



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUS SAN LUIS POTOSÍ

POSTGRADO EN
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES

POLIMORFISMO GÉNÉTICO EN *Sechium P. Browne*, E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

María Isabel Iñiguez Luna

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México
SEPTIEMBRE, 2017



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECELLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe Maria Isabel Triguera Luna, alumno(a) de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del(la) Profesor(a) Dr. Jorge Cadena Triguera, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Polimorfismo genético en *Sacchara P. Browne*, E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución. El (la) Consejero (a) o Director (a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, a _____ de _____ de 2017.



Firma



Vo. Bo. Profesor(a) Consejero(a) o Director(a) de Tesis

La presente tesis, titulada: **POLIMORFISMO GÉNÉTICO EN *Sechium P. Browne*, E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA**, realizada por la alumna **María Isabel Iñiguez Luna**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada y aceptada por el mismo como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
INNOVACIÓN EN MANEJO DE RECURSOS NATURALES**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


Dr. Jorge Cadena Iñiguez
GRADO Y NOMBRE DEL PROFESOR

ASESOR:


Dr. Ramón Marcos Soto Hernández
GRADO Y NOMBRE DEL PROFESOR

ASESOR:


Dr. Francisco Javier Morales Flores Dr.
GRADO Y NOMBRE DEL PROFESOR

ASESOR:


Moisés A. Cortés Cruz
GRADO Y NOMBRE DEL PROFESOR

SALINAS DE HIDALGO, SAN LUIS POTOSÍ
SEPTIEMBRE, 2017

DEDICATORIA

A mis padres, Ramón y Teresa por ser ejemplos de vida, donde el esfuerzo y trabajo diario mantienen una mente sana y libre, gracias por el amor, apoyo y la formación dada en casa, es mi mejor preparación para conseguir metas que me permitan mejorar como persona.

A mis hermanos Antonio, Ramón, Octavio y Lizbeth por su apoyo incondicional, cariño por ser mis mejores amigos y cómplices, siempre alegres son la energía más pura que conozco.

A la familia Cadena Zamudio por todo el apoyo brindado con los brazos abiertos y por permitirme conocer la calidez y unión de su hogar.

A mis profesores Dr. Héctor Rangel Villalobos, Lic. Salvador Duarte Durán y Lic. Víctor Hugo Nahuatlato por exigirme en sus materias, que fueron claves para despertar una sed por el conocimiento.

A mis amigos por los momentos que han dejado o seguimos ganando, pero que me han permitido disfrutar la vida en distintos matices.

A Jorge David por siempre motivarme a vencer miedos, enseñarme a creer en uno mismo, por su paciencia, consejos y amor, gracias.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se realizó con la aportación económica de la sociedad que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), apoyaron mis estudios de maestría.

Al grupo interdisciplinario de Investigación en *Sechium edule* en México (GISeM), por facilitar el material biológico y la información requerida de manera oportuna y atenta.

Al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), y a la Japanese International Cooperation Agency (JICA) a través de proyecto SATREPS, por el apoyo financiero, acceso a las instalaciones y equipo de laboratorio para la realización de la fase experimental.

A los responsables y personal técnico del laboratorio de ADN y Genómicas por el trabajo en equipo, por la orientación y su amistad .

Al laboratorio de fitoquímica del Colegio de Postgraduados, y su personal técnico MC. Rubén San Miguel y Tec. Domingo, por la amable asesoría y facilidades de manejo de equipo para culminar la fase experimental.

