resultados.

Para la extracción de ADN se utilizó un conjunto de soluciones específicas (DNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen) en donde se emplean dos etapas principales de acuerdo al manual:

1) Unión del ADN a la matriz inorgánica y lavado

- A la solución de unión se le añade etanol para eliminar la capa hidratante del ADN, de esta forma se exponen sus grupos fosfato y facilita la adsorción de la molécula a la membrana (cargada positivamente)
- A la muestra se le añade la solución de unión, los lípidos y proteínas no son afines a la membrana por lo que son eliminados con ayuda de una solución de lavado y un ciclo de centrifugación

2) Recuperación de ADN de la matriz

- La membrana y el ADN se hidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación
- Se centrifuga para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones
- Se adiciona agua o solución amortiguadora, se centrifuga para re suspender y recuperar el ADN de la matriz.

7.4.1. Cuantificación de ADN

Una vez obtenido el ADN se cuantificó su concentración y pureza con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que está pre-configurado con espectro total de 220-750 nm y permite cuantificar concentraciones de ADN con gran exactitud y sin tener que diluir la muestra, proporcionando directamente la concentración en ng/ μ L (<http://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/es/content/nanodrop-1000>). La Ley de Lambert-Beer indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. El ADN absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm por lo que permite estimar su concentración mediante espectrofotometría (Cornejo Romero y cols., 2014).

Para poder llevar a cabo la técnica de AFLP se requiere una concentración de 250-400 ng/ μ . La pureza se mide mediante la relación de absorbancia 260nm/280nm, ésta debe ser de 1.8-2.0 para considerar que el ADN es puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas (Lehninger y cols., 1993).

Antes de aplicar la técnica de AFLP es necesario verificar si el ADN se encuentra íntegro, es decir que no esté degradado o fragmentado. Lo cual se realizó mediante un análisis por electroforesis.

7.4.2. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una de las metodologías más usadas en los trabajos con ácidos nucleicos, mediante esta técnica se separan los fragmentos de ADN en función de su tamaño y carga, esto debido a que el ADN es sometido a un campo eléctrico. La carga negativa del ADN hace que se mueva en dirección al ánodo y al moverse a través del gel de agarosa la fricción provoca que las moléculas de mayor tamaño migren lento, mientras que las de menor tamaño avanzan más rápido a lo largo del gel (Cornejo Romero y cols. 2014).

Se preparó un gel de agarosa estándar al 0.8 % (con esta concentración de agarosa se pueden separar tamaños de 500 pb - 15 kb), con 0.4 μ L de rojo Texas se tiñó el gel. Se utilizó buffer TAE (tris-acetato EDTA) al 1% tanto para preparar el gel como para correr la electroforesis, el buffer permite mantener un pH de 8. Para dar densidad y poder cargar las muestras de ADN en los pozos se adicionó buffer de carga (0.4 μ L de muestra con 1 μ L de gel de carga), se utilizó

0.5 µL de un marcador de peso molecular (o escalera) de 50 pb con la finalidad de tener una referencia de los tamaños del ADN en las muestras. El gel se corrió a 90 volts (aproximadamente 8 volts por cm del gel) durante 45 min y finalmente se visualizó en un fotodocumentador.

7.5. AFLP

La siguiente etapa fue aplicar los marcadores de AFLP, para realizar las reacciones de digestión, ligación, pre amplificación y amplificación selectiva se preparó un volumen total de reacción para un determinado número de muestras y después se agregó por separado el volumen exacto para cada reacción (Cuadros 5, 6, 7 y 9). Esto se realizó con la finalidad de reducir el error de pipeteo.

La metodología seguida para aplicar la técnica de AFLP es la indicada en el manual de Applied Biosystems AFLP Plant Mapping.

7.5.1. Digestión

Para llevar a cabo la digestión del ADN (cortarlo en fragmentos pequeños) se utilizaron tubos Eppendorf de 500 µL en donde se colocaron los siguientes reactivos (Cuadro 5) en el orden indicado.

Cuadro 5. Reacción de digestión de ADN con enzimas de restricción

	Compuesto	Volumen (µL)
1	Agua***	12.5-7.5
2	BSA buffer*	0.2
3	<i>Mse</i> 4 buffer**	2.0
4	<i>Eco</i> R1*	0.2
5	<i>Mse</i> I**	0.1
6	ADN	5-10
		Volumen final = 20 µL

*Invitrogen®

**BioLabs, Inc.

*** Milli Q estéril, pH = 7.8, GIBCO

Debido que la concentración de ADN obtenida en cada muestra fue diferente y la técnica de AFLP requiere de 250 ng/μL, se calculó la cantidad necesaria tanto de agua como de ADN para tener dicha concentración. Se realizó el cálculo para cada una de la muestras como se indica a continuación.

$$\frac{250 \text{ ng}/\mu\text{L}}{24.9 \text{ ng}} = 10 \mu\text{L de ADN}$$

$$17.5 \mu\text{L} - 10 \mu\text{L de ADN} = 7.5 \mu\text{L de agua}$$

250 ng/μL; concentración requerida de ADN
24.9 ng; concentración obtenida en la extracción de ADN (ejemplo de una muestra)
17.5 μL; volumen total de agua más ADN

Las muestras se incubaron a 37°C en un termomixer durante 3 h, posteriormente las enzimas se inactivaron incubando a 65°C por 15 min en baño María. Se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

7.5.2. Ligación

Para llevar a cabo la ligación del ADN con los adaptadores se utilizaron tubos Eppendorf de 500 μL en donde se colocaron los siguientes reactivos en el orden indicado (Cuadro 6).

Cuadro 6. Reacción de ligación de adaptadores al ADN digerido.

	Compuesto	Volumen (μL)
1	Agua***	1.0
2	5x ligasa buffer*	6.0
3	Adaptador <i>EcoR</i> 1**	1.0
4	Adaptador <i>Mse</i> 1**	1.0
5	T4 ligasa*	1.0
6	ADN digerido	20
		Volumen final = 30 μL

*Invitrogen®

**Applied Biosystems

***Milli Q estéril, pH = 7.8, GIBCO

El ADN se incubó a 22 ° C durante 17 h. Posteriormente, para verificar que el ADN fue digerido y ligado se realizó una electroforesis para resolver un gel de agarosa al 0.8 % en buffer TAE con 0.4 μL de rojo Texas (80 volts durante 20 min) de 5 μL de ADN de cada muestra con 2 μL de buffer de carga y 0.4 μL de escalera de 50 pb. El gel se visualizó en un fotodocumentador. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su siguiente análisis.

