

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



**Patrón molecular de la variación de color de sépalos en hortensias
(*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) bajo tratamiento con diferentes
niveles de pH**

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JULIO YESUA ANAYA COVARRUBIAS

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, Julio 2014

El presente trabajo se realice en el laboratorio de Marcadores Moleculares perteneciente al Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI) del Departamento de Producción Agrícola, División de Ciencias Agropecuarias y fue financiado a través de un proyecto con financiamiento propio P3E.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Julio Anaya y Liliana Covarrubias, por todo el apoyo incondicional, amor y consejos, que me brindaron durante esta etapa de mi vida y que sé que siempre voy a contar con ellos. A mis hermanos Abraham, Paola, Luis y Sarahi por su compañía y apoyo.

A mi directora de tesis y maestra la Dra. Martha Isabel Torres Mórán, por brindar parte de su tiempo a enseñarme, orientarme, su dedicación, sus aportaciones teóricas, su paciencia y quien es un ejemplo a seguir.

A mis compañeros de laboratorio que me recibieron de una excelente manera y prestaron su tiempo para enseñarme lo poco o lo mucho que saben.

A mis sinodales por sus finas atenciones, sus aportaciones, recomendaciones y su disponibilidad.

Agradezco a la Universidad de Guadalajara y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias por ser mi segundo hogar y todos sus servicios ofrecidos.

También a todos los profesores, maestros, doctores, compañeros de clase y amigos de la universidad, que durante estos cinco años fueron parte de grandes experiencias vividas, formación académica y profesional.

Y por último a Dios por vida, fuerza, valor, sabiduría y que me ha brindado todas las herramientas, para experimentar en el campo del conocimiento y alcanzar mis metas y terminar esta etapa de mi vida.

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1	Ruta biosintética de los flavonoides. Enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides.	Pag 11
Figura 2	Color de los sépalos de hortensias y pH vacuolar. Estructura de las antocianinas y copigmentos.	Pag 13
Figura 3	Color de las flores, de acuerdo a las antocianinas presentes.	Pag 15
Figura 4	Estructuras de antocianidina y vías biosintéticas del flavonoide correspondiente al color.	Pag 17
Figura 5	Gráfica representativa del matiz en la medición de color.	Pag 20
Figura 6	Gráfica representativa del saturación o chroma en la medición de color.	Pag 21
Figura 7	Gráfica representativa de la luminosidad en la medición de color.	Pag 21
Figura 8	Gel de agarosa al 1% con ADN genómico de las muestras de hortensia.	Pag 28
Figura 9	Patrones de amplificación del iniciador 814 de ISSR en muestras de hortensia.	Pag 28
Figura 10	Dendrograma producido por el análisis de agrupamiento en muestras de hortensia que fueron cultivadas en diferentes sustratos.	Pag 30
Figura 11	Dendrograma obtenido con datos de ISSR de hortensias cultivadas en el sustrato RH.	Pag 31
Figura 12	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 1 de hortensias cultivadas en el sustrato RH.	Pag 32
Figura 13	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 2 de hortensias cultivadas en el sustrato RH.	Pag 32
Figura 14	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 3 de hortensias cultivadas en el sustrato RH.	Pag 33
Figura 15	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 4 de hortensias cultivadas en el sustrato RH.	Pag 33
Figura 16	Dendrograma obtenido con datos de ISSR de hortensias cultivadas en el sustrato PP.	Pag 34
Figura 17	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 1 de hortensias cultivadas en el sustrato PP.	Pag 35
Figura 18	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 2 de hortensias cultivadas en el sustrato PP.	Pag 35
Figura 19	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 2 de hortensias cultivadas en el sustrato PP.	Pag 36
Figura 20	Rango fenotípico de color producido por los Grupos 4 y 5 (PPIII-15) de hortensias cultivadas en el sustrato PP.	Pag 36
Figura 21	Dendrograma obtenido con datos de ISSR de hortensias	Pag 37

	cultivadas en el sustrato TH.	
Figura 22	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 1 de hortensias cultivadas en el sustrato TH	Pag 38
Figura 23	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 3 de hortensias cultivadas en el sustrato TH	Pag 38
Figura 24	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 5 de hortensias cultivadas en el sustrato TH	Pag 39
Figura 25	Rango fenotípico de color producido por el Grupo 2 (THI-1 y THI-8), 4 (THI-13), 6 (THII-2) y 7 (THI-7) de hortensias cultivadas en el sustrato TH	Pag 39
Figura 26	Análisis con el programa STRUCTURE, donde se muestran cuatro simulaciones ($K = 4$ a $K = 7$) para los tres sustratos (RH, TH y PP). En cada simulación (K) se presentan los grupos simulados con diferente color.	Pag 40
Figura 27	Salida del programa STRUCTURE, que muestra todas las simulaciones incluidas	Pag 41
Figura 28	Gráfica producida con el programa Structure Harvester, donde se muestra el ajuste (Delta K) en la simulación que corresponde a cinco grupos genéticos ($K=5$).	Pag 41
Cuadro 1	Tratamientos de pH aplicados en las hortensias.	Pag 25
Cuadro 2	Iniciadores para ISSR utilizados en el presente trabajo	Pag 26
Cuadro 3	Programa de la PCR	Pag 26

ABREVIATURAS

°C: Grados Celsius
µg/mL: Microgramos sobre mililitros.
µg: Microgramos
µL: Microlitros
µM: Micromolar
3GT: UDP-glucosa flavona 3-oxi-glucosiltransferasa
3MAT1: Malonil CoA: antocianina 3-maloniltransferasa
3MAT2: Malonil Coenzima A: antocianina 3-dimaloniltransferasa
4Cl: 4-coumarato:Coenzima A ligasa
AAT: Antocianina aciltransferasa
ADN: Ácido desoxirribonucleico
Al₂(SO₄)₃: Sulfato de aluminio
Al³⁺: Ion aluminio
ANS: Antocianidina sintasa
AS: Aureusidina sintasa
C4H: Cinamato-4-hidroxilasa
CA: citocina:adenina
CG: citocina:guanina
CHG: citosina:H(donde puede ser timina, citosina, adenina):guanina
CHH: citosina:H(donde puede ser timina, citosina, adenina):H (donde puede ser timina, citosina, adenina):
CHI: Chalcona isomerasa
CHS: Chalcona sintasa
CIE: Commission Internationale de l'Eclairage (Comisión Internacional de la Iluminación)
cm: Centimetro
CT: citocina:timina
DFR: Dihidroflavonol reductasa
DO: Densidad óptica
F3'5'H: Flavonoide, 3'5 'hidroxilasa
F3959H: Dihidroflavonol 3959 hidroxilasa
F39H: Dihidroflavonol 39 hidroxilasa
F3H: Flavona 3β-hidroxilasa
Fe³⁺: Ion Hierro
FNS: Flavona sintasa
ISSR: Inter Simple Sequence Repeats (inter secuencias simples repetidas)
m: Metro
MgCl₂: Cloruro de magnesio
min: Minutos
min: Minutos
mL: Mililitro
mm: Milimetro
mM: Milimolar

ng: Nanogramos
nm: Nanometros
PAL: Fenilalanina amonio-liasa
pb: Pares de bases
PCR: Polymerase chain reaction (reaccion en cadena de la polimerasa)
pH: Potencial de hidrogeno
PP (Tierra pobre en materia orgánica)
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)
RH (Residuos Humanos)
RT: Ramnosil-transferasa
s: Segundos
SSR: Simple sequence repeats (secuencias simples repetidas)
TH (Tierra de hoja)
UF3GT: UDP-glucosa flavonol 3-O-glucosil transferasa
UPGMA Unweighted Pair Group with Arithmetic Average (Grupo de pares no ponderados con Promedio Aritmético)
V-ATPasa: Bombas protónicas
X= Matiz
Y= Claridad
Z= saturación

RESUMEN

El entendimiento de cómo las instrucciones genéticas de un simple gen o del genoma, se convierten en un amplio conjunto de características fenotípicas en un organismo, ha motivado el desarrollo de innumerables investigaciones y recientemente la aparición de una nueva corriente dentro de la biología, llamada fenómica.

Esta reciente ciencia está orientada a resolver uno de los objetivos de la Biología, que es entender las características fenotípicas y su variación que está sujeta a una compleja red de interacciones entre el genotipo y el medio ambiente. El presente trabajo es una pequeña incursión en la fenómica, dado que se trata de documentar a nivel molecular la interacción entre el fenotipo color de las hortensias (*Hydrangea macrophylla*) con el pH de un suelo.

Se utilizó el marcador molecular ISSR para caracterizar muestras de hortensias cultivadas a diferentes niveles de pH y se encontró que ese marcador permite el agrupamiento de las muestras de acuerdo al sustrato en el que fueron cultivadas.

Los resultados obtenidos, permitieron además; determinar un patrón de bandeo diferencial para cultivares de esta planta y asociarlo con la respuesta encontrada de los genotipos, al pH en el que se cultivaron.

I. ANTECEDENTES

La pregunta de ¿Cómo los genes y el ambiente interactúan para influenciar al fenotipo?, se puede aludir al trabajo de Mendel y Darwin, recientemente con los avances en secuenciación y lo que se ha llamado “*phenotyping technologies*”, se ha acuñado el término de Fenómica (del inglés *Phenomics*) en el 2009 por los científicos dedicados a estudios en neurociencias (Bilder y col., 2009; USDA-NSF, 2011), esta área de la ciencia reciente, ha sido propuesta como un nuevo enfoque en el estudio de cómo las instrucciones genéticas de un simple gen o del genoma, se convierten en un amplio conjunto de características fenotípicas en un organismo.

La fenómica está orientada a resolver uno de los objetivos de la Biología, que es entender las características fenotípicas y su variación sujeta a una compleja red de interacciones entre el genotipo y el ambiente, tal como lo mencionan Houle y col. (2010), ese mapa de acción genotipo-fenotipo es inaccesible sin obtener datos fenotípicos precisos que ayuden a entender la acción del genoma. El presente trabajo representa una pequeña incursión en la fenómica, dado que se trata de documentar a nivel molecular la interacción entre el fenotipo color de las hortensias (*Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser.) con el pH de un suelo.

El género *Hydrangea* consta de 23 especies que se encuentran distribuidas tanto en Asia como en América (McClintock, 1957). Varias especies se cultivan como plantas ornamentales, la más popular es *Hydrangea macrophylla*, comúnmente llamada hortensia (Reed y Rinehart., 2007).

1.1 Características de *Hydrangea macrophylla* u hortensia

Hydrangea macrophylla (hortensia), una de las especies más conocidas en el género *Hydrangea*, cientos de variedades han sido seleccionadas o desarrolladas en los últimos años principalmente en Holanda. La popularidad de las hortensias se debe en parte a su versatilidad como plantas de paisaje y floristería. En jardín, la planta forma un arbusto redondeado, generalmente no ramificado, con tallos que pueden alcanzar 2 m. Es una planta ornamental deseable, ya que tiene una gran variación en el tamaño de la flor, forma y color. Además se desarrolla bien con relativamente poco mantenimiento ya que tiene características como la tolerancia a la sombra y adaptación a suelos alcalinos y ácidos. Presenta hojas opuestas, simples, pecioladas, obovado-elípticas a ampliamente ovadas, coriáceas, glabras, de 3 a 12.5 cm de largo y 2 a 9 cm de ancho; el margen es aserrado; el ápice puede ser acuminado a agudo; la base es cuneada; el nervio medio y primario planos en el haz, resaltados en el envés; el peciolo varía de 0.5 a 3.0 cm de largo y 0.8 a 2.3 mm de ancho (Orozco-Obando y col., 2005; Orozco, 2012).

Para obtener diferentes coloraciones en la inflorescencia para las plantas de maceta y las líneas de vivero, es indispensable mantener un detallado monitoreo de los niveles de fósforo y aluminio, y un adecuado control en el suelo. *H. macrophylla* se encuentra dentro del grupo de especies que toleran ciertas concentraciones de aluminio en su metabolismo y el cambio de color de rojo a azul en sus sépalos es atribuido a la disponibilidad de este elemento en la tierra, como Al^{3+} , en función del pH. Para que se pueda manifestar una inflorescencia de color rosado, los cultivos requieren que el pH del suelo se encuentre en un rango de 5.8 a 6.2 y altos niveles de fósforo, bajas concentraciones de potasio y molibdeno; por otro lado para obtener flores de color azul es necesario mantener un pH más ácido, de entre 5.0 a 5.5, suplementado con varias aplicaciones de Al $[Al_2(SO_4)_3]$, bajos niveles de fósforo y altas cantidades de potasio y molibdeno, durante la producción de verano. Existe una competencia entre el fósforo y el ion aluminio; si se usan fertilizantes ricos en fósforo o ácido fosfórico se puede llegar a obtener sépalos de color púrpura o malva (Orozco, 2012).

Su gran valor ornamental y por lo tanto comercial ha provocado que muchos científicos se encuentren atraídos por la investigación en torno a esta especie. Uno de los estudios llevados a cabo se dirige directamente al genoma y la relación entre especies del género *Hydrangea*. El tamaño del genoma es un parámetro importante en el manejo de herramientas moleculares para el mejoramiento de la agricultura y características hortícolas de cualquier planta en la agricultura (Orozco, 2012).

1.2 Bases bioquímicas del color de las flores

Las plantas producen más de 200,000 tipos diferentes de compuestos, incluyendo muchos que contribuyen en el color de tallos, hojas y principalmente flores (Tanaka y col., 2008) La coloración de la mayoría de las flores y los frutos se controla por un complejo ampliamente conservado del gen llamado *MYB* asociado con genes reguladores (*HLH* y *WDL*), que activan cerca de quince genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de antocianinas y aquellas involucradas en su transporte a la vacuola. La tonalidad del tejido depende de factores que desplazan la antocianina, tales como, la presencia de copigmentos (por ejemplo, flavonoles), iones de metales y variaciones del pH en la vacuola (Lu y Zhang, 2012; Faraco y col., 2014). En la figura 1 se muestra la ruta metabólica de síntesis de las antocianinas. Para la síntesis de flavonoides, se requiere de azúcares para obtener fosfoenol piruvato y eritrosa-4-fosfato, que proveen los átomos de carbono necesarios, para el anillo B de los flavonoides y como fuente de acetato para el anillo A. La sacarosa disacárido importante para el transporte de azúcares a través de la planta, es producto de la degradación del almidón o las grasas almacenadas en las plantas (Salisbury 1992).

Los flavonoides, carotenoides y betalainas son los principales pigmentos florales. Entre estos tres grupos, los flavonoides contribuyen más a la gama y tipo de pigmentos de color en las plantas (Tanaka y col., 2009). Éstos compuestos, tienen

una estructura básica de C₆-C₃-C₆, ampliamente distribuidos entre las plantas terrestres. Dependiendo de sus estructuras, se pueden clasificar en cuatro grupos, tales como chalconas, flavonas, flavonoles y antocianinas. La modificación de los flavonoides con los grupos hidroxilo, metilo, glicosilo y acilo resulta en miles de estructuras que originan diferente gama de colores (Tanaka y col., 2008).