A los miembros de mi consejo particular, al Dr. Jorge Cadena Iñiguez, Dr. Francisco Javier Morales Flores, Dr. Ramón Marcos Soto Hernández. Dr. Moisés Cortés Cruz, así como a MC. Marcos Daniel Martínez Peña, Lic. Blanca Amalía Amaro, Dr. Fernando de la Torre y a la Dra. Ryoko Machida Hirano, Dr. Kazuo N. Watanabe, por su total apoyo para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. Planteamiento del problema	2
3. Objetivos	2
4. Hipótesis.....	3
5. Antecedentes	3
6. Literatura citada	13
CAPÍTULO I. BIOPROSPECCIÓN DE VARIEDADES DE <i>Sechium</i> spp., PARA SELECCIÓN DE CARACTERES CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA; UNA REVISIÓN	22
1.1 Introducción	22
1.2 Materiales y Métodos.....	25
1.3 Criterios de selección.....	26
1.4 Resultados y discusión.....	29
1.5 Análisis multivariado	36
1.6 Conclusiones	43
1.7 Bibliografía	44
CAPÍTULO II. VARIABILIDAD GENÉTICA EN <i>Sechium</i> P. Browne (Cucurbitaceae) EVALUADA CON MARCADORES AFLP's.....	54
2.1 Introducción	55
2.2 Materiales y Métodos.....	57
2.3 Combinaciones de AFLP's	59
2.4 Resultados y discusión.....	60
2.5 Conclusiones	68
2.6 Literatura citada	70
CAPITULO III. PERFILES FITOQUÍMICOS DE GENOTIPOS CONTRASTANTES DE <i>Sechium</i> P. Browne.....	76
3.1 Introducción	76
3.2 Materiales y métodos	78
3.3 Proceso de extracción	79
3.4 Análisis genético.....	81

3.5 Análisis cladístico	83
3.6 Resultados y discusión	83
3.7 Conclusiones	98
3.8 Literatura citada	100
1. Discusión general.....	106
2. Conclusiones generales	106
3. Literatura citada	109

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Producción de chayote registrados en México durante el periodo 2000-2015.	6
2	Composición nutritiva de 100 g de órganos de chayote (Engels, 1983)	7
3	Efectos farmacológicos de <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Swartz (Cadena Iñiguez y Arévalo Galarza, 2011).	8
1.1	Publicaciones incluidas para el meta análisis bioprospectivo en <i>Sechium</i> spp.	27
1.2	Variables morfológicas, bioquímicas, de efectividad biológica y caracterización genética en <i>S. edule</i> , <i>S. chinantlense</i> , <i>S. compositum</i> para el análisis bioprospectivo	28
1.3	Caracteres apomórficos provenientes del Clado heurístico con variables morfológicas, bioquímicas y genéticas en diez genotipos de <i>Sechium</i> spp., La diagonal indica el caracter y su estado de caracter relevante.	32
1.4	Caracteres apomórficos y plesiomórficos identificados en las ramas del clado heurístico con base en variables morfológicas, bioquímicas y genéticas de diez genotipos de <i>Sechium</i> spp. La diagonal indica el caracter y su estado de caracter relevante.	34
1.5	Caracteres simplisiomórficos provenientes del clado heurístico generado a partir de variables morfológicas, bioquímicas y genéticas de diez genotipos de <i>Sechium</i> spp.	35
1.6	Valores característicos y su proporción acumulada para cinco primeros componentes principales del análisis de 229 variables morfológica, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica de frutos de diez genotipos de <i>Sechium</i> spp.	36
1.7	Vectores característicos del análisis de 229 variables morfológica, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica de frutos de diez genotipos de <i>Sechium</i> spp.	37
1.8	Principales bandas polimórficas tomadas de Cadena-Iñiguez, 2005, por su peso estadístico en cinco componentes principales (CP), del análisis de 229 variables morfológica, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica de fru-	37