7.5.3. Preamplificación

Del producto resultante de la digestión-ligación, se realizó una dilución 1:5 del ADN con el Buffer AE del kit de extracción de ADN (Tris-HCl, EDTA pH=9) y en tubos para PCR de 500 µL se colocaron los siguientes reactivos con el ADN diluido (Cuadro 7). Los tubos se llevaron al termociclador y se programó como se muestra en el

Cuadro 8.

Cuadro 7. Reacción de preamplificación del ADN mediante PCR

Compuesto	Volumen (µL)
ADN diluido	4.0
Primer preselectivo AFLP*	1.0
Core Mix AFLP*	15
	Volumen final = 20 µL

*Applied Biosystems

Cuadro 8. Programa del termociclador para la reacción de preamplificación de ADN

	20 ciclos				
72 °C	94°C	56°C	72°C	60°C	4°C
2 min	20 s	30 s	2 min	30 min	∞

Para verificar la preamplificación se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % en buffer TAE y se corrió a 90 volts durante 40 min, de 8 µL de muestra con 1 µL de buffer de carga y 0.4 µL de escalera de 50 pb. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su siguiente análisis.

El objetivo de la amplificación preselectiva es discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman y amplificar solo aquellos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional.

7.5.4. Combinaciones de primers

Se probaron 32 combinaciones de primers. Se utilizaron cuatro primers de *EcoR1* marcados con fluoroforo azul (FAM), amarillo (NED) y verde (JOE), con ocho primers de *MseI* (Cuadro

9). Cada combinación se probó con 2 muestras de ADN de chilacayote ya que en esta etapa solo se buscaba saber cuáles combinaciones eran las que tenían un mejor resultado.

Cuadro 9. Combinaciones de primers

EcoR1-ACT (FAM)	EcoR1-ACA (FAM)	EcoR1-AAC (NED)	EcoR1-AAG (JOE)
<i>MseI</i> -CAA	<i>MseI</i> -CAA	<i>MseI</i> -CAA	<i>MseI</i> -CAA
<i>MseI</i> -CAC	<i>MseI</i> -CAC	<i>MseI</i> -CAC	<i>MseI</i> -CAC
<i>MseI</i> -CAG	<i>MseI</i> -CAG	<i>MseI</i> -CAG	<i>MseI</i> -CAG
<i>MseI</i> -CAT	<i>MseI</i> -CAT	<i>MseI</i> -CAT	<i>MseI</i> -CAT
<i>MseI</i> -CTA	<i>MseI</i> -CTA	<i>MseI</i> -CTA	<i>MseI</i> -CTA
<i>MseI</i> -CTC	<i>MseI</i> -CTC	<i>MseI</i> -CTC	<i>MseI</i> -CTC
<i>MseI</i> -CTG	<i>MseI</i> -CTG	<i>MseI</i> -CTG	<i>MseI</i> -CTG
<i>MseI</i> -CTT	<i>MseI</i> -CTT	<i>MseI</i> -CTT	<i>MseI</i> -CTT

7.5.5. Amplificación selectiva

Se adicionaron 198 µL de buffer AE al producto restante de la preamplificación, de esta dilución se tomó la muestra para realizar la amplificación selectiva utilizando tubos para PCR de 500 µL en donde se colocaron los siguientes reactivos (Cuadro10). Los tubos se colocaron en el termociclador y este se programó como se indica en el Cuadro 11. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su siguiente análisis.

Cuadro10. Reacción de amplificación selectiva mediante PCR

Compuesto	Volumen (µL)
ADN diluido de la preamplificación	3.0
Primer <i>MseI</i>(CXX)*	1.0
Primer <i>EcoR1</i> (AXX)**	1.0
Core Mix AFLP*	15
	Volumen final = 20 µL

* AppliedBiosystems

Cuadro 11. Programa del termociclador para la reacción de amplificación selectiva de ADN

	Ciclo			Número de ciclos
	94°C/20 s	66°C/30 s	72°C/2 min	
94°C/2 min	94°C/20 s	66°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	65°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	64°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	63°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	62°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	61°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	60°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	59°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	58°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	57°C/30 s	72°C/2 min	1
-	94°C/20 s	56°C/30 s	72°C/2 min	20
60°C/30 min	-	-	-	1
4°C[∞]	-	-	-	1

7.5.6. Secuenciación automática

Para verificar cuáles combinaciones de primers amplificaron de forma correcta se realizó una secuenciación o electroforesis automática. Se utilizó como marcador Gene Scan Liz que detecta bandas hasta de 500 pb, las cantidades de cada compuesto se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Preparación de las muestras para el secuenciador

Compuesto	Volumen (µL)
ADN	3.0
Formamida	10
Liz*	0.3
	Volumen final = 13.4

* Applied Biosystems

Antes de correr en el secuenciador las muestras, el ADN se desnaturalizó a 95°C durante 5 min y enseguida se colocó en hielo.

De las 32 combinaciones de primers se eligieron las que mejor amplificaron y se realizó una nueva amplificación selectiva para las 12 muestras de ADN y obtener un electroferograma por cada una de ellas.

7.6. Matriz de presencia/ausencia y matriz de similitud

Los electroferogramas obtenidos del secuenciador automático se analizaron visualmente con el programa Gene Marker, se identificaron para cada combinación las bandas presentes en cada individuo (la presencia de bandas se marcó con 1 y la ausencia con 0) para obtener una matriz binaria o de presencia/ausencia y cuantificar el número de bandas polimórficas para cada combinación. Estos datos se exportaron al programa Free Tree (Cerón González y cols., 2010) con el que primero se obtuvo una matriz de similitud, posteriormente para estimar los coeficientes de similitud se corrió un bootstrap de 1000 repeticiones mediante el índice de Nei y Li referencias (Castañón-Najera y cols., 2011).