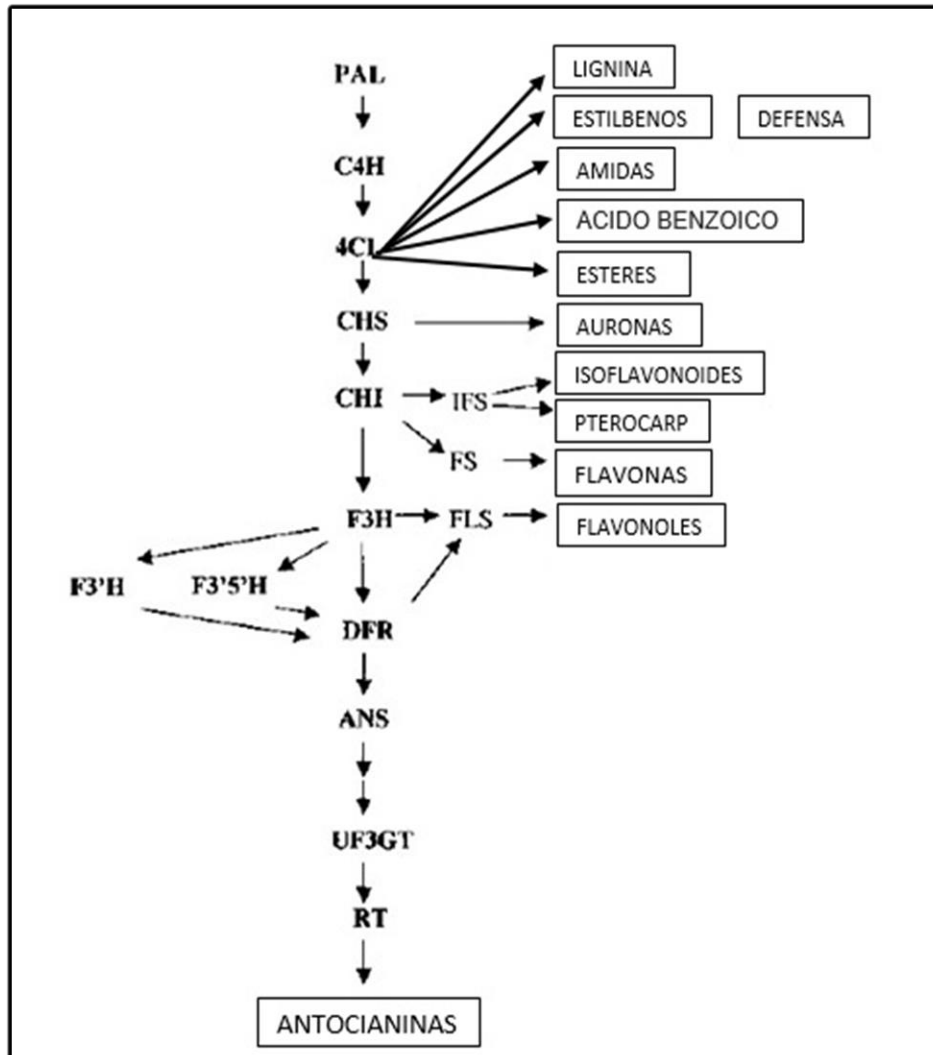


Figura 1. Ruta biosintética de los flavonoides. Enzimas involucradas en la síntesis de carotenoides. PAL, fenilalanina amonio-liasa; C4H cinamato-4-hidroxilasa; 4Cl 4-coumarato:Coenzima A ligasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; F3H, flavona 3 β -hidroxilasa; F39H, dihidroflavonol 39 hidroxilasa; F3959H, dihidroflavonol 3959 hidroxilasa; DFR dihidroflavonol reductasa; ANS, antocianidina sintasa; UF3GT, UDP-glucosa flavonol 3-O-glucosil transferasa; RT Ramnosil-transferasa (Tomado de Clegg y Durbin, 2000)

El color de todos los sépalos de las flores de hortensia tienen los pigmentos de antocianina y delfinidina 3-glucósido (Yoshida y col., 2003). En especies en las que el color se deriva principalmente de las antocianinas se determina por una combinación de varios factores. Además de la estructura de la antocianina, el tipo

y la concentración de los compuestos coexistentes (copigmentos), concentración de metal de tipo iónico, pH de vacuolas, localización de antocianinas, las formas de las células contribuyen al color de la flor (Tanaka y col., 2009).

Aunque hay cientos de antocianinas que se han reportado, se basan principalmente en seis antocianidinas comunes: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina. En términos de la biosíntesis, de la peonidina se deriva la cianidina; La malvidina y petunidina son derivados de la delfinidina y sólo hay tres antocianidinas principales: pelargonidina, cianidina y delfinidina. Las flores azules presentan delfinidina y sus derivados, en tanto que flores de color rojo intenso tienden a tener antocianidina y pelargonidina como base. Un aumento en el número de grupos hidroxilo en el anillo B, determina un color más azul originado por la presencia de los derivados de la antocianidina, mientras que la metilación del grupo 3' ó 5' hidroxilo, da como resultado un ligero enrojecimiento. Las antocianidinas se modifican con grupos glicosil o acilo de manera específica por glicosiltransferasas y aciltransferasas específicas. Las antocianidinas son modificadas de una manera específica entre las especies. Las antocianinas son frecuentemente glicosiladas en la posición C3, seguido por la posición C5 pero también se puede encontrar en la posición C7, C3 o C5. La glicosilación de antocianinas produce una coloración rojiza. Los restos de glicosilo de antocianinas son comúnmente modificados por compuestos aromáticos (hidroxicinámico o hidroxibenzoico) y/o alifáticos (malónico, acético, succínico) o restos acilo. La acilación aromática causa un cambio de color al azul y estabiliza las antocianinas. Las antocianinas modificadas con múltiples restos acilo-aromáticos a menudo muestran un color azul estable a través de acumulación de estas moléculas. La acilación alifática no cambia el color, pero aumenta la estabilidad y la solubilidad del color (Tanaka y col., 2008; Tanaka y col., 2009).

El color de las antocianinas depende de cambios en el pH, compuestos incoloros (copigmentos, típicamente flavonas y flavonoles) e iones metálicos coexistentes. *In vitro*, las antocianidinas son más rojas y más estables que la forma de catión flavilium a pH bajo (pH <3) e incoloro en un medio en condiciones ácidas (pH 3-6) y más azul e inestable como la forma básica quinonoidal en un pH 6 o superior. El apilamiento intermolecular por libre asociación o con flavonas o flavonoles (a menudo llamadas copigmentos antocianinas) estabiliza y hace un cambio batocrómico (azulado e intensificación del color). Los iones metálicos, tales como Al^{3+} y Fe^{3+} , desempeñan un papel fundamental en la generación de las flores azules en las hortensias (*Hydrangea macrophylla*) y el tulipán (*Tulipa gesneriana*), respectivamente. Un sutil equilibrio estequiométrico de una antocianina basado en cianidina, un flavonol, Fe^{3+} y Mg^{2+} es fundamental para la generación de los pétalos de color azul cielo de la amapola himalayan (*Meconopsis grandis*). (Tanaka y col., 2008).

1.3 Color de las flores y pH vacuolar

El pH dentro de los compartimentos celulares controla las reacciones enzimáticas, la clasificación de proteínas, el tráfico vesicular y la estabilidad de los metabolitos en su lumen (espacio interno en la estructura celular), se basa en la actividad de los transportadores que traslocan protones y otros iones a través de las membranas celulares. Las vacuolas son el mayor compartimiento de endomembrana en las células de plantas, que ocupa hasta el 90% del volumen celular. Ellas actúan como compartimentos líticos y/o como reservorios de iones y otras moléculas y están involucradas en la turgencia celular y la detoxificación de metabolitos y xenobióticos. En la mayoría de las células de las plantas, el pH citoplasmático es neutro y el del lumen de la vacuola es ligeramente ácido (~pH 6) llegando a ser más ácido en tejidos especializados, como en las células epidérmicas de los pétalos de petunia (pH vacuolar ≤ 5) o células del fruto del limón (pH vacuolar < 3). Los compartimentos celulares se acidifican por la activación de bombas protonicas V-ATPasa, que translocan H^+ desde el citoplasma hacia su lumen. La membrana que rodea a las vacuolas (tonoplasto), contiene además una bomba de protones pirofosfatasa. El bombeo de H^+ es electrogénico y produce un gradiente electroquímico que consiste de un potencial eléctrico y una diferencia de concentración química que inhibe rápidamente la importación de protones. Por lo tanto, el potencial eléctrico necesita ser disipado, por ejemplo, por los transportadores de aniones que median el flujo de un anión o un catión a través de la membrana vacuolar, para permitir la importación masiva de protones masiva (Faraco y col., 2014). En *Hydrangea*, *in vitro* la delphinidina 3-glucosido proporciona una solución azul estable, que coexiste con ácido 5-O-cafeoilquinico y/o ácido 5-O-p-coumaroilquinico y Al^{3+} , *sin embargo*, el mecanismo tal como sucede *in vivo*, aún no está descifrado (Tanaka y col., 2008).

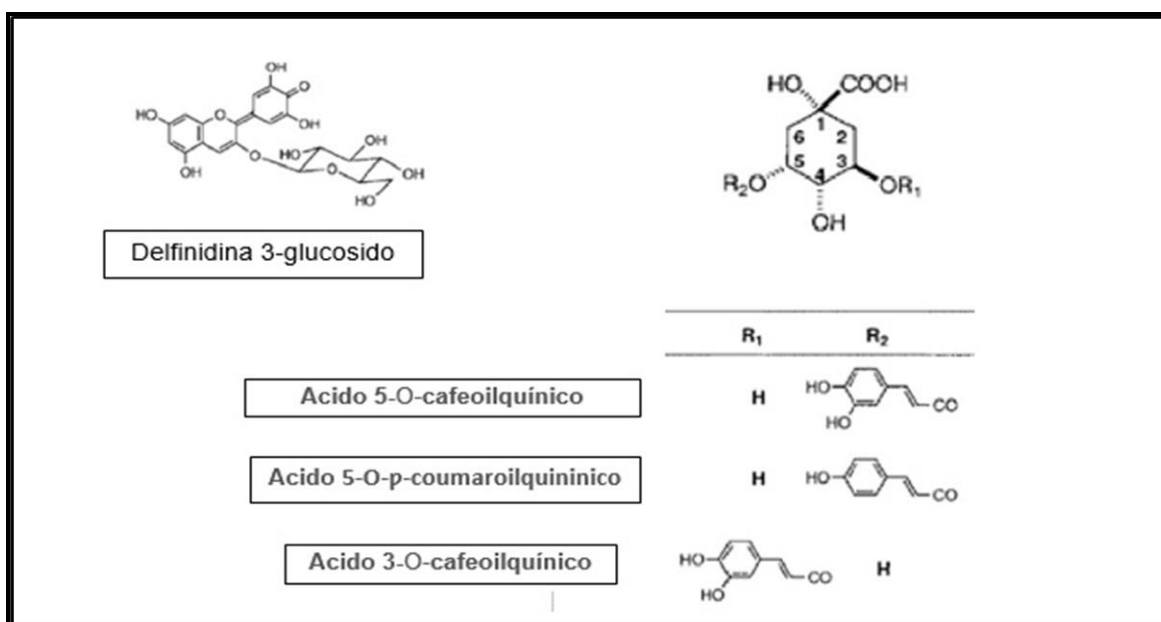


Figura 2. Color de los sépalos de hortensias y pH vacuolar. Estructura de las antocianinas y copigmentos (Tomado de Yoshida y col., 2003)

1.4 Base genética de la variación del color de las flores

Los genes reguladores de la síntesis de las antocianinas se refieren esencialmente a tres categorías *MYB*, *HLH* y *WDR*. Sus homólogos se pueden encontrar en otros reinos, lo que sugiere una variación evolutiva a nivel molecular. Los componentes de la síntesis de las antocianinas son relativamente conservados entre las angiospermas (por ejemplo, *Aquilegia*, *Convolvulaceae*, boca de dragón, lirio), que consiste de seis enzimas esenciales, que incluyen la chalcona sintasa (CHS), la chalcona isomerasa (CHI), flavonona 3-hidroxilasa (F3H), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), antocianidina sintasa (ANS) y UDP-glucosa flavona 3-oxi-glucosiltransferasa (3GT), para formar pelargonidinas. Dependiendo de la especie, dos enzimas también pueden estar presentes en la síntesis de flavonoides; 3'-hidroxilasa (F3'H) que conduce a tipos de antocianinas cianidina y flavonoide, 3'5' hidroxilasa (F3'5'H) causando la delphinidina (Figura 3 y 4). El efecto de epístasis es causado probablemente por afinidad y diferencia de las hidroxilasas y la enzima DFR (Lu y Zhang, 2012).

Además la síntesis de la estructura básica de la antocianina, que consiste en los anillos A, B y C, con modificaciones en el carbono 15. El anillo B proviene de un cumarato que también contribuye a una parte del anillo C; los anillos A y C parciales se derivan de tres malonatos. Típicamente la absorbancia máxima de antocianinas es cercano a 530 nm, utilizado para la cuantificación total de antocianinas, por cromatografía. Más de 500 antocianinas se han descrito para diferentes especies, esta diversidad es causada principalmente por hidroxilación, glicosilación, acilación de los grupos hidroxilo de la aglicona. En primer lugar, la presencia o ausencia de F3'H y/o F3'5'H determina que se produce la hidroxilación del anillo B. Entonces, la glicosilación puede ocurrir normalmente en la posición tres del anillo C por glucosiltransferasa 3GT y a veces en la posición cinco o siete de un anillo por las glucosiltransferasas 5GT y 7GT respectivamente. En algunas especies, grupos tales como el ácido cafeico se pueden conectar a las moléculas de azúcar para formar una estructura de apilamiento para mejorar la estabilidad del pigmento. La presencia y los niveles de expresión de los genes de modificación como la antocianina aciltransferasa (AAT) o varias glucosiltransferasas (por ejemplo, 3GT, 5GT, 3GGT, etc) pueden cambiar los tipos de antocianina almacenados en vacuolas. Esta composición alterada de antocianinas puede traer el cambio de color en las flores de una manera más sutil. Actualmente, los detalles sobre estas etapas de modificación son desconocidas (Lu y Zhang, 2012).

Teóricamente, la síntesis de estas antocianinas debe ser rápidamente seguida, por el transporte de los pigmentos a la vacuola, por el glutathione-S-transferasa (GST) enzima capaz de transportar a las antocianinas en el citoplasma (Lu y Zhang, 2012).