	tos de diez genotipos de <i>Sechium</i> spp.	
2.1	Accesiones de <i>Sechium</i> P. Browne evaluadas mediante AFLPs procedentes del banco nacional de germoplasma.	58
2.2	Valores determinados en GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) y AFLPsurv (v1.0 Vekemans et al., 2002).	61
3.1	Características principales de las accesiones de <i>Sechium</i> P. Browne de sabor contrastante y tamaño de muestra para extracción química.	79
3.2	Análisis fisicoquímico de suelo del Banco Nacional de Germoplasma de <i>Sechium edule</i> en México. Valores de 25 submuestras; laboratorio de Edafología, Colegio de Postgraduados Cadena-Iñiguez, 2005.	79
3.3	Relación de peso fresco, seco y rendimiento porcentual de extractos crudos a partir de frutos en madurez hortícola de <i>Sechium</i> P. Browne de sabor contrastante.	84
3.4	Rendimiento de cucurbitacinas (mg g^{-1}) obtenido de frutos en madurez hortícola de sabor contrastantes de <i>Sechium</i> P. Browne.	85
3.5	Contenido de flavonoides (mg g^{-1}) obtenido de frutos en madurez hortícola de sabor contrastantes de <i>Sechium</i> P. Browne.	86
3.6	Contenido de flavonoides (mg g^{-1}) obtenido de frutos en madurez hortícola de sabor contrastantes de <i>Sechium</i> P. Browne.	89
3.7	Concentración media de cucurbitacinas relacionada con el sabor del fruto de genotipos de <i>Sechium</i> P. Browne.	96
3.8	Concentración media de flavonoides relacionados con el sabor del fruto de genotipos de <i>Sechium</i> P. Browne.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Grupos varietales de <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Sw.	5
2	Biosíntesis de las cucurbitacinas, clorofilas y carotenoides a partir de la ruta del Ácido Mevalónico (Bramley, 1997).	9
1.1	Cladograma de tres especies de <i>Sechium</i> P. browne, por caracteres morfológicos, bioquímicos, genéticos y actividad biológica en líneas celulares malignas.	31
1.2	Dendrograma a partir del coeficiente de asociación o similitud, con el programa NTSYSpc (Sneath and Sokal, 1973) con base en 229 variables multi estado morfológicas, bioquímicas, genéticas y actividad biológica de frutos de diez genotipos de <i>Sechium</i> spp.	40
2.1	Distribución de coordenadas principales (GenAIEx 6.5) de 95 accesiones de <i>Sechium</i> P. Browne con la combinación de AFLP's Cat.	63
2.2	Árbol Neighbor-joining de 95 accesiones de genotipos domesticados y silvestres de <i>Sechium</i> . Elaborado con MEGA versión 7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016).	66
3.1	Cromoplacas para cucurbitacinas y flavonoides de nueve extractos de fruto en madurez hortícola de <i>Sechium</i> P. Browne	84
3.2	Cladograma con nueve genotipos de <i>Sechium</i> , con valores de perfil fitoquímico (cucurbitacinas y flavonoides), así como, bandas polimórficas AFLP's con la combinación Eco RI ACC y MseI CAT.	87
3.3	Morfotipos de <i>Sechium</i> P. Browne evaluados.	88
3.4	Cromatogramas a partir de HPLC, para identificación de cucurbitacinas en frutos de <i>S. edule</i> , var. <i>albus levis</i> (A y B), y var. <i>albus minor</i> (C).	90
3.5	. Cromatogramas a partir de HPLC, para identificación de cucurbitacinas en frutos de <i>S. edule</i> , var. <i>nigrum minor</i> (D), var. <i>virens levis</i> (E) y var. <i>nigrum xalapensis</i> (F).	91
3.6	Cromatogramas a partir de HPLC, para identificación de cucurbitacinas en frutos de <i>S. compositum</i> (G, H), y <i>Sechium edule</i> (I).	92
3.7	Cromatogramas a partir de HPLC, para identificación de flavonoides en frutos de <i>S. edule</i> var. <i>albus levis</i> (J, K), y var. <i>albus minor</i> (L).	93
3.8	Cromatogramas a partir de HPLC, para identificación de flavonoides en frutos de <i>S. edule</i> , var. <i>nigrum minor</i> (M), var. <i>virens levis</i> (L) y var. <i>nigrum xalapensis</i> (O).	94
3.9	Cromatogramas a partir de HPLC, para identificación de flavonoides en frutos de <i>S. compositum</i> (P, Q), y <i>Sechium edule</i> (R).	95

POLIMORFISMO GÉNÉTICO EN *Sechium* P. Browne, E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

IÑIGUEZ LUNA MARIA ISABEL, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN GENERAL