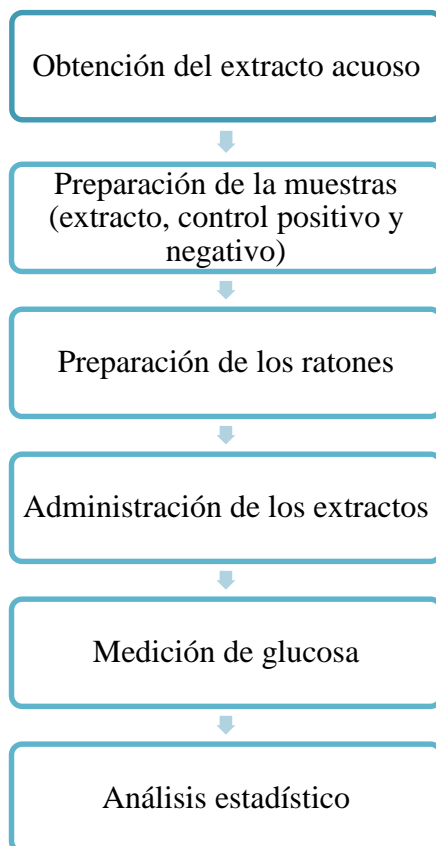
7.6.1. Obtención de dendrograma

Posteriormente se llevó a cabo el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean/ método no ponderado de grupos de pares con media aritmética), que es el método de reconstrucción filogenética más sencillo y finalmente con el programa TreeView (Cerón González y cols., 2010) se obtuvo un dendrograma, esto es, la representación gráfica de la relación genética (García, 2003).

7.7. Determinación de la capacidad hipoglucemiante

En esta etapa se utilizó el fruto (libre de semillas) de los frutos de chilacayote provenientes de las diferentes regiones para preparar los extractos y poder administrarlo a los ratones.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:



7.8. Obtención del extracto acuoso

Se lavaron los frutos con agua corriente y se enjuagaron con agua potable, se eliminó el exocarpo y las semillas. El mesocarpo se cortó en rebanadas muy delgadas y los trozos se colocaron en charolas para deshidratar en campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 24 h.

El material seco se trituroó en un molino eléctrico para obtener un polvo fino y se pesó. El polvo se colocó en un matraz y se agregó 1 L de agua destilada por cada 100 g de polvo. Se mezcló y se tapó con una gasa para dejar reposar durante 24 h en campana de flujo laminar.

Después de las 24 h se filtró al vacío utilizando papel filtro de 70 mm de diámetro y se colocó en refractarios (solo cubriendo el fondo de estos) dejando secar en campana de flujo laminar a temperatura ambiente por 48 h.

Se retiró el extracto de los refractarios y se distribuyó en frascos de color ámbar los cuales se almacenaron a temperatura ambiente.

7.8.1. Preparación de las dosis de las diferentes muestras

Para administrar los extractos a los ratones fue necesario realizar diluciones con agua estéril de la siguiente manera.

Se pesaron 500 mg de extracto por cada kg de peso corporal de los ratones y se disolvieron con 4 mL de H₂O/kg peso corporal. Se realizó el cálculo para cada ratón como se muestra a continuación.

$$\begin{array}{l} 500 \text{ mg extracto} \rightarrow 1000 \text{ g peso corporal} \\ x \quad \quad \quad \rightarrow 36 \text{ g peso corporal} \quad \quad \quad x = 18 \text{ mg extracto} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 4 \text{ mL H}_2\text{O} \rightarrow 1000 \text{ g peso corporal} \\ x \quad \quad \rightarrow 36 \text{ g peso corporal} \quad \quad \quad x = 0.144 \text{ mL H}_2\text{O} \end{array}$$

Se utilizó glibenclamida como control positivo y para administrar este medicamento se pesaron 10 tabletas de una concentración de 5 mg de principio activo y se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino y homogéneo. Como la dosis requerida fue de 10 mg de glibenclamida/ kg peso corporal, se realizaron los siguientes cálculos y se disolvieron en la cantidad de agua ya calculada para cada ratón:

$$\begin{array}{l} 10 \text{ mg glibenclamida} \rightarrow 1000 \text{ g peso corporal} \\ x \quad \quad \quad \rightarrow 36 \text{ g peso corporal} \quad \quad \quad x = 0.36 \text{ mg glibenclamida} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} 1.206 \text{ g (peso de 10 tabletas)} \rightarrow 50 \text{ mg glibenclamida} \\ x \quad \quad \quad \rightarrow 0.36 \text{ g peso corporal} \quad \quad \quad x = 0.0087 \text{ g (tabletas trituradas)} \end{array}$$

7.9. Preparación de los ratones

Como control negativo se utilizó solución salina isotónica en una dosis de 4 mL de SSI/kg peso corporal.

Se utilizaron 24 ratones machos sanos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 34-39 g nacidos en el Banco Genético de la UPEAL-Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco con número de verificación BOO.02.03.02 .01.281/07 de la SAGARPA.

7.10. Administración de los extractos

Se formaron 8 grupos de tres ratones, se pesaron, se marcaron y se dejaron en un ayuno de 12 h. A los grupos 1-6 se les administró un extracto diferente, al grupo siete glibenclamida y al grupo ocho SSI. La administración tanto de los extractos como de los controles se realizó vía intraperitoneal, en el Cuadro13 se muestran los grupos formados y la cantidad de glibenclamida, extracto, agua o solución salina que le fue administrada a cada ratón.

Cuadro13. Cantidad administrada de glibenclamida, extracto o solución salina con respecto al peso de cada ratón.