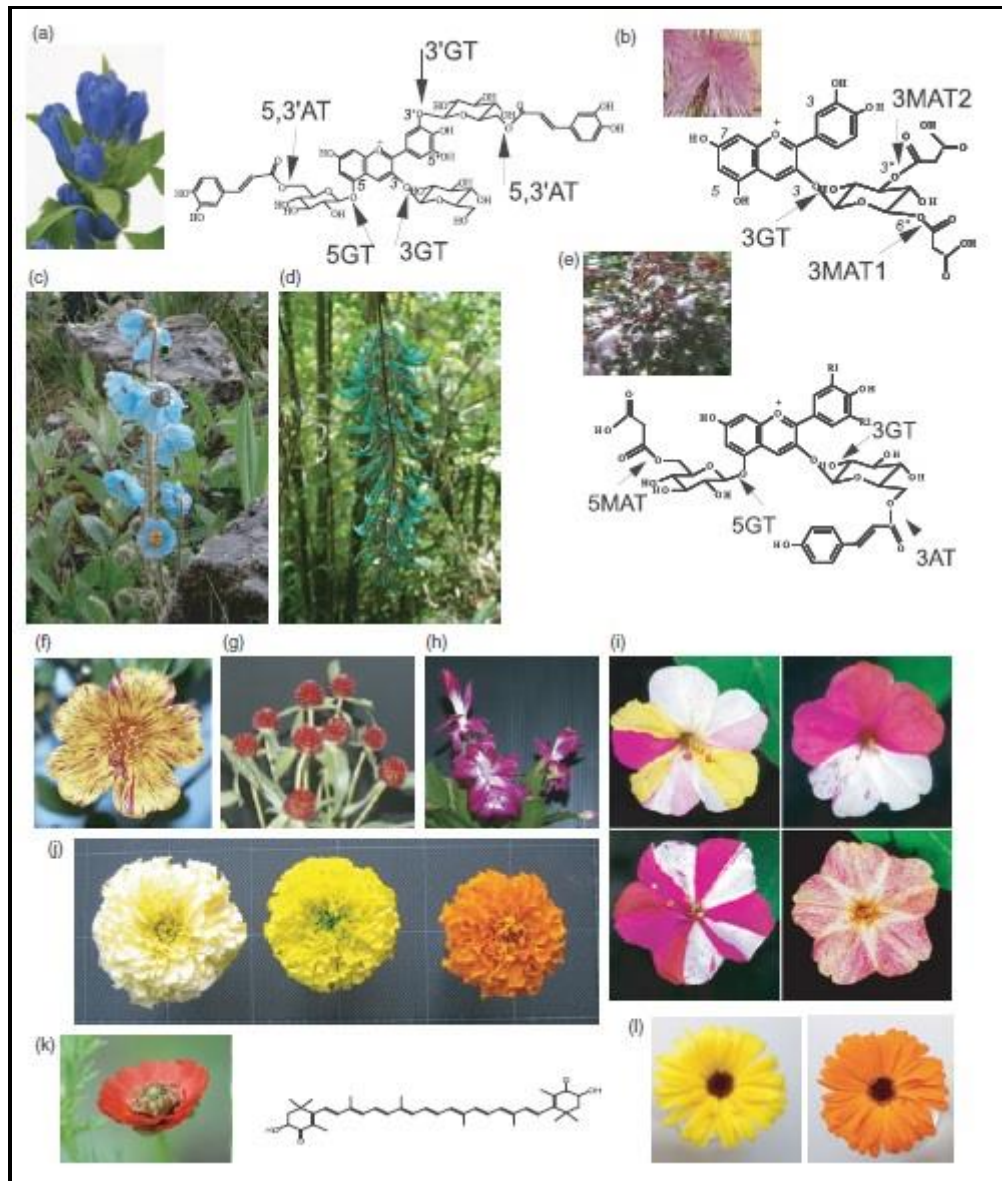


Figura 3. Color de las flores, de acuerdo a las antocianinas presentes (Tomado de Tanaka y col., 2008).

(A) Flores de genciana (*Gentiana acaulis*), que contienen antocianinas basadas en diaci-delfinidina como el gentiodelfina (derecha), las reacciones de Glucosilación (3'GT, 5GT, 3'GT) y acilación (5,3'AT) se indican con flechas.

(B) Pétalos de crisantemo (*Chrysanthemum*) contienen cianidina 3-(6''-malonil o 3'',6''-dimalonil)-glucósido. Los sitios de modificación por las enzimas 3MAT1, malonil CoA: antocianina 3-maloniltransferasa; 3MAT2, malonil Coenzima A: antocianina 3-dimaloniltransferasa.

(C) Amapola azul, *Meconopsis horridula*. El color azul cielo de pétalos *Meconopsis* depende de antocianina a base de cianidina, flavonoles y Fe^{3+} .

- (D) *Strongylodon macrobotrys*, una planta polinizada por murciélago de las Filipinas, con flores de color verde azulado, presentan malvidina diglucósido 3,5 y flavonas. En esta el color verdoso se produce por un factor no caracterizado.
- (E) Las hojas de perilla roja (*Perilla frutescens*) son una fuente de un colorante natural que contiene cianidina. Se muestra una antocianina Perilla. 3AT, hydroxycinnamoyl Coenzima A: antocianina 5MAT 3 hidroxicinnamoiltransferasa, malonil Coenzima A: antocianina 5-maloniltransferasa.
- (F) Un portulaca variegada (*Portulaca grandiflora*) flor.
- (G) Flores de amaranto de globo (*Gomphrena globosa*)
- (H) Flores de cactus de Navidad.
- (I) Las flores abigarradas de *Mirabilis jalapa* ('cuatro en punto'). La variación en color es probable que sea causada por transposones.
- (J) Las flores de caléndula con diferentes coloraciones en pétalos causados por diferentes cantidades de luteína.
- (K) Las flores de *Adonis aestivalis* tienen un color rojo sangre derivada de astaxantina. Se muestra la estructura de la astaxantina.
- (L) Los pétalos amarillos y naranjas de la caléndula (*Calendula officinalis*). Las diferencias en la composición de carotenoides resultan en diferencias de color.

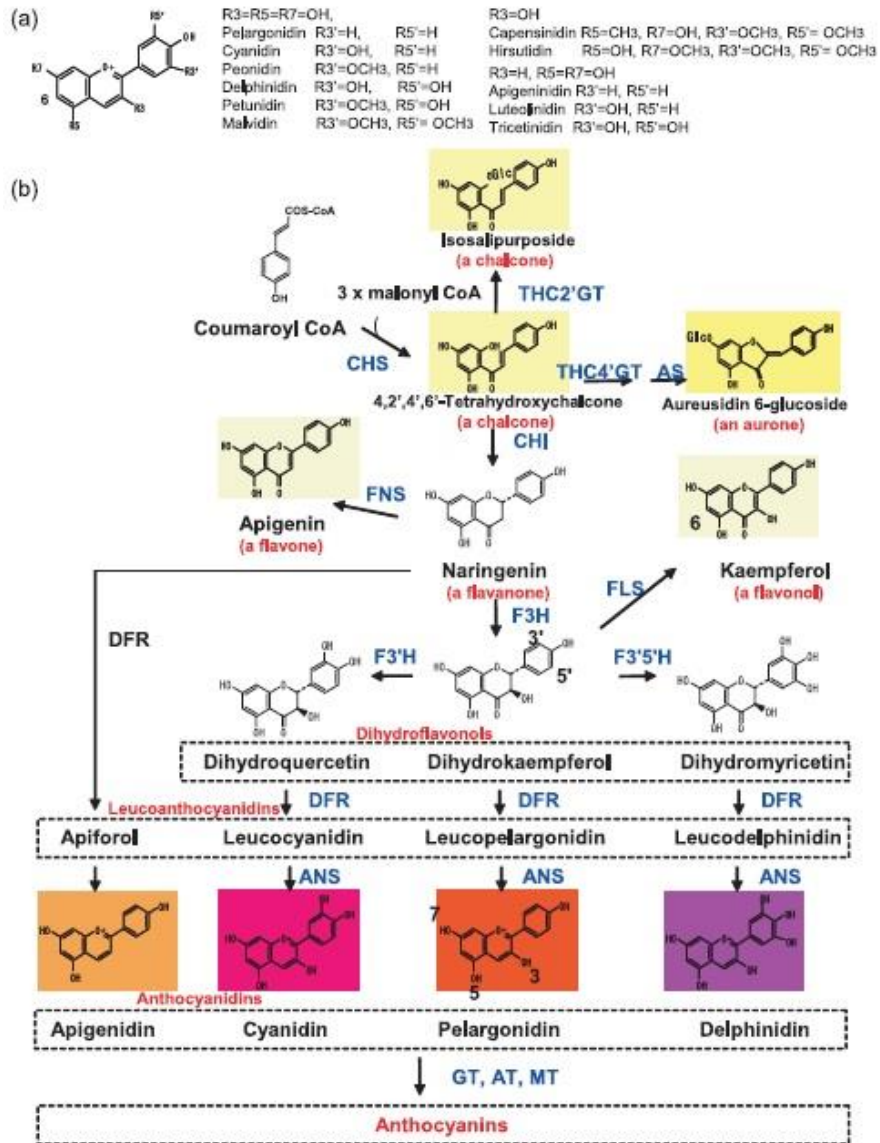


Figura 4. Estructuras de antocianidina y vías biosintéticas del flavonoide correspondiente al color (Tomado de Tanaka y col., 2008).

(A) Las estructuras de las principales antocianidinas (grupos R, que aparecen a la izquierda) y algunas antocianidinas menores (grupos R, que aparecen a la derecha). La estructura básica se muestra en el extremo izquierdo.

(B) La ruta biosintética que conduce a la biosíntesis de antocianidinas. Antocianidina se modifican con grupos glicosil, acilo o metilo, catalizada por glucosyltransferasas (GT), aciltransferasas (AT) y metiltransferasas (MT). Las enzimas y las clases de flavonoides, se indican con letras azules y rojas, respectivamente. CHS, chalcona sintasa; THC2'GT, UDP-glucosa: 2'GT tetrahidroxichalcona; CHI, chalcona isomerasa; THC4'GT, UDP-glucosa: tetrahidroxichalcona 4'GT; AS, aureusidina sintasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, 3,5 flavonoide"-hidroxilasa; DFR,

dihidroflavonol 4-reductasa; ANS, antocianidina sintasa; FNS, flavona sintasa; FLS, flavonol sintasa; Glc, glucosa.

1.5 Monitoreo del genotipo de un organismo

En la identidad genética de los individuos intervienen dos factores: la herencia parental y las mutaciones espontáneas. La mutación espontánea puede ser generada por diversas razones como la duplicación: desfaseamiento de las cadenas de ADN, errores en la replicación o reparación del ADN, modificaciones químicas, mutación meiótica y/o mitótica de ADN. En organismos diploides, la recombinación meiótica provoca un intercambio de genes de los progenitores, de tal manera que los hijos son el resultado de una mezcla de genes de ambos padres. Por otro lado, los factores ambientales provocan cambios espontáneos del material genético, dando diferentes patrones genéticos, por lo que al utilizar diversos marcadores moleculares proporciona distintos patrones de bandeo al amplificar ciertas regiones del genoma (Eguiarte y col., 2007).

Los ISSRs son un tipo de marcador genético que permite obtener los niveles de variación genética basado en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT) ó (CA), ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el ADN se replica durante la meiosis, la ADN polimerasa puede “moverse” hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Eguiarte y col., 2007).

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o iniciador complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios al extremo 3' o 5', que jugarán el papel de “ancla” asegurando que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o 3' del microsatélite. Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el iniciador complementario a ellas puede inducir la amplificación del segmento de ADN intermedio. La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Y se ha visto que los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella digital genética” de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la

presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el iniciador y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Eguiarte y col., 2007).

Una ventaja de los ISSRs es que son reproducibles y los productos de amplificación se pueden visualizar utilizando electroforesis tanto en geles de agarosa con tinción con bromuro de etidíó o en geles de acrilamida con teñidos con nitrato de plata, siendo evaluados por el análisis de patrones de bandeo (presencia/ausencia de bandas) entre todos los individuos analizados. Para hacer una detección adecuada de variabilidad y diversidad genética, es recomendable utilizar tres o más iniciadores, teniendo longitudes desde 10 a 50 bases. Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus (Eguiarte y col., 2007).

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores como:

- 1) La no existencia de un sitio de unión completo al iniciador debido a una mutación.
- 2) Rearreglos estructurales del ADN en el cromosoma durante la meiosis.
- 3) Inserciones o deleciones del ADN suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente.

Entre las principales ventajas en el uso de ISSRs es que se puede obtener un gran número de bandas polimórficas, esta técnica se centra principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Asimismo, no es necesario utilizar altas concentraciones de ADN para su aplicación (PCR). Por otro lado, para diseñar los iniciadores no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Finalmente, son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos (Eguiarte y col., 2007).

1.6 Bases físicas para la descripción del color de las flores

La CIE o Commission Internationale de l'Eclairage (que se traduce como Comisión Internacional de la Iluminación), es la institución responsable de las recomendaciones internacionales para la fotometría y colorimetría. En 1931 la CIE estandarizó sistemas de orden de color, especificando las fuentes de luz (o iluminantes, el observador y la metodología usada para encontrar los valores para la descripción de color.

Los sistemas CIE usan tres coordenadas para ubicar un color basado en una referencia llamada "espacio de color". Estos espacios de color tienen diferencias de apreciación según tres sistemas de medición: CIE XYZ; CIE L*a*b* y CIE L*C*h°. Estas tres formas de medición de la luz, incluyen tres aspectos

importantes que son: el matiz, la saturación y la luminosidad. Lo anterior se basa en que el ojo humano requiere tres cosas para ver, es decir, requiere una fuente de luz, un objeto y un observador/procesador.

El matiz, se refiere al color que normalmente describimos cuando observamos un objeto, sencillamente se describe como rojo, azul, verde, etc. El anillo de color de la figura 5, muestra un continuo de color de un matiz al siguiente. Así como se muestra en el anillo, al mezclarse los colores se obtienen colores secundarios (X-Rite, 2002).

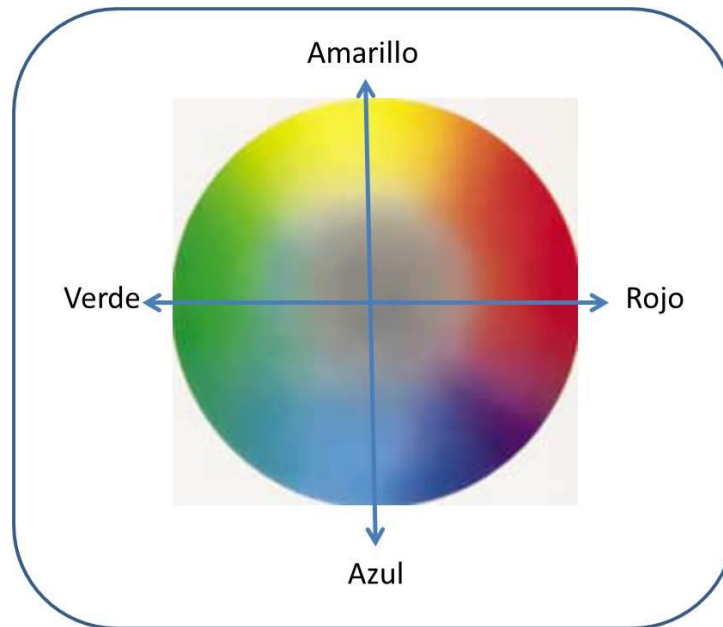


Figura 5. Gráfica representativa del matiz en la medición de color

La saturación, describe lo llamativo o lo apagado de un color, en otras palabras, qué tan cerca está el color del gris, es decir al matiz puro. Por ejemplo, al comparar un tomate con un rábano, el rojo del tomate es mucho más llamativo mientras el rábano parece más apagado. La figura 6, muestra cómo cambia el chroma conforme el observador se mueve del centro hacia la periferia. Los colores en el centro son grises y apagados o sucios y conforme se avanza hacia la periferia se vuelven más saturados (vivos o limpios) el chroma también se conoce como saturación (X-Rite, 2002).