Es trabajo presenta una revisión sistemática como meta análisis de la información generada en torno a tres especies de *Sechium* P. Browne, que reportan actividad biológica funcional contra líneas cancerígenas. Se concentraron variables morfológicas, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica relevantes de investigaciones individuales para un análisis de asociación con enfoque cladístico y multivariado, para identificar caracteres que mostraran relevancia asociada a actividad antineoplásica. Dada la extensa diversidad taxonómica reportada en *Sechium* y en el interés de generar variantes con aprovechamiento farmacológico, se optó por realizar una evaluación de la diversidad genética en accesiones del banco de germoplasma de *S. edule* (BANGESe) mediante marcadores moleculares dominantes evaluando tres poblaciones de acuerdo a características morfológicas y organolépticas de frutos de chayote. Con base a la variación determinada con AFLP'S se seleccionaron aquellos materiales biológicos representativos por población de acuerdo al sabor dulce, neutro y amargo, para identificar perfiles fitoquímicos de metabolitos secundarios con evidencia científica de su acción antiproliferativa, de este modo se corroboraron variables morfológicas y fitoquímicas principalmente, como características que describen a los genotipos evaluados y donde la interacción genética es estrecha entre las especies *S. edule*, *S. compositum* y *S. chinantlense*. Con los datos moleculares se reveló que la variación fenotípica de chayotes se debe principalmente a proceso de domesticación y plasticidad, además que no existen aún barreras naturales para el diseño de cruzamientos entre genotipos. Las poblaciones evaluadas de las tres especies, representan un pool genético que puede ampliar la gama de variantes de *Sechium* con aprovechamiento para el desarrollo de suplementos naturales antineoplásicos.

Palabras clave: Diversidad, *Sechium*, antiproliferativa, morfológico, fitoquímico

GÉNÉTIC POLYMORPHISM IN *Sechium* P. Browne, AND IDENTIFICATION OF METABOLITES WITH BIOLOGICAL ACTIVITY

IÑIGUEZ LUNA MARIA ISABEL, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

Abstract

This work presents a systematic review as meta analysis of the information generated around three species of *Sechium* P. Browne, which report functional biological activity against cancerous lines. Relevant morphological, biochemical, genetic and biological activity variables from individual investigations were analyzed for association analysis with a cladistic and multivariate approach to identify characters that showed relevance associated with antineoplastic activity, identifying the character and their status in a phylogenetic tree. Given the extensive taxonomic diversity reported in *Sechium* and in the interest of generating variants with pharmacological use, it was decided to carry out an evaluation of the genetic diversity in accessions of the germplasm bank of *S. edule* (BANGESe) using dominant molecular markers considering a sample that comprised three populations according to morphological and organoleptic characteristics of chayote fruits. Based on the variation determined with AFLP'S, representative biological materials were selected by population according to sweet, neutral and bitter taste, to identify phytochemical profiles of secondary metabolites with scientific evidence of their antiproliferative action, thus corroborating morphological variables and phytochemicals mainly as characteristics that describe the evaluated genotypes and where it is evident that the genetic interaction is close between the species *S. edule*, *S. compositum* and *S. chinantlense*. With the molecular data it was revealed that the phenotypic variation of chayotes is mainly due to the process of domestication and plasticity, besides that there are not yet natural barriers for the design of crosses between genotypes, with different interest to the food. The evaluated populations of the three species evaluated represent a genetic pool that can expand the range of variants of *Sechium* with use for the development of natural antineoplastic supplements.