UE	repeticiones	peso de cada ratón (g)	extracto o solución administrada (mg)		agua (mL)
1	1	34	17	Acolman	0.136
	2	38	19		0.152
	3	35	17.5		0.14
2	1	39	19.5	Hidalgo	0.156
	2	32	16		0.128
	3	37	18.5		0.148
3	4	38	19	Ixtapaluca	0.152
	5	36	18		0.144
	6	36	18		0.144
4	1	35	17.5	Metepec	0.14
	2	36	18		0.144
	3	35	17.5		0.14
5	1	34	17	Michoacán	0.136
	2	36	18		0.144
	3	38	19		0.152

6	1	39	19.5	Tlaxcala	0.156
	2	36	18		0.144
	3	34	17		0.136
7	1	36	8.68	Glibenclamida	0.144
	2	37	8.92		0.148
	3	36	8.68		0.144
8	1	34	0.136	SSI	
	2	36	0.144		
	3	36	0.144		

UE=unidad experimental (grupo de tres ratones)

7.11. Medición de glucosa

Con el glucómetro ACCU-CHEK® Performa Test se midió la glucosa a los ratones al tiempo cero (antes de administrar los extractos y las soluciones control), posteriormente se tomaron las muestras a los 120, 240 y 360 min. Estas mediciones se realizaron tomando las muestras de sangre por la vena caudal (cola del ratón).

7.12. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se construyeron dos gráficas, en ambas se utilizaron los promedios de las lecturas de glucosa. En este caso, al estar trabajando con ratones no se puede tener un mismo valor en el nivel de glucosa en todos los ratones, por lo que para una de las gráficas se realizó la diferencia de las lecturas con respecto al tiempo cero y de esta forma obtener una en donde se aprecie de forma más clara la disminución de los niveles de glucosa.

Con el software NCSS se realizó una ANOVA con α 0.05 y una prueba complementaria de Toker-Kramer para determinar si existe una diferencia significativa entre las muestras probadas con respecto a los controles, SSI y glibenclamida.

8. Resultados y discusión

8.1. Caracterización molecular

8.1.1. Características de los frutos empleados en el presente estudio

En el Cuadro 14 se presentan los valores de las dimensiones, peso de los frutos enteros y de sus semillas así como la prueba de viabilidad de estas últimas.

El aspecto externo de los frutos se muestra en la Figura 9, como se puede apreciar, el color de fondo de los chilacayotes procedentes de Acolman, Ixtapaluca, Tlaxcala y Metepec es verde y exhiben una ornamentación moteada, aunque en este último el fruto presentó unas líneas en forma de estrella; mientras que los provenientes de Puebla y Michoacán presentan un color uniforme de tono crema-verdoso; en el caso particular de los frutos de Hidalgo se encontraron los dos aspectos de color y ornamentación mencionados. Todos los frutos presentaron forma ovalada, de pulpa blanca y semillas negras, excepto los frutos provenientes de Puebla que contenía semillas blancas. Como información adicional se registraron datos de algunos frutos provenientes de los diferentes estados sin tener un dato certero del estado de madurez.



Figura 9. Fotografías de los frutos provenientes de los Estados de Hidalgo (Hb y Hv se utilizaron dos diferentes), Michoacán (Mi), Tlaxcala (Tx), Puebla (Pb) y Edo de Méx (Acolman Ac, Ixtapaluca IX y Metepec Me).

Cuadro 14. Características de frutos de chilacayote provenientes de diferentes regiones

Origen	Perímetro ecuatorial (cm)	Perímetro longitudinal (cm)	Peso total (g)	Peso de semillas (g)	Prueba de viabilidad
Contla Juan Cuamatzi, Tlaxcala	55.5	67.2	3134.3	61.75	Positiva
Maravatío, Michoacán	47.5	55	2056.8	22.14	Positiva
Atitalaquia, Hidalgo (verde)	55	62	3023.1	48.96	Positiva
Atitalaquia, Hidalgo (blanco)	59	66	3048.4	77	Positiva
Ixtapaluca, Edo de Méx	55.2	63	3178	110	Positiva
Acolman, Edo de Méx	54	61	2673	75.05	Negativa*
Metepec, Edo de Méx	54	58	3200	37.59	Positiva
Xochitlan de Vicente Suarez, Puebla	67.5	80	5341.5	65.87	Positiva

*Aunque la prueba de viabilidad resultó negativa, en este caso ya se tenían las muestras biológicas

8.2. Extracción y cuantificación de ADN

El ADN obtenido de todas las muestras de chilacayote presentó una pureza y concentración adecuadas para continuar con la técnica de AFLP (Cuadro15).

Cuadro15. Concentración y pureza de ADN extraído de 12 muestras de chilacayote.

Estado	Muestra	Pureza 260/280	Concentración ng/µl
HIDALGO	HbA	1.93	24.9
	HbB	1.82	32.9
	HbE	1.83	29.1
	Hv	1.92	56.3
IXTAPALUCA	Ix2	1.83	18.5
	Ix3	1.84	57.4
	Ix4	1.84	52.4
METEPEC	Me	1.88	54.1
ACOLMAN	Ac	1.85	72.9
PUEBLA	Cz	1.95	40.3
TLAXCALA	Tx	1.84	25.0
MICHOACAN	Mi	1.78	43.9

8.2.1. Electroforesis en gel de agarosas

Para poder aplicar la técnica de AFLP además de requerir una concentración y pureza de ADN específica, es muy importante verificar que se encuentre íntegro, es decir que no se encuentre fragmentado. En la Figura 10, se observa que todas las muestras de ADN están en la parte superior del gel, incluso antes de la escalera (marcador de peso molecular), esto indica que el ADN estaba completamente íntegro.

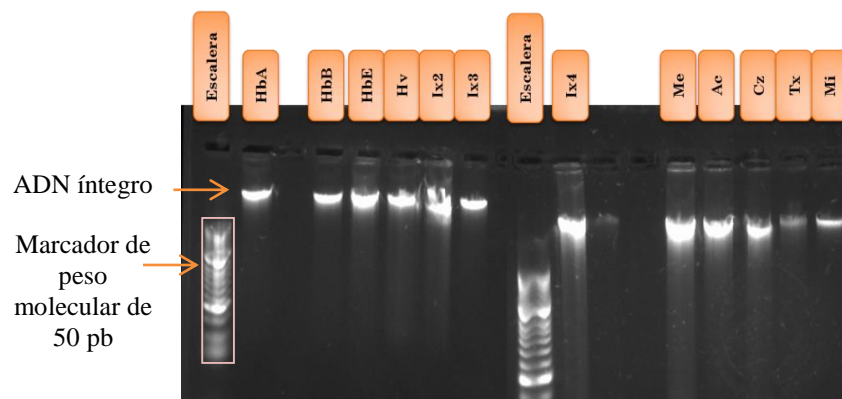


Figura 10. Gel de electroforesis en donde se verifica la integridad del ADN

8.3. AFLP

8.3.1. Digestión y ligación

La verificación electroforética de la adecuada digestión se puede observar en la Figura 11. Todas las muestras presentaron un barrido de la misma longitud que la escalera (ADN de referencia), esto indica que las enzimas cortaron todo el ADN y que los adaptadores se ligaron correctamente teniendo como resultado diferentes fragmentos de ADN.