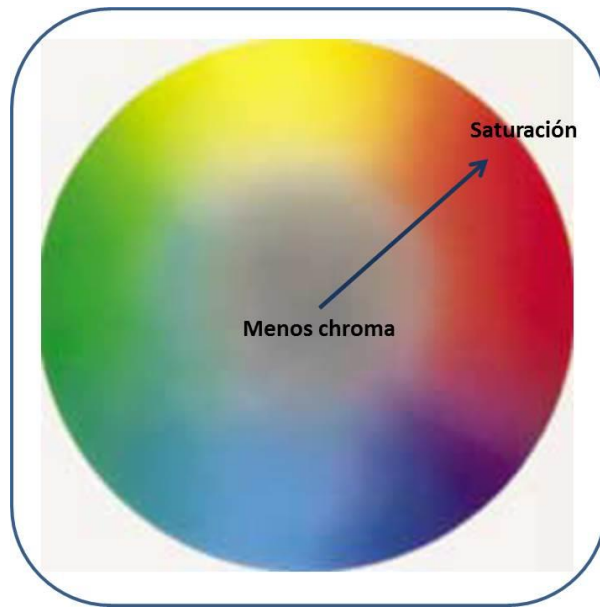


Figura 6. Gráfica representativa del saturación o chroma en la medición de color

La luminosidad, se le llama así a la intensidad lumínica, es decir al grado de claridad del color. Los colores pueden ser clasificados como tenues u oscuros al comparar sus valores. Por ejemplo, cuando se colocan lado a lado un tomate y un rábano el rojo del tomate parece ser mucho más tenue. En contraste, el rojo del rábano tiene un valor de rojo más oscuro. En la figura 7, se presenta la claridad o el valor en el eje vertical (X-Rite, 2002).

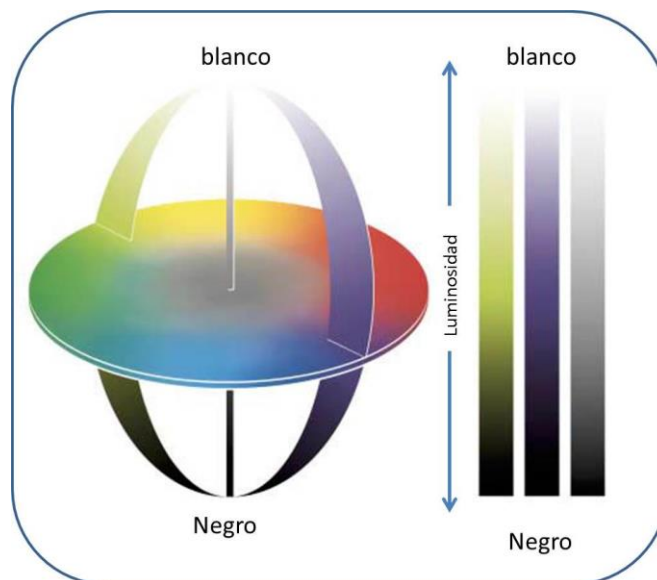


Figura 7. Gráfica representativa de la luminosidad en la medición de color

Los instrumentos utilizados para la medición de color, suelen llamarse colorímetros, éstos no son espectrofotómetros, sino dispositivos triestimulares, es decir, contienen tres filtros, uno rojo, uno verde y uno azul que emulan la respuesta del ojo humano al color y la luz. La desventaja de los colorímetros, es

que no compensan el llamado metamerismo, que es el cambio en la apariencia de la muestra debido a la luz usada para iluminar la superficie. Lo anterior es debido a que estos dispositivos utilizan un sólo tipo de luz en su fuente de iluminación (Incandescente o Xenón pulsado) y por tal motivo no registran la reflectancia espectral y no pueden predecir el cambio de respuesta a las diferentes calidades de luz.

1.7 Medida del color

El color puede observarse sólo si hay luz, a diferencia del sentido absoluto del tono musical que poseen algunas personas, no hay sentido absoluto del color, toda percepción es relativa. En general toda luz es blanca, como todos los objetos iluminados por ella que tienen reflectancias altas y a la vez independientes de la longitud de onda. Tales objetos se llaman blancos (sería mejor llamarlos acromáticos) casi independientemente de la calidad de su iluminación. Los objetos cromáticos son aquellos que al ser observados aparecen cualitativamente diferentes del blanco, es decir, poseen un tono (Martínez, 2003; Universidad de la Rioja, 2012).

En 1931 se desarrolló un sistema cuantitativo para el color de la visión humana por la Comisión Internationale de l' Eclairage (CIE) creó primero un sistema XYZ, que incluye un espacio de color absoluta para describir la visión de color tricromática mediante la integración de los estímulos 700, 546.1, 435.8 nm, en una luz normalizada. Cada color visible puede ser descrito por las coordenadas positivas para X, Y, y Z que son independientes (Lu y Zhang, 2012).

Cualquier sistema que se defina para la medida del color debe verificar tres condiciones:

- a) Dos estímulos con la misma especificación numérica, vistos por un observador con visión normal del color y en las mismas condiciones de observación, deben parecer iguales.
- b) Dos estímulos que parezcan iguales deben tener la misma especificación numérica.
- c) Los números para la especificación del color deben ser funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de flujo radiante espectral de los estímulos (Universidad de la Rioja, 2012).

Si cada uno de los componentes monocromáticos de la radiación compuesta produce una sensación de color y es cierto que al sumar radiaciones se suman sensaciones, entonces toda radiación compuesta se puede tratar de este modo; es el principio de aditividad, formulado por Grassman, fundamental en toda la colorimetría (Universidad de la Rioja, 2012).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La base genética de la plasticidad fenotípica se ha considerado como la interacción entre la base genética de un fenotipo dado y el medio ambiente. El conocimiento de la base genética de un fenotipo, puede facilitar en gran medida el estudio de la evolución del fenotipo, debido a que la expresión determinada por el ambiente se convierte en predecible y susceptible a experimentos.

En México está sujeto a las patentes extranjeras de producción de variedades ornamentales para el inicio de un cultivo. Esto ha permitido la proliferación de monopolios en la propagación de plántulas de cultivos de interés. En hortensias se ha observado una variación fenotípica que no corresponde precisamente a la interacción de las plantas con el sustrato, en particular en la producción de colores no programados. Esto es, los proveedores, venden el producto frecuentemente sin certificar la variedad, por lo que el productor se encuentra con la sorpresa de que el fenotipo no corresponde a lo que se solicitó.

Encontrar un patrón molecular que detecte la variación genotípica que se encuentra en los lotes de plántula adquiridos, contribuiría de varias maneras a mejorar la planeación y la producción de plantas ornamentales que son destinadas principalmente a la exportación.

En el caso de las hortensias, la uniformidad genotípica es importante cuando se quiere producir un rango de colores específico, lo cual no es posible cuando los proveedores suministran lotes con alta variedad genotípica.

H. macrophylla se ha convertido en un componente importante en la industria de las flores en todo el mundo. El conocimiento de los factores que intervienen en el proceso de floración es importante en la producción intensiva y rentable. La vía en la que participa la fertilización y el manejo agronómico, principalmente el manejo de pH del sustrato en el que se producen puede determinar el color de la flor, factor determinante de la calidad de la planta que permite la programación tanto de la floración como de las características de la arquitectura de la planta. En este sentido, una caracterización molecular previa, proporcionará información al productor sobre el rango de coloración que el genoma de la planta le permite.

2.1 Hipótesis

Los marcadores moleculares ISSR permiten determinar patrones genéticos de hortensias (*H. macrophylla*) y discriminar entre genotipos, enfocados con la influencia de la variación del pH en el sustrato.

2.2 Objetivo general

Determinar un patrón de bandeo con el marcador ISSR en hortensias (*H. macrophylla*) que permita relacionar la variación de color, con su genotipo al ser producidas en sustratos con diferentes niveles de pH.

2.3 Objetivos específicos

1. Utilizar el marcador ISSR como herramienta para determinar un patrón de bandeo específico para hortensias
2. Determinar los patrones de variación de color de cada genotipo detectado.
3. Establecer una relación entre los patrones de bandas generados con ISSR, variación de color y el pH del sustrato en el que se produjeron.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal.

El presente trabajo se llevó a cabo en forma paralela a un experimento agronómico de producción de hortensias en sustratos con diferentes niveles de pH, en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara. Dicho experimento incluye como objetivo la modificación de los colores de sépalos de estas flores, ya que son plantas que cambian su fenotipo ante las diferentes concentraciones de pH según se describió en la sección de antecedentes.

El esquema que se siguió para establecerlas en diferente pH se muestra en el Cuadro 1, en donde se señala que se utilizaron tres sustratos base a los cuales se añadió hidróxido de sodio para subir el nivel inicial de pH y ácido fosfórico para bajarlo.

Cada tratamiento incluyó 15 plantas de hortensia y tres repeticiones. Este mismo arreglo se siguió para tomar muestras de tejido foliar, es decir, se tomó tejido de las 15 plantas de cada tratamiento y todas las repeticiones, lo que constituye un total de 45 plantas de cada tratamiento.

Las muestras se conservaron en congelación a -20°C hasta su procesamiento.

Cuadro 1. Tratamientos de pH aplicados en las hortensias.

Tratamiento Sustrato	I (pH inicial)	II	III
TH (Tierra de hoja)	5.13	subir pH*	subir pH*
PP (Tierra pobre en materia orgánica)	5.06	subir pH*	subir pH*
RH (Residuos H)	6.3	Bajar pH**	Bajar pH**

*Hidróxido de sodio

** Ácido fosfórico

3.2 Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Saghai-Marooft y col. (1984). Este protocolo consiste en triturar 0.35 g de material fresco con nitrógeno líquido y homogenizar el polvo obtenido con amortiguador de extracción 2X CTAB (Tris-HCl 100mM (pH 7.5), NaCl 5M, EDTA 20 mM, CTAB 2%, β -mercaptoetanol 1% y bisulfito de sodio 1%). Se incubó en baño María a 60°C durante 30 min y se añade cloroformo octanol 24:1. Se precipita el ADN con isopropanol. Se realizan lavados con 76% ETOH/0.2M Na-acetato y 76%

ETOH/10mM NH₄-acetato. En el paso final se resuspende el ADN en T.E. (Tris 10mM-EDTA 1mM) hasta su utilización en PCR.

La calidad y concentración del ADN obtenido, se verificó de acuerdo a protocolos de espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa 1% (Sambrook y Russell, 2001). Con la lectura de absorbancia con un espectrofotómetro Jenway® 6305 a dos longitudes de onda 260 y 280 nm y se realizó una estimación de la calidad con la división $DO_{260} \div DO_{280}$ donde DO= densidad óptica. Esta estimación supone un resultado de 1.8 a 2.0 como indicador de buena calidad de ADN.

Se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos por PCR utilizando los marcadores ISSR. Los iniciadores utilizados se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Iniciadores para ISSR utilizados en el presente trabajo

Iniciador	Secuencia
Becky	5'- CAC ACA CAC ACA CAY C -3'
814	5'- CTC TCT CTC TCT CTC TTG -3'
899	5'- CAC ACA CAC ACA RG -3'

La reacción de PCR, se llevó a cabo en un termociclador Techne® flexigene bajo las siguientes condiciones: por reacción se utilizaron los siguientes reactivos: Amortiguador PCR 1X, 2.5 mM MgCl₂, 0.8 µM de cada iniciador, 0.25 mM de dNTPS; 0.05 U de Taq. Polimerasa de la marca Promega® y 2.5 ng de ADN.

El programa de amplificación se describe el cuadro 3.

Cuadro 3. Programa de la PCR:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3 min	1
95°C	45 s	40
52°C	45 s	
72°C	1.5 min	
72°C	10 min	1
4°C		∞

La resolución de los fragmentos obtenidos, se realizó en geles de agarosa de alta resolución al 1.25% que fueron teñidos con bromuro de etidio 0.5 µg/mL para su visualización. Se captó la imagen utilizando el fotodocumentador Kodak® Molecular Imaging Software, versión 4.0.

3.3 Registro de fenotipos

Una vez obtenida la floración en los tratamientos de pH, se registró el color de las inflorescencias, utilizando el colorímetro Konika Minolta® Chroma-Meter CR-400 que utiliza el sistema de color CIE y mide X= matiz, Y= claridad, Z= saturación, valores con los cuales se realiza un cálculo para un valor numérico de color. Estas mediciones se usaron para comparar los patrones moleculares con el fenotipo correspondiente del color de flor de cada planta muestreada.

3.4 Análisis de datos

Se realizaron matrices binarias de acuerdo a la presencia/ausencia de bandas observadas en los geles, con las cuales se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard de acuerdo a la ecuación $s_j = \frac{v_{ij}}{v_{ij} + w_{ij} + x_{ij}}$ (Reif y col., 2004) y se realizó análisis de agrupamiento por el método UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Average) mediante el software NTSYSpc® ver. 2.2. Los resultados se presentan en un dendrograma.

Se calculó el porcentaje de polimorfismo total en los loci detectados con las tres combinaciones de iniciadores.

Se utilizó el programa Structure® ver. 2.3.4 para detectar la estructura genética entre las hortensias analizadas, se realizó el procedimiento de análisis según la metodología marcada por Pritchard y col. (2000), que para el caso del presente trabajo, incluyó 15,000 repeticiones y 15,000 iteraciones, en una simulación de $K=2$ a $K=7$ grupos. Para determinar la simulación que señale el número de grupos más probable, se utilizó el programa Structure Harvester (Web ver. 0.6.93) que es un entorno virtual que permite analizar los resultados del Structure y recalcular e inferir con herramientas estadísticas el correcto número de grupos (K), de acuerdo a lo reportado por Dent y VonHoldt (2011).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR para ISSR

Fue posible obtener ADN de todas las muestras procesadas; la calidad y concentración se verificó tanto en geles de agarosa al 1% como por espectrofotometría. En la figura 8, se muestra uno de los corrimientos.

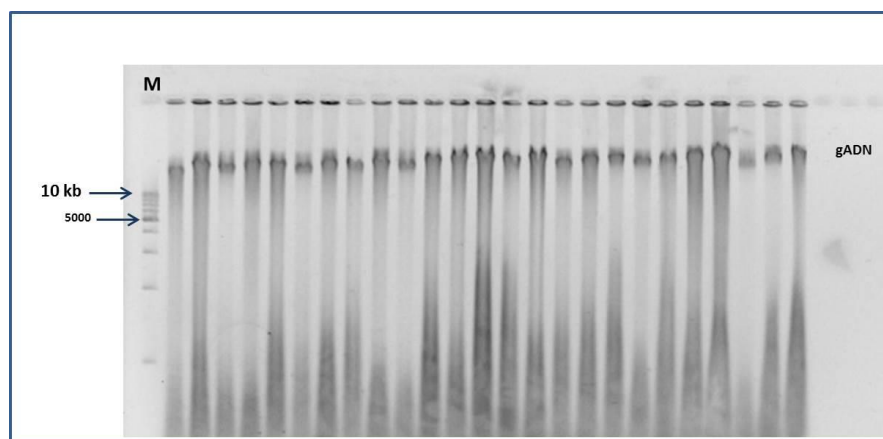


Figura 8. Gel de agarosa al 1% con ADN genómico de las muestras de hortensia. Línea 1: Marcador molecular, Promega®; Línea 2-26, ADN genómico de hortensia 100 ug/uL

Las lecturas del espectrofotómetro proporcionaron datos para calcular el promedio de la concentración de las muestras siendo alrededor de 2437.51, con una calidad de 1.68 lo que implica presencia de algunos contaminantes pudiendo ser polisacáridos o fenoles en la muestra. Sin embargo, la calidad del ADN fue suficiente para la amplificación de las muestras, como se puede observar en la figura 9.