Key words: Diversity, *Sechium*, antiproliferative, morphological, phytochemical

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México se estima que 4,000 especies de plantas con flores cuentan con propiedades curativas. Sin embargo, solamente al 5% de éstas se les ha realizado una la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen (Villaseñor 2016; Ocegueda *et al.*, 2005). Palma-Tenango *et al.* (2017) resalta que existe un incremento de interés dentro de la medicina tradicional, la cual emplea plantas como alternativa sostenible ante diversas enfermedades (Shoeb, 2006), generando un conocimiento que se ha transmitido de forma empírica por generaciones (Estrada *et al.*, 1995), que incluye entre muchas otras aplicaciones la administración de preparaciones tradicionales a través de cataplasmas, mezclas, polvos secos, aceites, infusiones (Pijoan, 2003), o como principios activos puros (Farnsworth *et al.*, 1992). Las plantas contienen una extensa diversidad fitoquímica, cuyas características responden a condiciones metabólicas, interacciones climáticas, estados fenológicos y expresión genética que los individuos contienen. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004) las plantas son utilizadas por al menos el 80% de la población mundial, que busca satisfacer o complementar necesidades médicas, y se calcula que anualmente a nivel mundial se facturan 60,000 millones de dólares por concepto de comercialización de medicinas de patente elaboradas con plantas medicinales. (Ocegueda *et al.*, 2005). De las plantas domesticadas en Mesoamérica (Newstrom, 1986; Lira, 1999), resalta la familia Cucurbitaceae (Ortega-Paczka *et al.*, 1998) por su potencial de investigación con fines medicinales (Cadena-Iñiguez, 2005), y dentro de ésta, al género *Sechium* P. Browne, constituido por diez especies; de las cuales, la más estudiada es *S. edule* (Jacq.) Swartz, conocida como chayotes, representada por una amplia variación biológica con usos alimenticio y medicinal (Hernández, 1985; Lira-Saade, 1996). Autores como Siliciliano *et al.* (2004), Cadena Iñiguez (2005; 2007; 2010), Monroy *et al.* (2009), Riviello (2015), Salazar (2016), y Aguiñiga-Sánchez (2017), reportan para *S. edule*, amplia diversidad fitoquímica relacionada directamente con actividad biológica con fines terapéuticos. Otros autores reportan aplicaciones en problemas cardiovasculares (Neeraja *et al.*, 2015), inflamatorios y renales (Salama *et al.*, 1986), actividad antioxidante (Aguiñiga-Sánchez, 2016, Ordoñez *et al.*, 2006), hepato protector (Kamble *et al.*, 2008) y actividad antiproliferativa (Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013; Monroy *et al.*, 2009). Esta gama de compuestos bioactivos y actividades biológicas demandan la aplicación de diversos análisis cuya finalidad es adquirir un mayor conocimiento en función de su mejor aprovechamiento (Shoeb,

2006); donde la aplicación, integración y revisión sistemática de los trabajos realizados alrededor del cultivo *Sechium* sp., puede sugerir enfoques bioprospectivos.

2. Planteamiento del problema

Existen evidencias de que los tipos biológicos de chayote (*Sechium spp.*) contienen diversidad de metabolitos secundarios en concentraciones distintas (Aguñiga-Sánchez, 2017; Riviello, 2015, Cadena-Iñiguez, 2005), atribuidos a su plasticidad según las condiciones climáticas en las que se encuentren (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007). Lo anterior ha sido aprovechado para desarrollar programas de mejoramiento genético con el fin de obtener nuevas variantes biológicas que registren cualidades de aprovechamiento diferente al uso alimentario, tales como, actividad biológica en líneas celulares malignas (Aguñiga-Sánchez, 2017; Salazar-Aguilar, 2016), o bien, para desarrollo de suplementos alimenticios con características nutraceuticas por la presencia de metabolitos funcionales (Riviello-Flores, 2015); sin embargo, no se han estudiado la relación entre la expresión genética de los tipos biológicos de chayote con los metabolitos secundarios de interés farmacológico. Es importante la identificación de materiales con actividades biológicas funcionales benéficas reduciendo posibles efectos no deseables, donde las concentraciones altas de ciertos metabolitos pueden causar efectos negativos en los consumidores (Palma-Tenango *et al.*, 2017). Se cuenta con información acerca de que las variedades de frutos amarillos, registran hasta cien veces menos contenido de metabolitos de interés funcional que las variedades de frutos verdes comestibles, y hasta mil veces menos contenido que los híbridos de frutos verdes y de sabor amargo (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, se consideró relevante realizar una caracterización genética con el apoyo de una determinación polimórfica en variantes biológicas contrastantes de chayote de las especies *S. edule* y *S. compositum*, además de una determinación fitoquímica considerando los metabolitos de reportados con actividad biológica funcional con fines terapéuticos.

3. Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificar y describir las variables principales de caracterización genética, bioquímica y morfológica de manera bioprospectiva que permitan diseñar nuevos genotipos de variantes

biológicas de *Sechium* P. Browne y que sea, la base de una metodología de mejoramiento genético, con el fin de obtener nuevas variedades con caracteres de interés farmacológico.

2.2. Objetivos particulares

- i. Relacionar los caracteres morfológicos distintivos del fruto, principales metabolitos secundarios identificados con la actividad funcional en variantes biológicas de *Sechium* P. Browne, y bandas polimórficas mediante un enfoque cladístico para identificar su posible causalidad.
- ii. Identificar los caracteres morfológicos, fitoquímicos, genéticos y de actividad funcional, a través de un análisis cladístico, susceptibles de ser considerados en actividades de mejoramiento genético de variantes biológicas contrastantes de *Sechium* P. Browne.

4. Hipótesis

- i. Existen diferencias morfológicas, genéticas y bioquímicas entre las variantes biológicas de *Sechium* P. Browne, que modifican la expresión en cantidad y diversidad de metabolitos secundarios y por ende su actividad biológica funcional.
- ii. Es posible identificar variables sobresalientes para el desarrollo de rutas de mejoramiento genético de variantes biológicas de *Sechium* P. Browne, para la obtención de nuevos tipos biológicos, a través de la relación de caracteres morfológicos, bioquímicos, genéticos y de actividad biológica funcional.

5. Antecedentes

4.1. Descripción general del género *Sechium* P. Browne

4.1.1. Origen y distribución

El género *Sechium* P. Browne se distribuye en las zonas altas de Mesoamérica entre los 500 y 1500 m de altitud, localizados en el centro y sur de México, norte de Guatemala, sur de Nicaragua, oeste de Panamá y gran parte de Costa Rica (Vavilov 1992). Dentro del género se ubican diez especies, de las cuales: ocho son silvestres (*S. chinantlense*, *S. compositum*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, *S. vilosum*), y dos cultivadas *Sechium edule*

y *Sechium tacaco* (Pitt.) C Jeffrey (Lira, 1996). El principal aprovechamiento radica en el uso alimentario, empleando los frutos de ambas especies y la raíz de la primera que forman parte de la dieta de diversas culturas desde tiempos precolombinos (Hernández, 1985; Lira-Saade, 1996). México es centro de origen y domesticación de *S. edule* y cuenta dentro de su distribución a tres silvestres *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. hintonii*. La diversidad biológica reportada es amplia concentrándose en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Lira-Saade, 1996; Ortega-Paczka *et al.*, 1998), y su mayor expresión de variación se aprecia en frutos de diferente forma, tamaño, color, sabor y textura; también en la forma y venación de las hojas, color del pecíolo, guías y tamaño de flor (Cadena-Iñiguez, 2005). Se ha evaluado la variación morfológica y anatómica de frutos y hojas de chayote, relacionando la variación anatómica y morfológica a especialización adaptativa a diferentes ambientes (Cadena *et al.*, 2008; Pardo, 2003).

4.1.2. Taxonomía y grupos varietales

De acuerdo con Lira (1996), la taxonomía de *S. edule* es la siguiente:

Reino: Plantae
División: Spermatophyta
Subdivisión: Angiospermae
Clase: Dicotyledonae
Subclase: Metachlamideae
Orden: Cucurbitales
Familia: Cucurbitaceae
Género: *Sechium* P. Browne
Especie: *Sechium edule* (Jacq.) Swartz

Recientemente la variación morfológica de *S. edule*, como la especie de mayor importancia socioeconómica, ha sido clasificada en 12 grupos varietales (**Figura 1**).