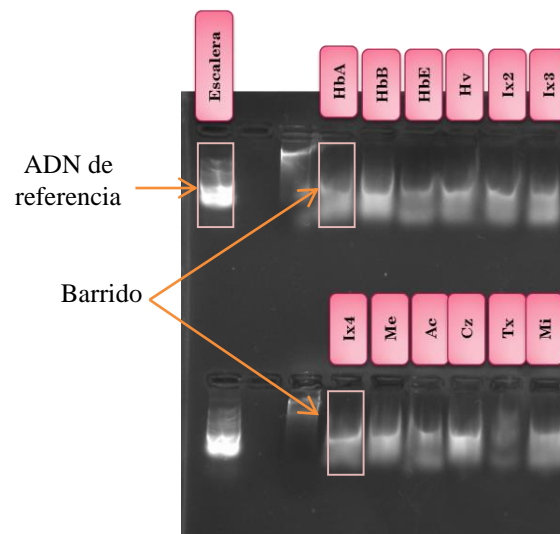


Figura 11. Gel de electroforesis en donde se verifica la digestión/ligación del ADN

8.3.2. Pre amplificación

En la preamplificación de ADN con la unión de cebadores se reduce el número de fragmentos obtenidos de la digestión (Vos y col., 1995). Esto no indica que disminuye el tamaño de los fragmentos, lo cual se aprecia claramente en el barrido observado del gel de electroforesis en la Figura 12, lo que a su vez indica que todas las muestras de ADN amplificaron correctamente.

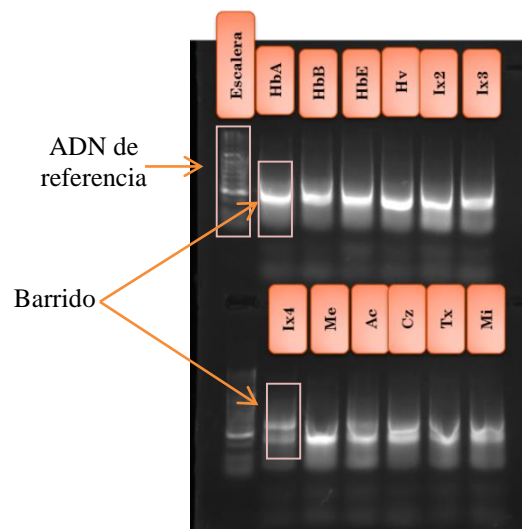


Figura 12. Gel de electroforesis en donde se verifica la preamplificación de ADN

8.3.3. Combinación de primers

De las 32 combinaciones de primers que se probaron, 9 de ellas amplificaron un mayor número de fragmentos (Cuadro 16). Con estas combinaciones se corrieron las 12 muestras de chilacayote con los que se trabajó.

Cuadro 16. Combinaciones de primers que amplificaron un mayor número de fragmentos de ADN en las muestras

EcoR1-ACA (FAM)	Mse1-CAA
	Mse1-CAG
	Mse1-CAT
	Mse1-CTC
	Mse1-CTT
EcoR1-AAC (NED)	Mse1-CTC
EcoR1-AAG (JOE)	Mse1-CAA
	Mse1-CAC
	Mse1-CTA

8.3.4. Matriz de presencia ausencia

Por cada combinación de primers se obtuvo una matriz de presencia/ausencia con diferentes números de bandas monomórficas y polimórficas. En el Cuadro 17 se indican las 9 combinaciones realizadas y el número de bandas obtenidas en cada matriz. Se puede observar que hay un mayor número de bandas monomórficas, esto indica que hay poca variación genética.

Cuadro 17. Número de bandas totales monomórficas y polimórficas obtenidas de cada combinación de primers

Combinaciones <i>EcoR1-Mse1</i>	No. Bandas totales	No. Bandas monomórficas	No. Bandas polimórficas
ACA-CAA	17	17	0
ACA-CAG	13	9	4
ACA-CAT	26	14	12
ACA-CTC	19	14	5
ACA-CTT	24	21	3
AAC-CTC	19	16	3
AAG-CAA	23	17	6
AAG-CAC	27	15	12
AAG-CTA	27	24	3
Total	195	147	48

8.3.5. Matriz binaria

Con el programa Free Tree se obtuvo una matriz de similitud (Cuadro 18) en donde se puede observar que el grado de similitud es alto ya que se encuentran en el rango de 0.8941–0.9858 siendo estos valores cercanos a uno. En general, en una matriz de similitud mientras más cercanos estén los valores a uno, indica mayor similitud entre las muestras. Este alto grado de similitud coincide con el estudio realizado por (Cerón González y cols., 2010).