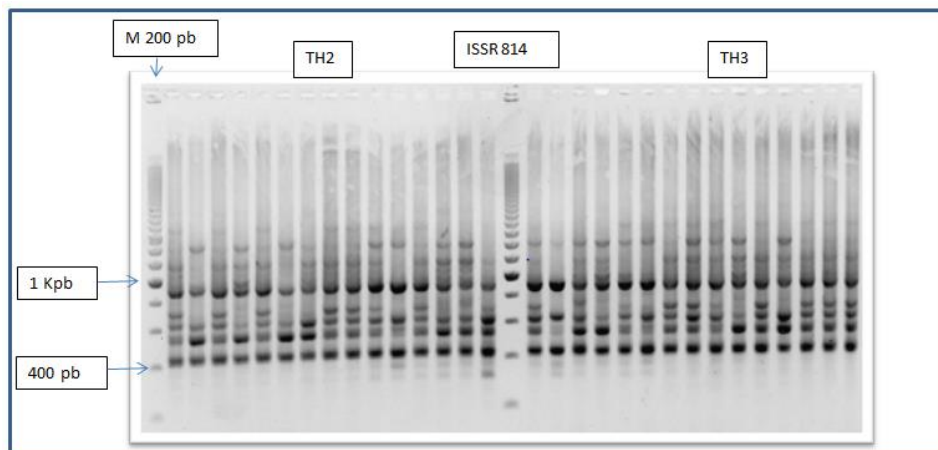


Figura 9. Patrones de amplificación del iniciador 814 de ISSR en muestras de hortensia. Línea 1, Marcador molecular 200 pb Promega®; Línea 2-16 productos de PCR obtenidos con muestras de hortensia producidos en sustrato TH2; Línea 17, Marcador molecular 200 pb Promega®; Línea 18-32, productos de PCR obtenidos con muestras de hortensia producidos en sustrato TH3.

Los patrones de PCR fueron repetibles y consistentes diferencias, presentando entre muestras pertenecientes a hortensias cultivadas en un mismo pH. Se obtuvo un total de 38 loci de los cuales 36 fueron polimórficos, esto representa el 94.7% del polimorfismo representado en hortensia.

4.2 Relaciones genéticas

Los resultados obtenidos con el análisis de similitud y agrupamiento para todas las muestras utilizadas, se reportan en la figura 10. Es notable la asociación que el marcador detectó para las muestras que se cultivaron en un mismo sustrato. Probablemente porque este marcador es capaz de detectar cambios epigenéticos en el ADN o bien es un efecto que se ha denominado en la actualidad como “fenómica”. Como se mencionó en los antecedentes, ésta es una transdisciplina dedicada al estudio sistemático de los fenotipos en una escala amplia genotípica (Bilder y col., 2009). Este comportamiento del marcador molecular, es atribuible a una variación temporal en la secuencia de ADN, que puede causar la variación en la expresión génica, lo que influye en la variación fenotípica cuantitativa en los organismos y es un factor importante en la variación natural (Fujimoto R. y col., 2012).

Recientemente, informes indican que el cambio epigenético puede causar variación fenotípica, y por lo tanto el cambio epigenético se puede considerar como un factor importante en la comprensión del cambio fenotípico. La metilación del ADN y las histonas son bien conocidas como modificaciones epigenéticas. La metilación del ADN se refiere a una adición de un grupo metilo en la quinta posición de carbono de un anillo de citosina y en las plantas se observa no sólo en el contexto simétrica CG, sino también en contextos de secuencia de CHG y CHH (donde H es A, C, o T). La metilación del ADN se enriquece en las regiones heterocromáticas, tales como en las regiones centroméricas y pericentroméricas, que constan predominantemente de transposones. La mayoría de los transposones son inmóviles para proteger la integridad del genoma y son silenciados a través de la metilación del ADN. (Fujimoto y col., 2012).

Con el objetivo de detectar la respuesta fenotípica de las plantas (color) a cambios en el pH de los sustratos, se analizaron por separado los grupos que corresponden a cada sustrato.

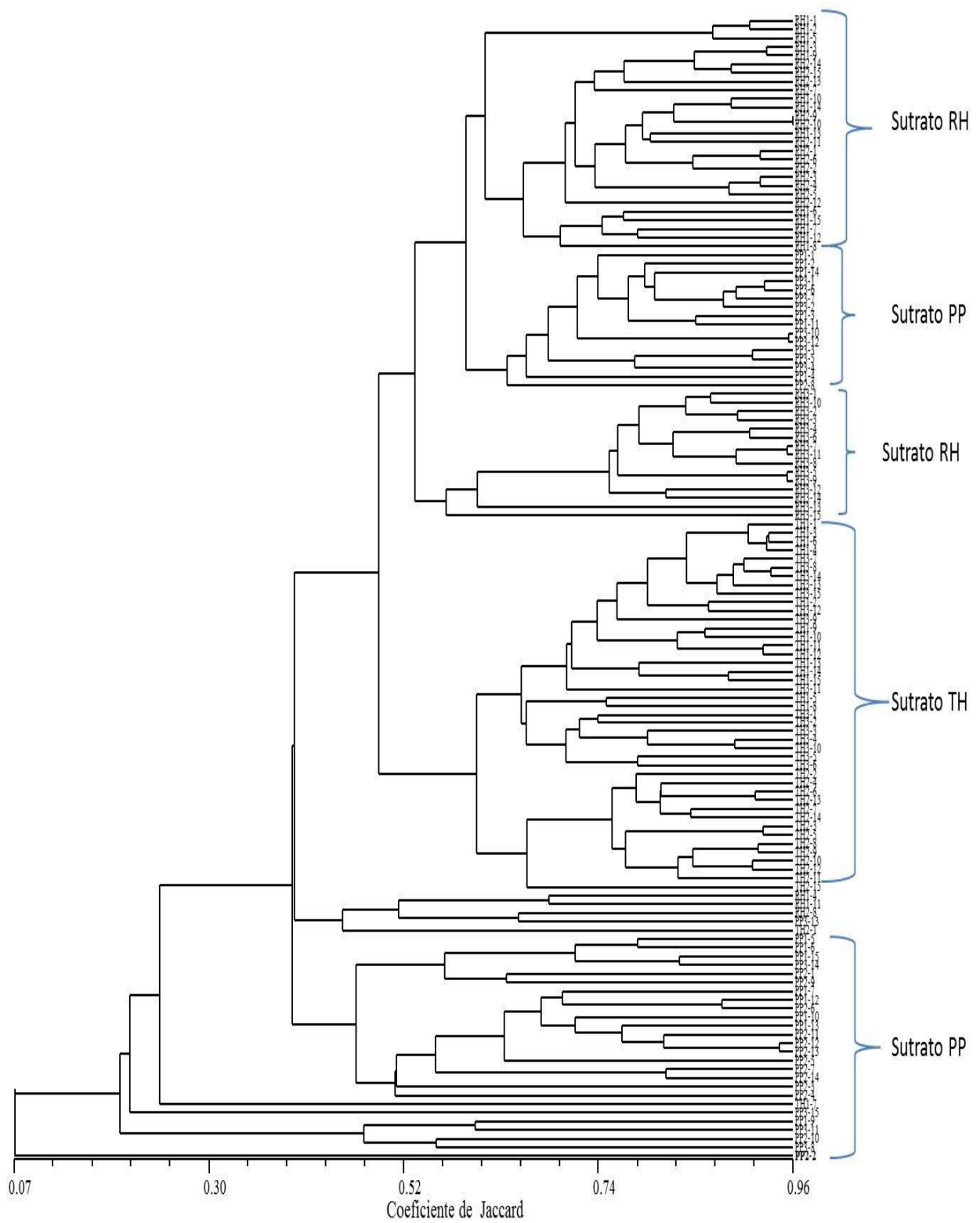


Figura 10. Dendrograma producido por el análisis de agrupamiento en muestras de hortensia que fueron cultivadas en diferentes sustratos.

4.3 Análisis de agrupamiento para hortensias cultivadas en el sustrato RH.

Al realizar el análisis de agrupamiento de cada grupo por separado, se encontraron las siguientes asociaciones (Figura 11).

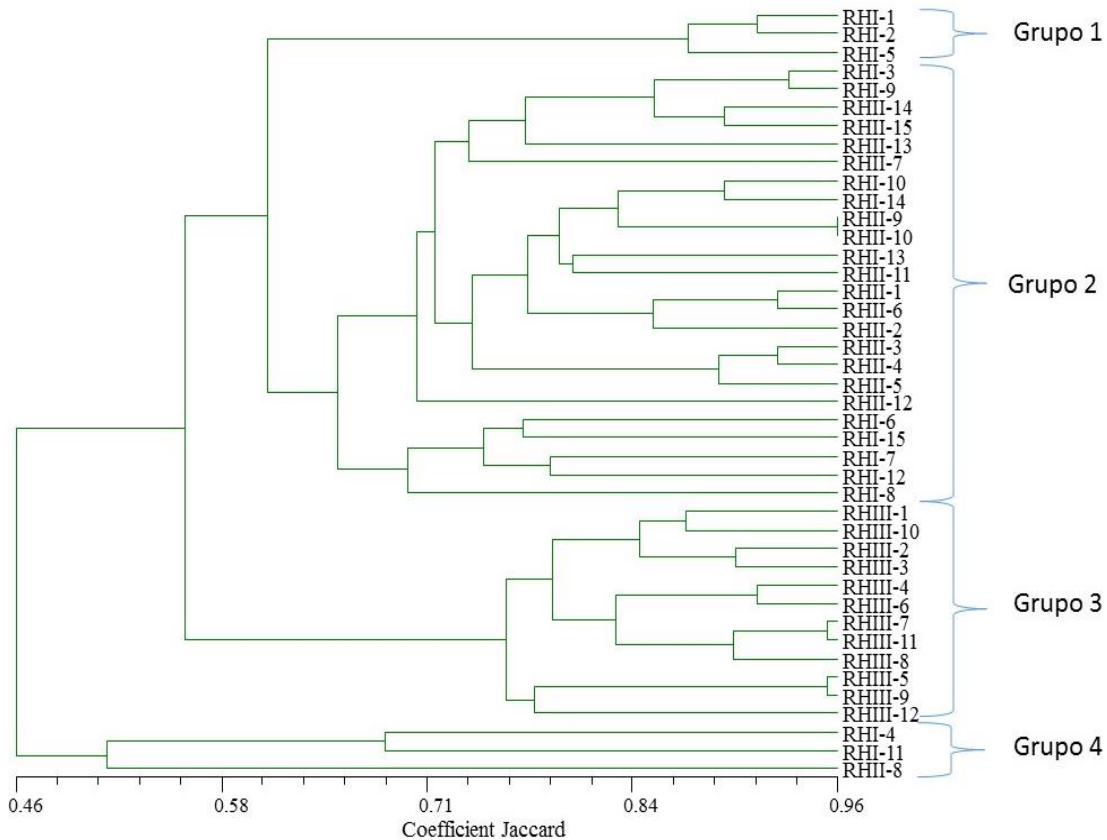


Figura 11. Dendrograma obtenido con datos de ISSR de hortensias cultivadas en el sustrato RH.

Para el sustrato RH, los materiales analizados se separaron a nivel 0.46 del coeficiente de Jaccard en dos grupos. En este sustrato, se produjo un total de cuatro grupos principales, los cuales presentaron un rango de colores que se presenta en las figuras 12 a 15.

La similitud total que se detectó entre las hortensias cultivadas en el sustrato RH, fue de 0.5 (0.96, valor máximo detectado y el valor menor 0.46 valor inicial).

Entre los individuos cultivados en este sustrato, no se presentó el color azul y los individuos se agruparon principalmente en el grupo identificado como Grupo 2.

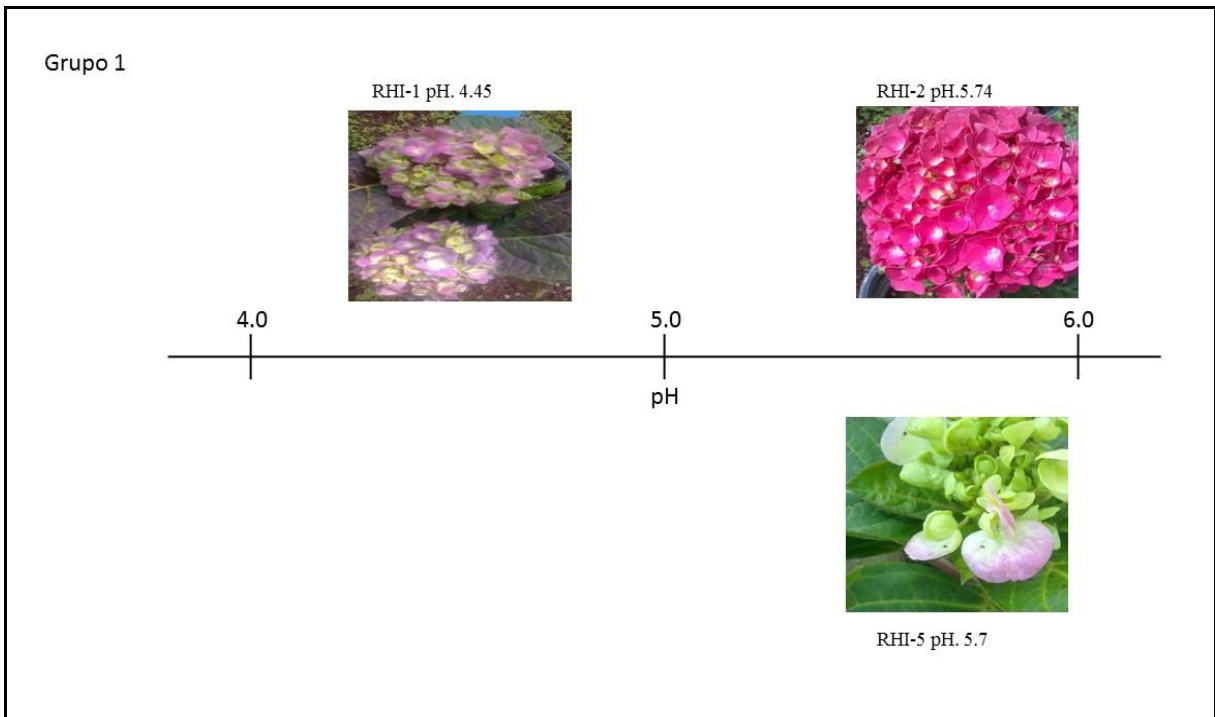


Figura 12. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 1 de hortensias cultivadas en el sustrato RH.