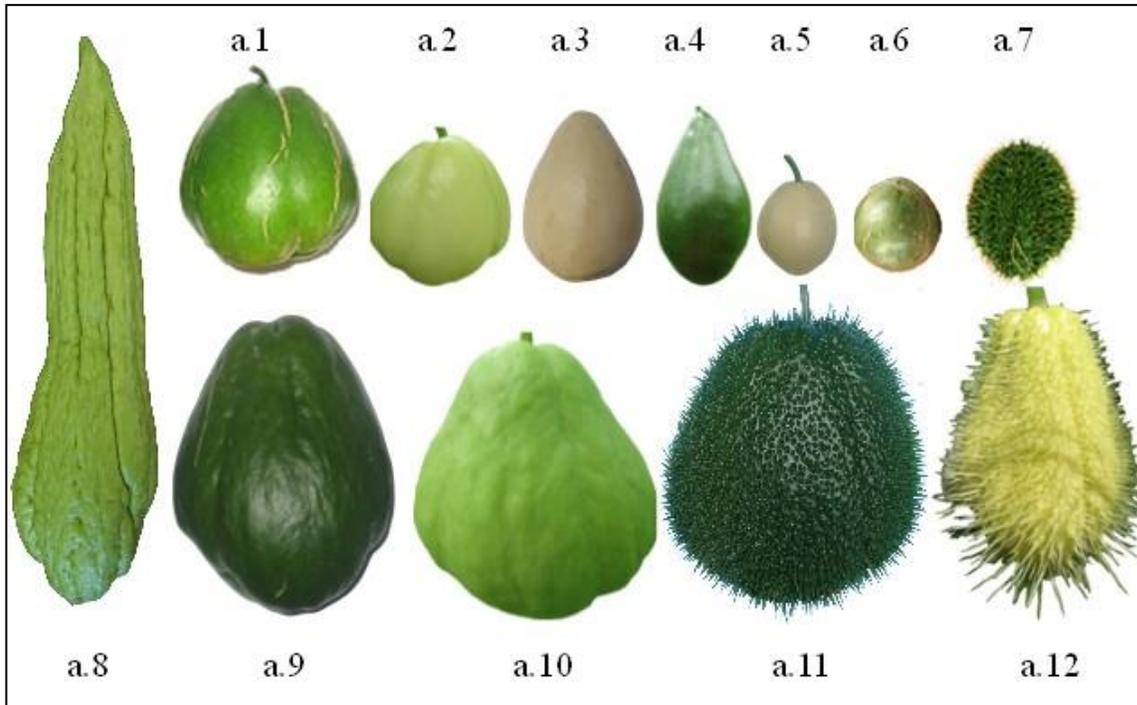


Figura 1. Grupos varietales de *Sechium edule* (Jacq.) Sw.: (a1) *nigrum levis*, (a2) *albus levis*, (a3) *albus dulcis*, (a4) *nigrum conus*, (a5) *albus minor*, (a6) *nigrum minor*, (a7) *Sechium edule silvestre*, (a8) *nigrum máxima*, (a9) *nigrum xalapensis*, (a10) *virens levis*, (a11) *nigrum spinosum*, (a12) *albus spinosum* (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008).

4.1.3. Importancia socioeconómica

Actualmente, el chayote se distribuye en los cinco continentes, puesto que en los últimos 30 años esta especie ha prosperado de hortaliza de traspatio a producto de exportación, (Flores, 1989; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2001). La comercialización de chayote a gran escala tanto nacional como internacional recae en un tipo llamado verde liso, donde los principales países productores de chayote además de México, son Costa Rica, Guatemala, Brasil, Estados Unidos, Argelia, India, Nueva Zelanda y Australia. En México, los estados que tienen una producción importante de chayote para el mercado son: Puebla, Michoacán, Estado de México, Jalisco y Veracruz, donde este último es el principal productor nacional con el 81% de la producción total y una superficie sembrada de 1,976 ha en el 2013. Veracruz produce todo el año, ya que ha ampliado el corredor de cultivo en tres regiones agroclimáticas, con la zona de mayor producción ubicada en los

municipios de Coscomatepec, Huatusco, Ixhuatlán del Café, Chocamán, Tlilapan, Orizaba, Rafael Delgado, Amatlán de los Reyes, e Ixtaczoquitlán (Cadena *et al.*, 2010). De acuerdo con el análisis de la producción de chayote reportado por SIAP (2017) para el periodo 2000-2015, la mayor producción se registró en el año 2011, aumentando en más del 20% respecto al 2010; y, desde ese año, se ha mantenido con pocas fluctuaciones, reportando rendimientos promedio de 57.24 t ha⁻¹ (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Producción de chayote registrados en México durante el periodo 2000-2015.