Cuadro 18. Matriz de similitud correspondiente a las muestras de chilacayote

	Ix2	Ix3	Ix4	HbA	HbB	HbE	Mi	Cz	Me	Hv	AC	Tx
Ix2		0.98584	0.97753	0.95954	0.95455	0.95954	0.95627	0.91643	0.96591	0.96919	0.96919	0.9683
Ix3	0.98584		0.97465	0.95652	0.95726	0.96232	0.95322	0.90751	0.96866	0.97753	0.97753	0.9711
Ix4	0.97753	0.97465		0.94253	0.96045	0.94828	0.93913	0.91117	0.96045	0.97493	0.97493	0.95702
HbA	0.95954	0.95652	0.94253		0.98256	0.98225	0.97313	0.91445	0.9593	0.95129	0.94556	0.96165
HbB	0.95455	0.95726	0.96045	0.98256		0.98256	0.96188	0.91594	0.96	0.96901	0.96338	0.96232
HbE	0.95954	0.96232	0.94828	0.98225	0.98256		0.97313	0.92035	0.9593	0.95702	0.95129	0.96755
Mi	0.95627	0.95322	0.93913	0.97313	0.96188	0.97313		0.91667	0.95015	0.94798	0.94798	0.95833
Cz	0.91643	0.90751	0.91117	0.91445	0.91594	0.92035	0.91667		0.89855	0.90286	0.90286	0.89412
Me	0.96591	0.96866	0.96045	0.9593	0.96	0.9593	0.95015	0.89855		0.98028	0.98028	0.97971
Hv	0.96919	0.97753	0.97493	0.95129	0.96901	0.95702	0.94798	0.90286	0.98028		0.99444	0.96571
AC	0.96919	0.97753	0.97493	0.94556	0.96338	0.95129	0.94798	0.90286	0.98028	0.99444		0.96571
Tx	0.9683	0.9711	0.95702	0.96165	0.96232	0.96755	0.95833	0.89412	0.97971	0.96571	0.96571	

8.3.6. Dendrograma

Con el análisis UPGMA se obtuvo el dendrograma (Figura 13) en donde se observa que independientemente de las características morfológicas que presentaron las muestras (color del pericarpio y de las semillas), éstas se encuentran agrupadas en dos clados principales que corresponden especialmente con la distribución geográfica de las colectas. Uno de los grupos está conformado por las muestras de Hidalgo y Michoacán y el otro grupo por las muestras del Edo de México y Tlaxcala. Sin embargo, la información obtenida con este estudio no es suficiente para determinar si las muestras de chilacayote analizadas son diferentes tipos o variedades de la misma especie, ya que no se cuenta con datos de descendencia y heterocigosidad de esta.

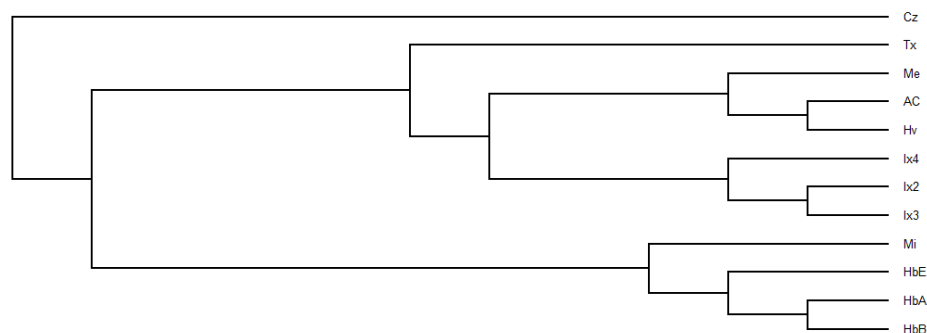


Figura 13. Dendrograma obtenido al realizar un bootstrap de 1000 repeticiones con el índice de Nei y Li con UPGMA.

8.4. Resultados de la actividad hipoglucemiante

8.4.1. Mediciones de glucosa

Después de medir la glucosa con el glucómetro ACCU-CHEK® Performa al tiempo cero, dos, cuatro y seis horas se construyó una gráfica (Figura 13). En ésta se puede observar que todos los extractos que se probaron disminuyen la glucosa, siendo estos valores menores a los de la SSI y a la glibenclamida por lo que podría decirse que tienen un mejor efecto que esta última. Esta disminución de glucosa se puede observar desde la hora cuatro.

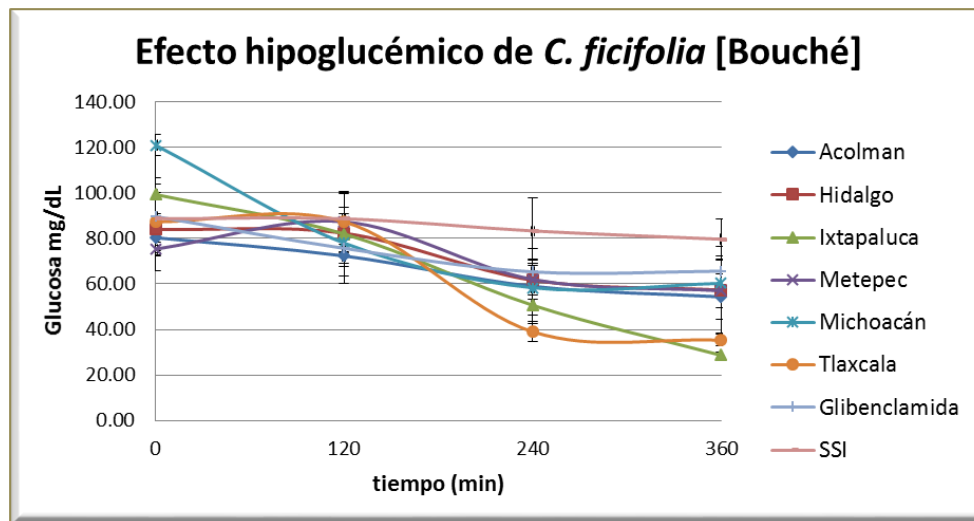


Figura 14. Efecto hipoglucémico de *C. ficifolia* Bouché comparando con dos controles; glibenclamida y SSI (solución salina isotónica)

Sin embargo, ya que en el tiempo cero las mediciones de la glucosa fueron diferentes se realizó una resta del tiempo 4 (360 min) a cada uno de los demás tiempos y de esta forma se obtuvieron las diferencias, teniendo en el tiempo cero el mismo valor para todas las muestras. A partir de estos datos se obtuvo la siguiente gráfica (Figura 15).