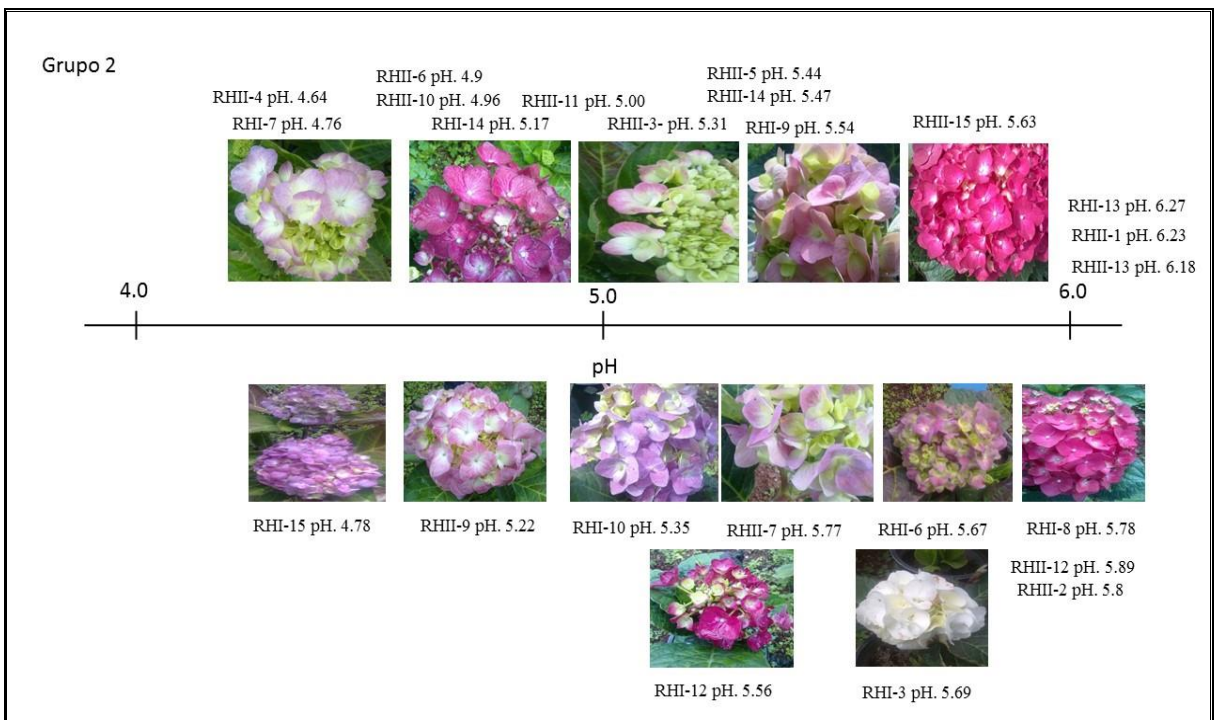


Figura 13. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 2 de hortensias cultivadas en el sustrato RH

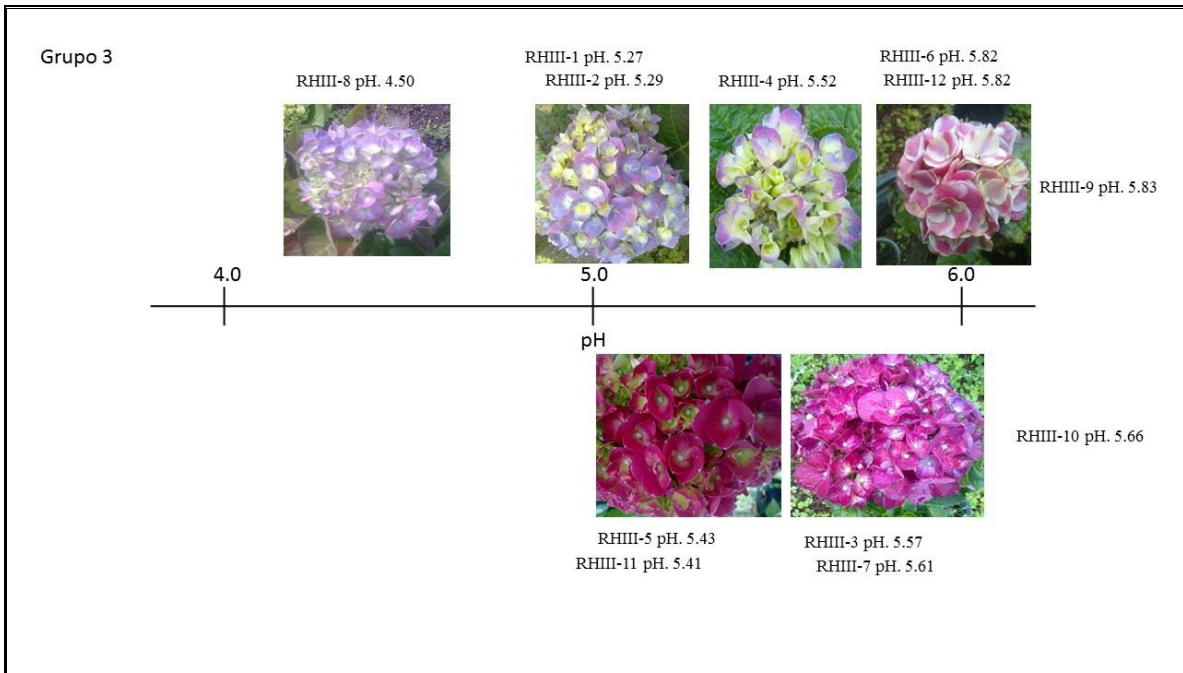


Figura 14. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 3 de hortensias cultivadas en el sustrato RH

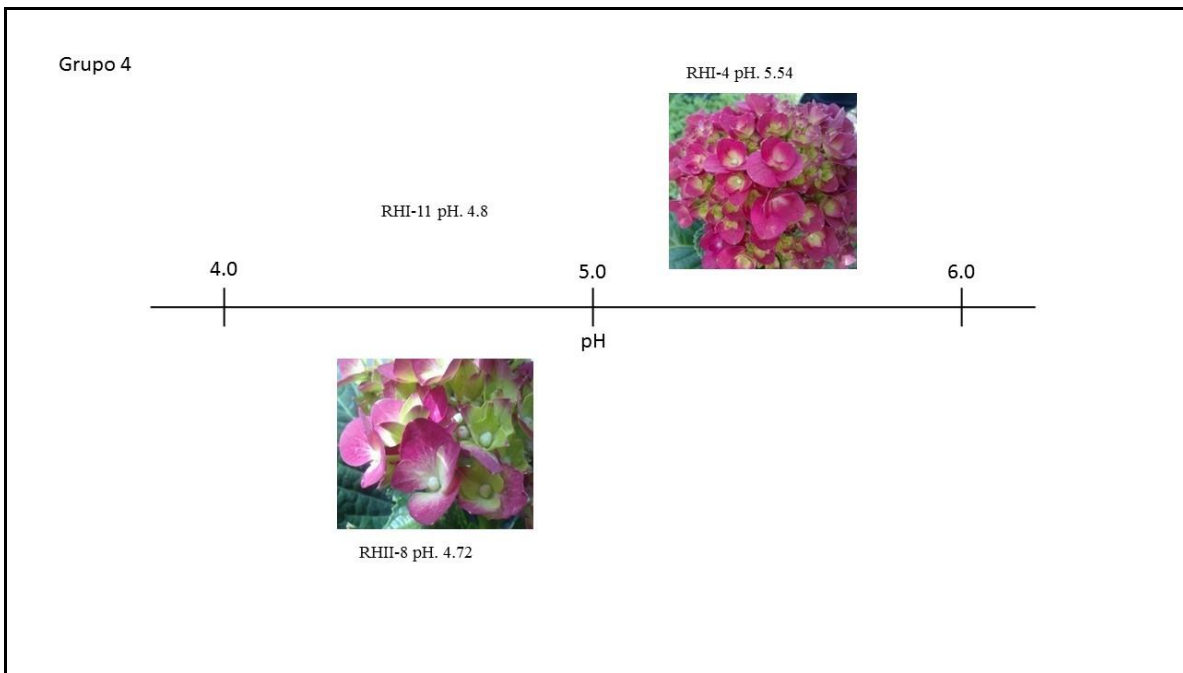


Figura 15. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 4 de hortensias cultivadas en el sustrato RH

4.4 Análisis de agrupamiento para hortensias cultivadas en el sustrato PP.

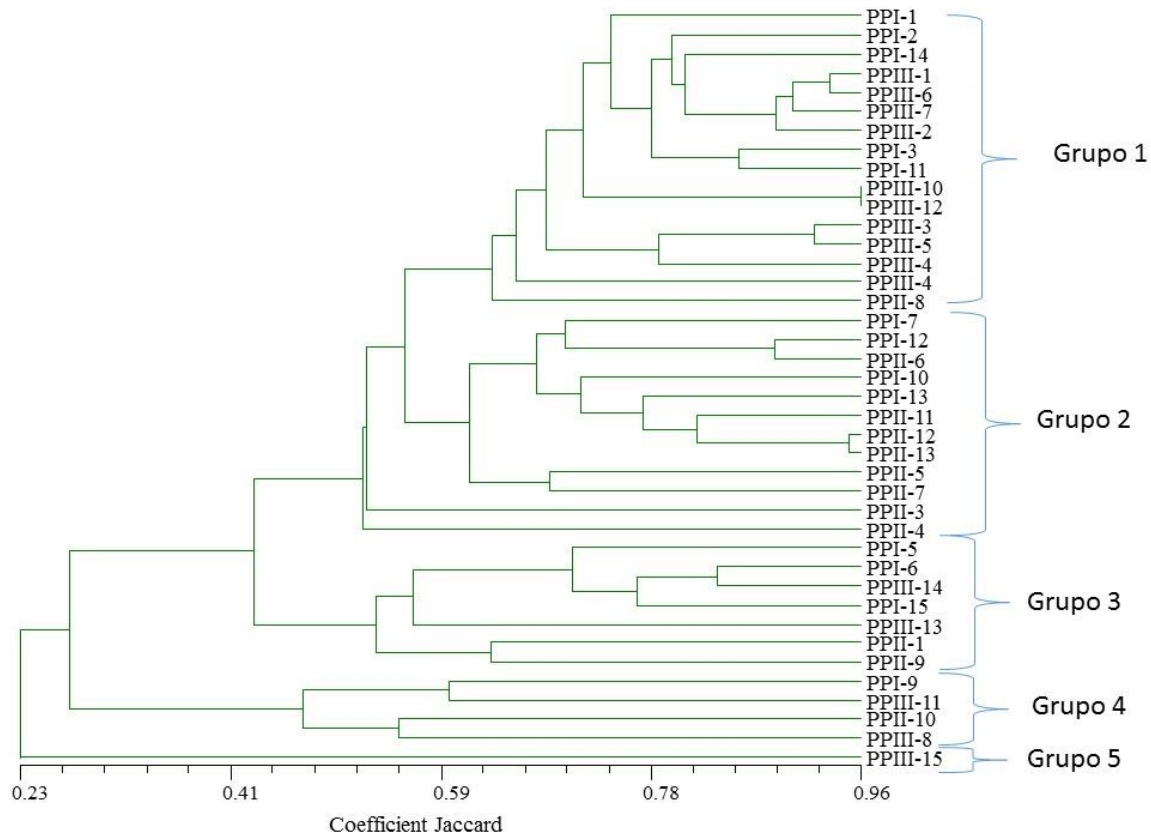


Figura 16. Dendrograma obtenido con datos de ISSR de hortensias cultivadas en el sustrato PP.

Para el sustrato PP, los materiales analizados se separaron a nivel 0.23 del coeficiente de Jaccard. Dentro de esta separación, se encontraron cinco grupos principales que se diferencian por su capacidad de producir el mismo color en diferente pH (Figuras 17 a 20). Ejemplo, el color fucsia llamativo que se presentó en individuos del Grupo 1 del sustrato anterior (RH), se repitió en los Grupos 3 y 4, en valores de pH de 5.74 y 5.73 respectivamente, mientras que en el sustrato PP se produjo un color similar en pH de 5.30 y 5.23.

En las plantas cultivadas en el sustrato PP, se presentó en la mayoría de los individuos, el color azul-violeta, encontrándose también un individuo de flores blancas perteneciente al Grupo 1 (PPIII-2) y uno de color rosa (PPIII-12) pertenecientes ambos al mismo grupo o cluster.

Cabe mencionar que en este sustrato PP se presentó la gama más amplia de colores, ya que se contó con el blanco, rosa, fucsia y varios tonos de morado. Esto puede deberse a que fue el sustrato menos orgánico y eso facilitó la asimilación de sulfato de aluminio usado para fertilización.

4.5 Análisis de agrupamiento para hortensias cultivadas en el sustrato TH.

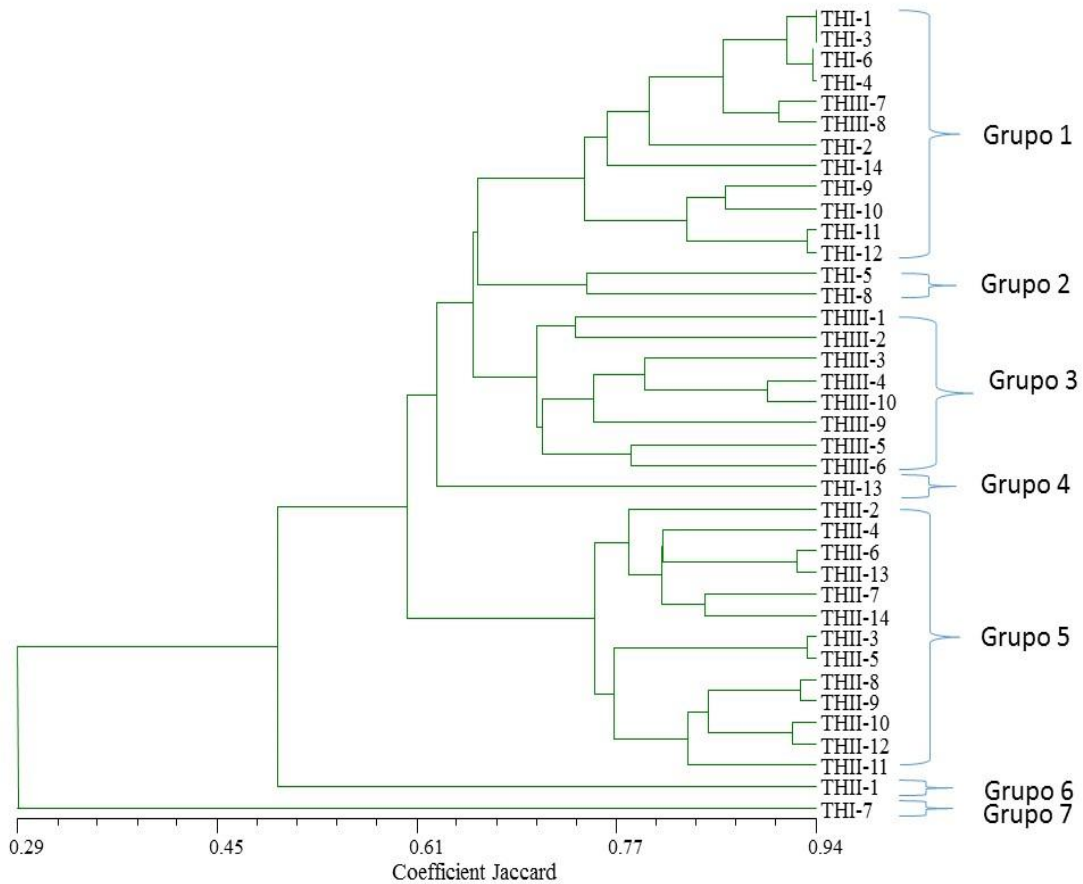


Figura 21. Dendrograma obtenido con datos de ISSR de hortensias cultivadas en el sustrato TH.

El sustrato TH (a base de la llamada “tierra de hoja”), resultó el sustrato con mayor contenido orgánico y pH más ácido (3.95 el menor).

Las plantas analizadas se separaron a nivel 0.29 del coeficiente de Jaccard (Reif y col 2004) y aun cuando se encontró cinco grupos principales (Figura 21) y además se clasificaron además otros dos grupos por haberse encontrado en este tratamiento con dos individuos fuera de tipo (THII-1 y THI-7).

Los rangos de coloración que se muestran en las Figuras 22 a 25, tienen básicamente al azul-violeta y al morado con tintes azules. Este comportamiento se debe precisamente al pH más ácido del sustrato.

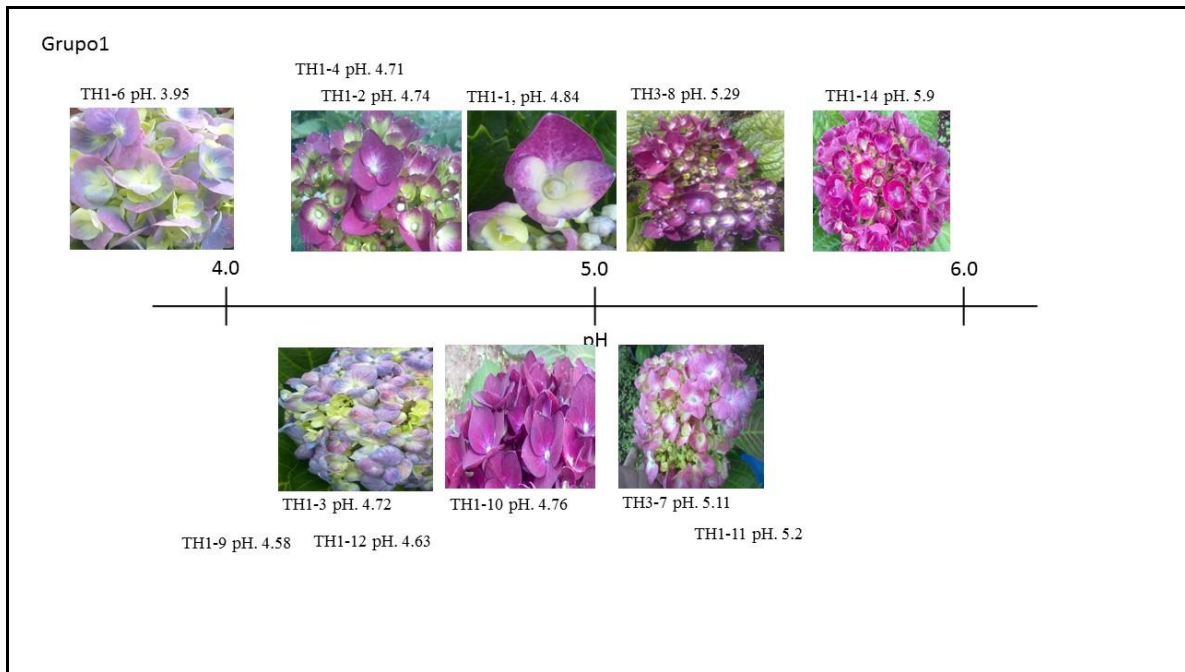


Figura 22. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 1 de hortensias cultivadas en el sustrato TH

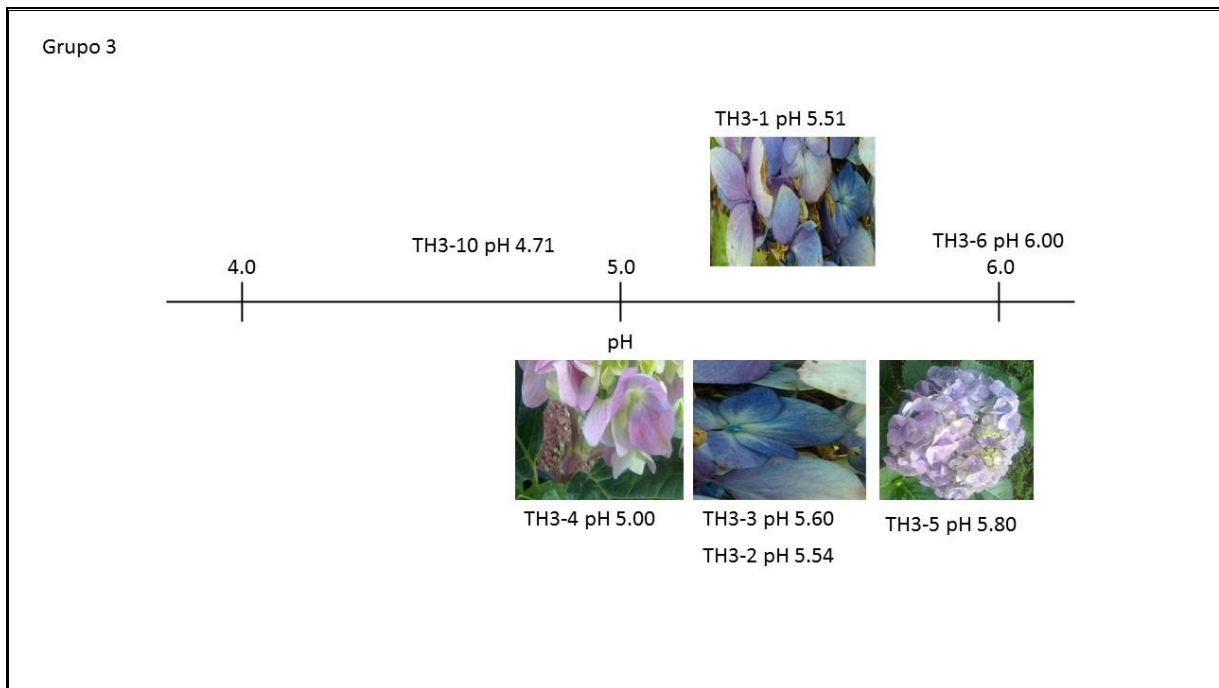


Figura 23. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 3 de hortensias cultivadas en el sustrato TH

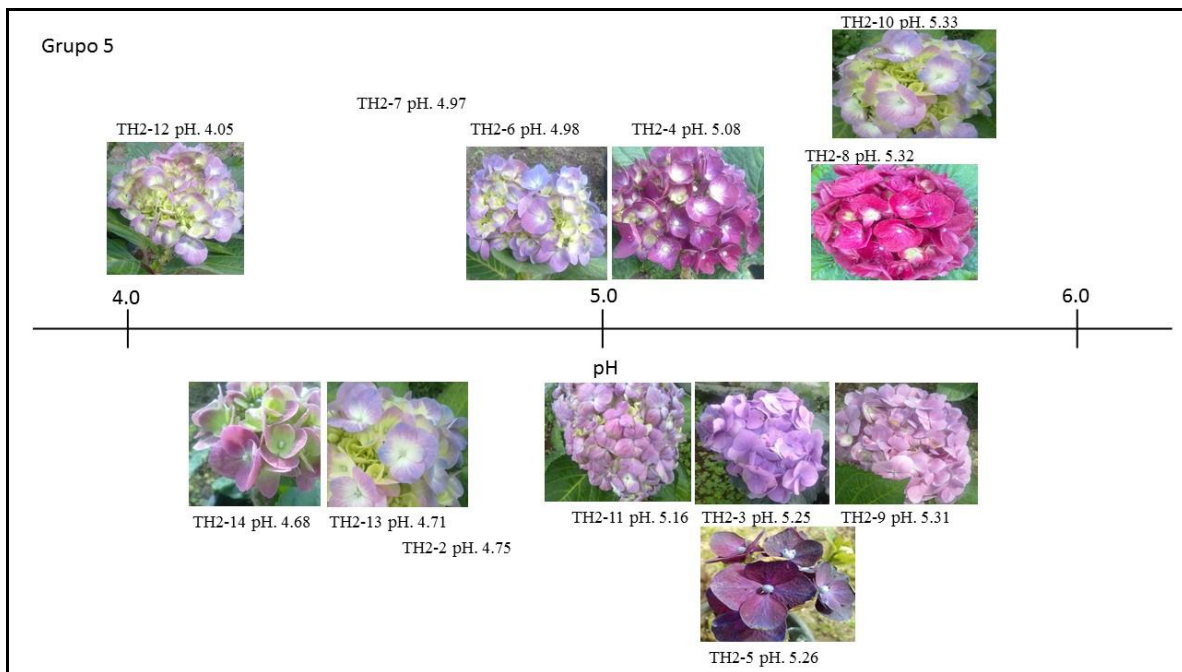


Figura 24. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 5 de hortensias cultivadas en el sustrato TH

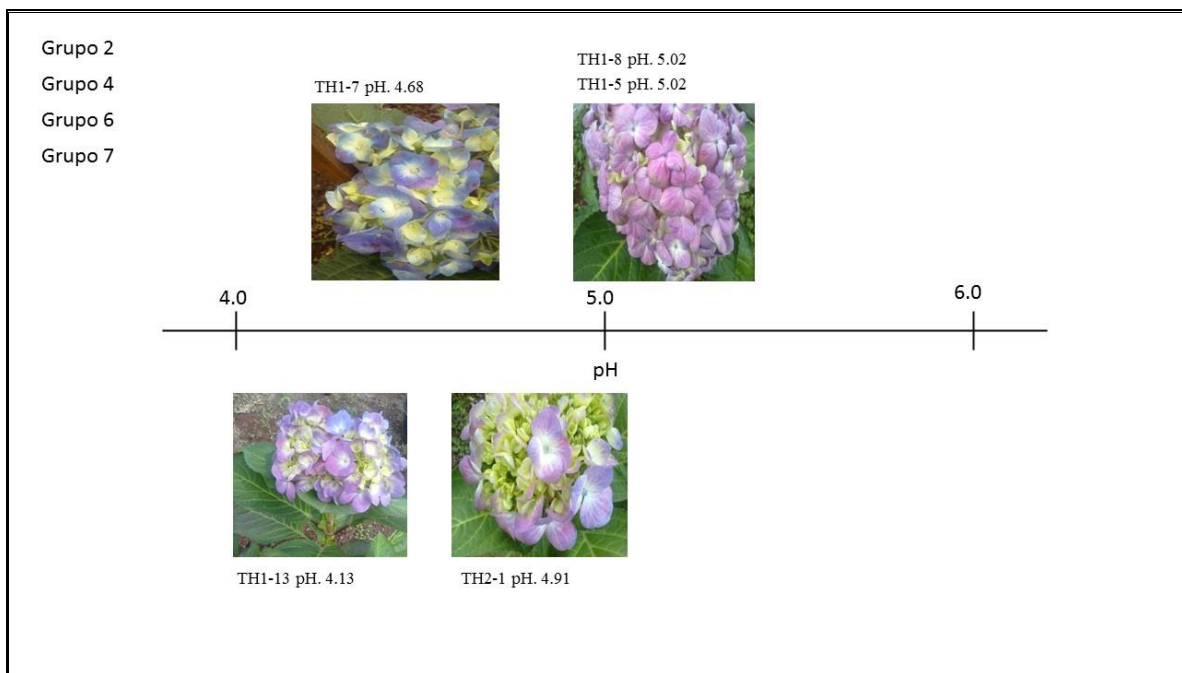


Figura 25. Rango fenotípico de color producido por el Grupo 2 (THI-1 y THI-8), 4 (THI-13), 6 (THII-2) y 7 (THI-7) de hortensias cultivadas en el sustrato TH

4.6 Estructura genética

Los resultados obtenidos en el análisis de estructura genética (Figura 26), mostraron una correspondencia con siete grupos ($K=7$), lo cual está basado en la salida de resultados del programa (Figura 27). En esta primera aproximación de la estructura, se presupone que la mayor variabilidad genética se encuentra entre el grupo de plantas cultivadas en el sustrato PP, lo cual corresponde a lo encontrado en el análisis de similitud y en el análisis fenotípico.

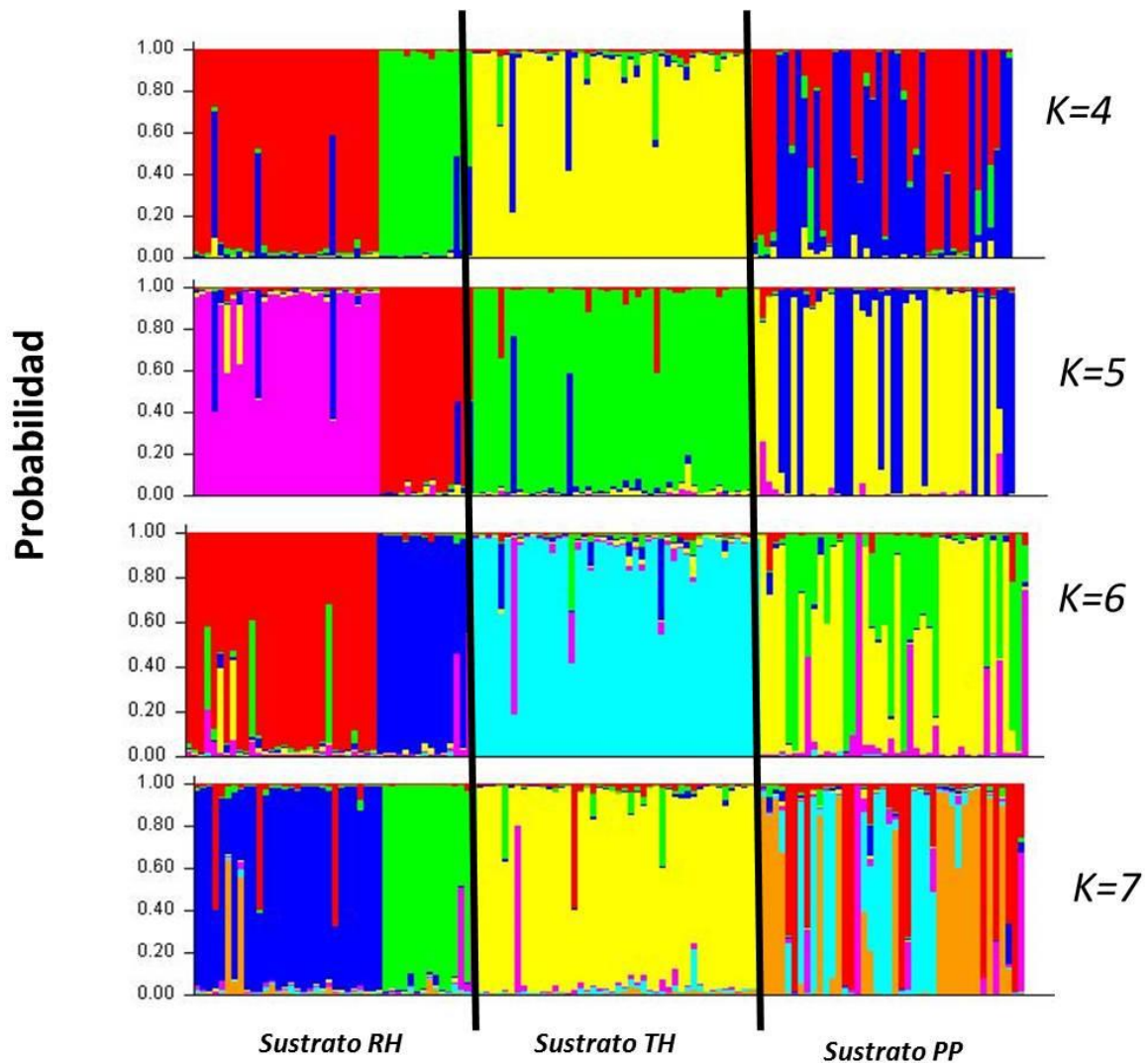


Figura 26. Análisis con el programa STRUCTURE, donde se muestran cuatro simulaciones ($K = 4$ a $K = 7$) para los tres sustratos (RH, TH y PP). En cada simulación (K) se presentan los grupos simulados con diferente color.