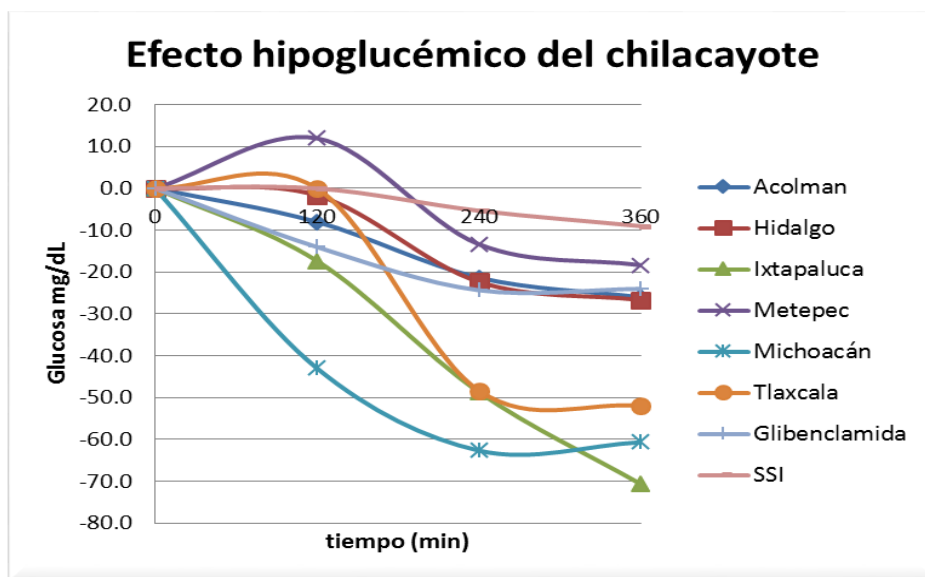


Figura 15. Efecto hipoglucémico del chilacayote.

En la gráfica anterior los datos que se muestran son negativos debido a las diferencias realizadas, en ella se muestra el decremento de glucosa por cada uno de los diferentes tratamientos y los controles. Se puede observar que los extractos de Tlaxcala, Michoacán e Ixtapaluca son los que tienen un mejor efecto hipoglucémico, incluso mejor que la glibenclamida, los extractos de Hidalgo y Acolman tiene un efecto similar al de la glibenclamida y el extracto de Metepec aunque disminuyó la glucosa en comparación con el control de la SSI fue el que menos disminuyó los niveles de glucosa. En trabajos anteriores solo se trabajaba con frutos procedentes de un solo lugar (Roman-Ramos y cols., 1995; Acosta-Patiño y cols., 2001) por lo que no se hacía una comparación como es el caso. Sin embargo se corrobora que los frutos provenientes del Edo. de Puebla y Edo. de México, tienen un efecto hipoglucémico mayor a la Glibenclamida.

8.4.2. Análisis estadístico

Para conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos se realizó una ANOVA y una prueba complementaria de Tukey-Kramer con $\alpha = 0.05$ en el que se puede observar que solamente los extractos de Ixtapaluca, Michoacán y Tlaxcala presentan diferencias significativa con la SSI, siendo el extracto de Ixtapaluca el único en presentar diferencia con la Glibenclamida. El resto de los extractos no presentan diferencias significativas (Cuadro 19).

Cuadro 29. Resultados de Tukey-Kramer

Prueba de Tukey-Kramer $\alpha=0.5$	
Grupo	Diferencia significativa
Ixtapaluca	Hidalgo, Acolman, Glibenclamida, Metepec, SSI
Michoacán	Metepec, SSI
Tlaxcala	SSI
Hidalgo	Ixtapaluca
Acolman	Ixtapaluca
Glibenclamida	Ixtapaluca
Metepec	Ixtapaluca, Michoacán
SSI	Ixtapaluca, Michoacán, Tlaxcala
*Este informe proporciona pruebas de comparación múltiple para las diferencias entre medias	

9. Conclusiones

La caracterización molecular de *C. ficifolia* (chilacayote) mediante marcadores moleculares AFLP, reveló que los frutos procedentes de diferentes regiones son muy semejantes genéticamente; a pesar de que fenotípicamente presentan diferencias tanto en el color de su corteza como en el color de sus semillas. Estos resultados sugieren que hay un importante efecto de las condiciones climáticas de los lugares de procedencia.

El único extracto que presentó diferencias significativas en sus propiedades hipoglucémicas con respecto a ambos controles (SSI y Glibenclamida) fue el de la muestra procedente de Ixtapaluca, Edo de México. Los extractos de los frutos provenientes de Michoacán y Tlaxcala solo presentaron diferencias significativas con la SSI y el resto de los extractos aunque no presentaron diferencias significativas, todas disminuyeron los niveles de glucosa en los ratones.

10. Perspectivas

Es conveniente realizar una caracterización molecular con un mayor número de muestras provenientes de otras regiones, incluyendo las ya estudiadas para corroborar los resultados obtenidos y conocer si se mantienen los porcentajes de similitud.

Se sugiere sembrar semillas de los frutos de las diferentes regiones bajo las mismas condiciones para poder determinar de manera precisa cómo es que influyen las condiciones climáticas así como las del suelo. Por lo que también se propone realizar un estudio de suelo, ya que las características de cada fruto podrían estar dadas por ésta y otras variables abióticas.

En cuanto a la capacidad hipoglucemiante del fruto, se propone realizar una caracterización química para poder conocer cuál o cuáles compuestos y en que concentraciones son los que le dan esta propiedad a las muestras de chilacayote de las diferentes regiones.

También es necesario determinar si la capacidad hipoglucemiante está en función del estado de desarrollo del fruto, para lo cual se sugiere determinar esta capacidad en diferentes estadíos.

11. Bibliografía y referencias

- Acosta-Patiño, J.L. et al., 2001. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, pp.99–101.
- Alarcon-Aguilar, F.J. et al., 2002. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouche (Cucurbitaceae) in different experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, pp.185–189. Available at: www.elsevier.com/locate/jethpharm.
- Andrade-Cetto, A. & Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Ethno pharmacology*, 99, pp.325–348.
- Azofeifa-Delgado, Á., 2006. Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), pp.221–241.
- Beas, C., Ortuño, D. & Armendáriz, J., 2009. *Biología Molecular fundamentos y aplicaciones* 1st ed., México, D.F.: McGrawHill.
- Becerra V, V. & Paredes C, M., 2000. USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA. *Agricultura Técnica*, 60(3), pp.1–14.
- Bohinski, R., 1991. *Bioquímica*, México: Pearson Education.
- Castañón-Najera, G. et al., 2011. Aplicacion de Marcadores AFLP para explorar heterosis en *Capsicum* spp. *PYTON*, 80, pp.53–58.
- Cerón González, L. et al., 2010. Diversidad genética en cuatro especies mexicanas de calabaza (*Cucurbita* spp.). *Rev. Fitotec. Mex.*, 33(3), pp.189–196.
- Cirilo Aguilar, B.G. et al., 2011. Uso de la herbolaria en el cuidado de la salud. *RESPYN*, 12(2), p.6.
- CONABIO, 1990. *Fig leaf squash Cucurbita ficifolia*,