Summary of Simulations												
Parameter Set	Run Name	K	Ln P(D)	Var[LnP(D)]	α	Fst_1	Fst_2	Fst_3	Fst_4	Fst_5	Fst_6	Fst_7
Tenchulias	Tenchulias_run_2	2	-3966.9	404.4	0.1155	0.0125	0.5729	-	-	-	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_1	2	-3834.3	350.4	0.0451	0.1989	0.2422	-	-	-	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_4	3	-3582.9	664.0	0.0480	0.0925	0.3375	0.5760	-	-	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_3	3	-3542.9	597.1	0.0534	0.1005	0.5686	0.3366	-	-	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_6	4	-3283.9	555.7	0.0361	0.3476	0.1922	0.3218	0.6271	-	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_5	4	-3318.4	698.3	0.0462	0.1603	0.5520	0.6158	0.3413	-	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_8	5	-3069.9	599.5	0.0345	0.2573	0.3560	0.5643	0.6456	0.3160	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_7	5	-3091.6	640.6	0.0352	0.5536	0.3603	0.6458	0.2558	0.3158	-	-
Tenchulias	Tenchulias_run_9	6	-3045.1	685.3	0.0351	0.3300	0.6355	0.5805	0.2367	0.8434	0.3726	-
Tenchulias	Tenchulias_run_10	6	-2903.0	659.5	0.0334	0.2848	0.5779	0.3429	0.6605	0.3976	0.5528	-
Tenchulias	Tenchulias_run_12	7	-3013.7	752.9	0.0344	0.3797	0.5826	0.3138	0.2263	0.6731	0.3436	0.5073
Tenchulias	Tenchulias_run_11	7	-2951.8	670.3	0.0362	0.6984	0.6024	0.3435	0.3859	0.9324	0.4784	0.2174

Figura 27. Salida del programa STRUCTURE, que muestra todas las simulaciones incluidas.

Sin embargo, al comprobar el resultado con el programa Structure Harvester para inferir el número de grupos (K) que mejor representan los datos obtenidos con ISSR, se encontró que la simulación $K = 5$ es la más adecuada para el grupo de hortensias analizado. Esto concuerda con lo encontrado en el análisis de similitud y se muestra en los dendrogramas de las figuras 11, 16 y 21.

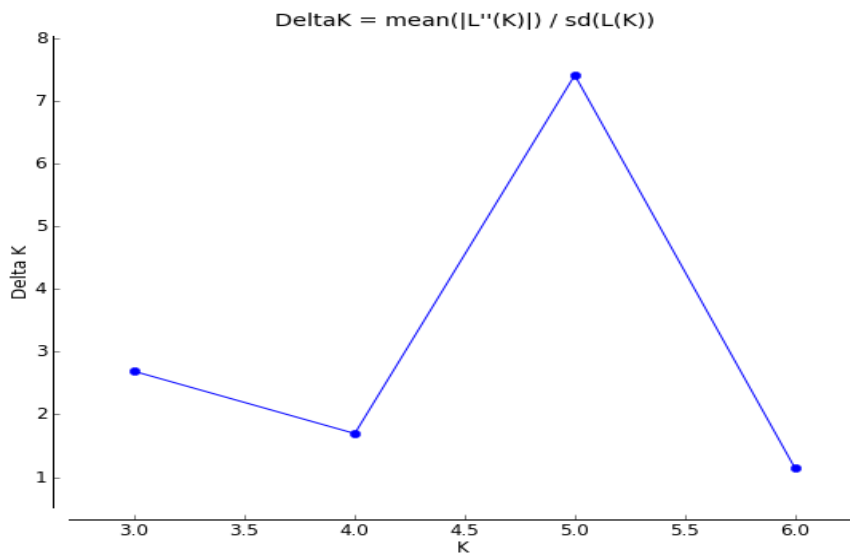


Figura 28. Gráfica producida con el programa Structure Harvester, donde se muestra el ajuste (Delta K) en la simulación que corresponde a cinco grupos genéticos ($K=5$).

La variabilidad genética encontrada en el presente trabajo, concuerda con lo reportado por Reed y Rinehart (2007), con respecto a diferentes genotipos y tamaños de genoma. Estos autores mencionaron que dentro del género

Hydrangea específicamente la especie *H. macrophylla* incluye un cultivar de nombre *macrophylla* y este se encuentra bien diferenciado de sus relativos *H. macrophylla* subsp. *serrata* y sus híbridos que fueron los únicos encontrados diploides ($2n=36$) encontrados entre 100 especies más de este género (Jones y col., 2007). Utilizando marcadores morfológicos y moleculares, estos autores propusieron separar en diferentes especies los individuos analizados que anteriormente fueron considerados cultivares o subespecies de *H. macrophylla* (Rinehart y col., 2006; Reed y Rinehart, 2007).

El marcador ISSR fue capaz de diferenciar las plantas de hortensia que se cultivaron en sustratos con diferentes pHs, lo cual puede deberse a que este marcador ha sido reportado con tendencia a la detección de cambios epigenéticos (Linacero y col., 2011; Over y Michaels, 2014; Niederhuth y Schmitz, 2014). Se ha reportado que es posible detectar a partir de un marcador aleatorio, algunos cambios epigenéticos observados en el fenotipo, tal es el caso del trabajo realizado por Demirkiran y col. (2013) en el cual se detectaron a partir de RAPD (Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico) efectos epigenéticos en cebada cultivada *in vitro*.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, proponen que, las hortensias incluidas pertenecen al menos a dos cultivares, dentro de los cuales se encuentra más de un genotipo. Un cultivar se define en el Código Internacional de Plantas Cultivadas, como un subgrupo seleccionado a partir de variedades tradicionales o por diferentes cruces que se consideran distintivas, homogéneas y estables (CINB, 2010). En las leyes sobre patentes se le denomina *variedad* (nombre en Derecho, no en Taxonomía, no confundir con el taxón variedad que está por debajo de especie) que es sinónimo de cultivar.

Lo anterior explica el rango diferencial de colores encontrados y la respuesta de cada genotipo o cultivar a expresar un color típico en diferentes rangos de pH.

V. CONCLUSIONES

- Es posible determinar con el marcador molecular ISSR un patrón de bandeo diferencial para cultivares de hortensia.
- Los resultados con el marcador ISSR permitieron asociar las plantas cultivadas en un mismo sustrato.
- El fenotipo color de hortensias, presentó un patrón diferencial correspondiente a la interacción del cultivar (genotipo) con el medio ambiente (pH).
- Fue posible determinar un patrón de variación de color por cultivar detectado.
- El marcador ISSR puede ser utilizado para iniciar detección de cambios epigenéticos en *Hydrangea macrophylla*.

IV. LITERATURA CITADA

- Clegg M. y M. Durbin. 2000. Flower color variation: A model for the experimental study of evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS*. 97(13):7016–7023
- Demirkiran, A., S. Marakli, A. Temel y N. Gozukirmizi. 2013. Genetic and epigenetic effects of salinity on in vitro growth of barley. *Genetics and Molecular Biology*. 36(4): 566-570.
- Bilder, R. M., F. Sabb, T. Cannon, E. London, J.D. Jentsch, S. Parker, R. Poldrack, C. Evans y N. Freimer. 2009. Phenomics: the systematic study of phenotypes on a genomewide scale. *Neurosciences*. 164(1): 30-42.
- CINB. 2010. Código Internacional de nomenclatura para plantas cultivadas. <http://es.glosbe.com/es/en/C%C3%B3digo%20Internacional%20de%20Nomenclatura%20para%20Plantas%20Cultivadas>. Consultado en mayo del 2014.
- Dent A., Earl y B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resource*. 4(2): 359-361.
- Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre 2007. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. México, D. F. 592 p.
- Faraco M., C.Spelt, M.Bliek, W.Verweij, A.Hoshino, Espen L., B. Prinsi, R. Jaarsma, E.Tarhan, A.De Boer, G.Di Sansebastiano, R. Koes y F. Quattrocchio. 2014. Hyperacidification of Vacuoles by the combined Action of Two Different P-ATPases in the Tonoplast Determines Flower Color. *Cell Reports*. 6: 32–43.
- Fujimoto R., T. Sasaki, R. Ishikawa, K. Osabe, T. Kawanabe, y E. Dennis. 2012. Molecular Mechanisms of Epigenetic Variation in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 9900-9922.
- Houle, D. R. Diddahally, R. Govindaraju y S. Omholt. 2010. Phenomics: The next Challenge. *Nature reviews. Genetics*. 11:855-866.
- Jones, K., S. Reed y T. Rinehart. 2007. Analysis of Ploidy Level and Its Effects on Guard Cell Length, Pollen Diameter, and Fertility in *Hydrangea macrophylla*. *HortScience* 42(3): 483-488.
- Linacero, R., J. Rueda, E. Esquivel, A. Bellido, A. Domingo y A. M. Vázquez. 2011. Genetic and epigenetic relationship in rye, *Secale cereale* L., somaclonal

- variation within somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant* 47: 618–628.
- Lu Y., L. Xie, y R. Zhang. 2012. Environmental Regulation of Floral Color. En P. Pontarotti (ed.), *Evolutionary Biology: Mechanisms and Trends*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 139-153.
- Martínez, M. 2003. Fundamentos y aplicaciones de la colorimetría diferencial. <http://web.ua.es/en/gvc/documentos/color/colour-differences-aido.pdf>. Consultado en mayo del 2014.
- McClintock, E. 1957. A monograph of the genus *Hydrangea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences PNAS*. 29: 147–256.
- Niederhuth C. y R. Schmitz. 2014. Covering Your Bases: Inheritance of DNA Methylation in Plant Genomes. *Molecular Plant*. 7(3): 472–480.
- Orozco, F. 2012. Establecimiento del protocolo de micropropagación de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Quito. Tesis de Licenciatura. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador. 95 p.
- Orozco-Obando W., G. N. Hirsch y H. Y. Wetzstein. 2005. Genotypic Variation in Flower Induction and Development in *Hydrangea macrophylla*. *HortScience*. 40(6): 1695–1698.
- Over R. y S. Michaels 2014. Open and Closed: The Roles of Linker Histones in Plants and Animals. *Molecular Plant*. 7(3): 481–491.
- Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure usin multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Reed S. M. y T. A. Rinehart. 2007. Simple Sequence Repeat Marker Analysis of Genetic Relationships within *Hydrangea macrophylla*. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 132(3): 341–351.
- Reif J.C., A. E. Melchinger y M. Frish. 2004. Genetical and Mathematical Properties of Similarity and Dissimilarity Coefficients Applied in Plant Breeding and Seed Bank Management. *Crop Science*. 45(1): 1-7.
- Rinehart, T., B. Scheffler y S. Redd. 2006. Genetic Diversity Estimates for the Genus *Hydrangea* and Delovelment of a Molecular Key Based on SSR. *Journal of American Society for Horticultural Science*. 131(6): 787-797.
- Saghai Maroof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., y Allard R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian

- inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of National Academy of Science. USA 83:1757-1761.
- Salisbury, R. 1992. Plant Physiology. 4° Edición. Wadsworth Publishing Company. California. 682 p.
- Sambook J. y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3ra edición. New York. 794 pp.
- Tanaka Y., F. Brugliera y S. Chandler 2009. Recent Progress of Flower Colour Modification by Biotechnology. International Journal of Molecular Sciences. 10: 5350-5369.
- Tanaka Y., N. Sasaki, y A. Ohmiya. 2008. Biosynthesis of Plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal. 54: 733–749.
- Universidad de la Rioja. 2012. La medida práctica del color. http://www.unirioja.es/cu/fede/color_de_vino/capitulo04.pdf. Consultado abril 2014.
- USDA-NSF. 2011. Phenomics: Genotype to Phenotype. A report of the Phenomics workshop. http://www.nsf.gov/bio/pubs/reports/phenomics_workshop_report. Consultado en abril 2014.
- X-Rite. 2002. Guía para entender la comunicación del color. X-Rite incorporated.
- Yoshida K., Y. Toyama-Kato, K. Kameda y T. Kondo. 2003. Sepal Color Variation of *Hydrangea macrophylla* and Vacuolar pH Measured with a Proton-Selective Microelectrode. Plant and Cell Physiology. 44(3): 262–268.

ANEXOS

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Protocolo de Saghai-Marroof y col. (1984)

1. Programar el baño maría a 60°C
2. Triturar 0.350 g de tejido con nitrógeno líquido en mortero con pistilo
3. Agregar 0.5 mL de amortiguador CTAB 2X y agitar hasta que la mezcla quede homogénea.
4. Transferir la mezcla a tubos eppendorff de 2 mL e incubar a 30 min a 60°C en baño maría.
5. Dejar enfriar por 10 min para que la mezcla regrese a temperatura ambiente.
6. Agregar un volumen igual de cloroformo octanol (24:1) e invertir los tubos continuamente por 5 min.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min.
8. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a un tubo limpio de eppendorf de 2 mL.
9. Repetir los pasos 6,7 y 8.
10. Agregar un volumen igual de alcohol isopropilico frio (-20°C) y mezclar por inversión hasta que el ADN se precipite.
11. Centrifugar a 5000 rpm durante 5 min. Decantar el isopropanol y agregar 1.0 mL de 76% EtOH/0.2M Na-acetato. Dejar el ADN en esta mezcla por 20 min. Agitar por 5 min antes de seguir con el paso 13.
12. Centrifugar 5000 rpm por 5 min.
13. Decantar el 76% EtOH/0.02 Na-acetato y agregar 0.5 mL de 76% EtOH/10mM NH₄-acetato. Dejar el ADN en esta mezcla por 1 min centrifugar de nuevo y luego decantar el 76% EtOH/10mM NH₄-acetato.
14. Agregar 50 µL de T.E.
15. Colocar a 4°C para que se resuspenda el ADN en la solución.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

2X CTAB 100 mL

Compuesto	Cantidad en volumen final 100 mL	Concentración final
Tris-HCl 1M pH 7.5	10 mL	100 mM
CTAB	2 g	2 %
NaCl 5 M	28 mL	700 mM
EDTA 0.5 M pH 7.5	4 mL	20 mM
β – mercaptoetanol *	1 mL	1 %
Bisulfito de sodio	1 g	1 %

Aforar con agua destilada a 100 mL.

*Añadir en el momento de usarlo.

76% EtOH/0.02 Na-acetato

Compuesto	Cantidad
Acetato de sodio	2.72 g
Etanol (EtOH) 95 %	80 mL
dH ₂ O	Aforar a 100 mL

76% EtOH/10mM NH₄-acetato

Compuesto	Cantidad
Acetato de amonio	0.077 g
Etanol (EtOH) 95 %	80 mL
dH ₂ O	Aforar a 100 mL

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS	4
ABREVIATURAS	6
RESUMEN.....	8
I. ANTECEDENTES.....	9
1.1 Características de <i>Hydrangea macrophylla</i> u hortensia.....	9
1.2 Bases bioquímicas del color de las flores.....	10
1.3 Color de las flores y pH vacuolar	13
1.4 Base genética de la variación del color de las flores	14
1.5 Monitoreo del genotipo de un organismo.....	18
1.6 Bases físicas para la descripción del color de las flores	19
1.7 Medida del color.....	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
2.1 Hipótesis	23
2.2 Objetivo general	24
2.3 Objetivos específicos.....	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 Material vegetal.....	25
3.2 Extracción del ADN	25
3.3 Registro de fenotipos	27
3.4 Análisis de datos.....	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
4.1 Extracción de ADN y amplificación por PCR para ISSR	28
4.2 Relaciones genéticas.....	29
4.3 Análisis de agrupamiento para hortensias cultivadas en el sustrato RH.	31
4.4 Análisis de agrupamiento para hortensias cultivadas en el sustrato PP.	34
4.5 Análisis de agrupamiento para hortensias cultivadas en el sustrato TH.	37
4.6 Estructura genética	40
V. CONCLUSIONES.....	43
IV. LITERATURA CITADA.....	44
ANEXOS	47
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	47
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	47