- Cornejo Romero, A. et al., 2014. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, México, D.F.
- Díaz-Flores, M. et al., 2012. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(1), pp.101–108. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.036>.
- Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X., 2007. *Ecología molecular* 1st ed., México: Instituto de ecología, UNAM.
- FAO, 1992. *Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*,
- Farinango Cervantes, D.M., 2007. "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN DE AJIES (*Capsicum spp*) y CALABAZAS (*Cucurbita spp.*) DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (INIAP), ECUADOR.
- Fortis-Barrera, Á. et al., 2013. *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) and D-chiro-inositol modulate the redox state and inflammation in 3T3-L1 adipocytes. *Pharmacy and pharmacology*, 65, pp.1563–1576.
- García, S.A., 2003. *Universidad de Burgos Aplicación de la electroforesis capilar para el análisis y seguimiento del grado de maduración de quesos de oveja y mezcla de la provincia de Burgos*,
- Hayes Dorado, J.P., 2008. Diabetes mellitus tipo 1. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 47(2), pp.90–96. Available at: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1024-06752008000200006&script=sci_arttext&tlng=pt.
- Huerta, C., 1997. La herbolaria: mito o realidad. *CONABIO. Biodiversitas*, 12, pp.1–7.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. & Cox, M.M., 1993. *Principios de bioquímica* 2nd ed., España: OMEGA.

- Lira, R. et al., 1998. Diversidad e importancia de la familia Cucurbitaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 42.
- Lira, R., 1995. Estudios Taxonómicos y Ecogeográficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de Importancia Económica.
- Marzocca, A., 1985. *Nociones básicas de taxonomía vegetal* 1st ed., San José, Costa Rica: Serie de libros y materiales educativos /IICA: N. 62.
- Molina Moreno, J.C. & Córdova Téllez, L., 2006. *Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura* 1st ed., México: SAGARPA.
- Nabors Murray, W., 2006. *Introducción a la botánica*, España.
- Nee, M., 1990. The Domestication of Cucurbita (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 44(3), pp.56–68.
- Prohens, J. & Nuez, F., 2008. *Handbook of plant breeding, Vegetable I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae* J. Prohens & F. Nuez, eds., España: Springer Science.
- Rodríguez Aranguren, S., 2000. *Definición de Especie*, México.
- Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J.L. & Alarcon-Aguilar, F.J., 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *Ethno pharmacology*, 48, pp.25–32.
- Ruiz, M. de los Á., 2009. El análisis de tetrazolio en el control de calidad de semillas. , 77, p.20.
- Sambrook, J. & Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning a laboratory manual* 3rd ed., United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarukhán, J. et al., 2009. Capital Natural de Mexico. Síntesis: Conocimineto actual y perspectivas de sustentabilidad. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México*.
- Schlötterer, C., 2004. *The evolution of molecular markers*, Nature.

- Simpson, J. et al., 1999. AFLP analysis of plant genomic DNA. , pp.85–97.
- Swanson, T.A., Kim, Sandra I. & Glucksman, M.J., 2010. *Biochemistry, Molecular Biology, and Genetics* 5th ed. C. W. Mitchell, ed., Hong Kong: Lippincott Williams & Wilkins.
- Torres-Tejeda, Alfredo G. y Eugenia-Baca, B. (Centro de I.M.I. de C.U.A. de P., 1995. Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos, No. 23. Vol. 3, 1995, pp. 16-21.*, pp.16–21.
- Vos, P. et al., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), pp.4407–4414.
- Xia, T. & Wang, Q., 2006. Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Fitoterapia*, 77, pp.530–533. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.036>.

11.1. Páginas WEB

- http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap2_3.htm#30
(Consulta: 02 diciembre 2013)
- http://www.fao.org/docrep/t0646e/T0646E0a.htm#Cucurbita_ficifolia (Consulta: 10 enero 2014)
- <http://www.keygene.com> (Consulta: 02 diciembre 2013)
- <http://www.fondodeculturaEconomica.com/obras/suma/r3/buscar.asp?word2=chilacayote%20/%20%22Cidra%20cayote%22> (Consulta: 02 diciembre 2013)
- <http://www.qiagen.com/es/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/dneasy-plant-mini-kit>(Consulta: 02 diciembre 2013)
- <http://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=hhZ0SDbSdegC&oi=fnd&pg=PA7&dq=taxonomia+y+concepto+de+especie+&ots=jWd78skSGb&sig=PtxEPzS4dOq-jchNIMtqmr3hucY#v=onepage&q=taxonomia%20y%20concepto%20de%20especie&f=false> (Consulta: 02 diciembre 2013)

<http://www.bgbm.org/iapt/nomenclature/code/saintlouis/0001ICSLContents.htm> (Consulta : 17 diciembre 2013)

https://www.idf.org/sites/default/files/attachments/PB_GlobalHealth_ES.pdf (Consulta: 24 febrero 2014)

<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/> (Consulta: 04 marzo 2014)

<http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro11/cuadro1.htm>(Consulta: 06 marzo 2014)

http://www.ecured.cu/index.php/Clasificaci%C3%B3n_biol%C3%B3gica#Historia (Consulta: 11 marzo 2014)

<http://sct.uab.cat/genomica-bioinformatica/es/content/nanodrop-1000> (Consulta: 15 marzo 2014)

https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040959.pdf(Consulta: 16 marzo 2014)

<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/Datos.aspx> (Consulta: 20 marzo 2015)

<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/> (Consulta: 20 marzo 2015)

<http://es.climate-data.org/> (Consulta: 20 marzo 2015)

<http://www.fondodeculturaeconomica.com> (Consulta: 25 mayo 2015)

<http://www.fondodeculturaeconomica.com> (Consulta: 25 mayo 2015)