Año	Superficie sembrada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (t)	Rendimiento (t ha ⁻¹)	PMR (\$ t ⁻¹)	Valor Producción (miles de pesos)
2000	1,936.00	1,921.00	118,791.80	61.84	1,437.98	170,820.03
2001	1,361.94	1,359.94	88,526.86	65.1	1,541.67	136,479.58
2002	1,881.25	1,874.25	118,729.00	63.35	1,735.59	206,065.09
2003	1,746.75	1,532.25	95,957.25	62.62	1,793.54	172,102.88
2004	1,841.75	1,454.75	88,264.43	60.67	1,843.87	162,747.86
2005	1,814.00	1,814.00	101,263.00	55.82	1,486.82	150,559.50
2006	1,898.90	1,898.50	111,131.50	58.54	1,870.18	207,836.10
2007	1749	1418	92813	65.45	1833.16	170141.5
2008	2,165.50	2,164.50	133,725.95	61.78	2,068.98	276,676.96
2009	2,156.00	2,146.00	135,215.96	63.01	2,033.16	274,916.32
2010	2,186.50	2,069.50	134,837.11	65.15	2,501.82	337,338.34
2011	2547.5	2547.5	169475.63	66.53	2225.69	377200.42
2012	2421.12	2419.12	153094.96	63.28	2400.74	367541.6
2013	2,353.34	2,353.34	155,491.32	66.07	2,658.92	413,438.45
2014	2,420.36	2,416.46	155,685.48	64.43	2,971.52	462,622.97
2015	2,420.36	2,416.46	155,685.48	64.43	2,971.52	462,622.97

PMR: Precio Medio Rural (pesos por tonelada) (SIAP, 2017).

En el ámbito comercial, el cultivo de chayote evolucionó de hortaliza de traspatio a producto de exportación con amplia demanda en Estados Unidos y Canadá, lo que le ha ubicado dentro de las hortalizas no tradicionales de mayor importancia que exporta México (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2001). La importancia social está relacionada con la mano de obra que demanda, puesto que en una huerta comercial de 30 ha se emplean de 89 personas durante todo el año (Grupo productor de chayote JV, comunicación personal; GISeM, 2008).

4.1.4. Propiedades y composición bromatológica de *S. edule*

El consumo de frutos como el chayote en la dieta humana es de vital importancia por el aporte de vitaminas, minerales, fibra, agua y otros nutrimentos, además de la satisfacción de consumir un producto de características sensoriales tan variadas y agradables (Camacho, 2002). El chayote es un ingrediente común en la gastronomía mexicana, actualmente su consumo tiene gran demanda, debido a sus propiedades nutrimentales, que lo hacen ser una hortaliza que se incluye en la mayor parte de dietas (**Cuadro 2**), por ser un alimento alto en fibra, bajo en calorías, sin colesterol, además de que el fruto y semilla contienen aminoácidos (lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, valina, isoleucina, serina, alanina y tirosina) (Flores, 1989; Gamboa, 2005). La fruta es la parte de la planta que más se consume, su alto contenido de agua la convierte en una fruta dietética y una fuente de minerales y vitaminas. En el fruto, los macronutrientes y micronutrientes disminuyen conforme crece, no obstante, cerca de la germinación el almidón aumentan. La sacarosa es alta en los primeros estadios del crecimiento del fruto y disminuye con el aumento de su tamaño; en cambio la raíz tuberosa tiene alto valor alimenticio por su contenido de carbohidratos (Gamboa, 2005).

Cuadro 2. Composición nutritiva de 100 g de órganos de chayote (Engels, 1983).

Compuesto	Fruto	Brotes	Raíz
Agua (%)	98.8	89.7	79.7
Carbohidratos (g)	7.7	2.7	17.8
Proteína (g)	0.9	4	2
Lípidos (g)	0.2	0.4	0.2
Calcio (mg)	12	58	7
Fosforo (mg)	30	108	34
Hierro (mg)	0.6	2.5	0.8
Vitamina A (UI)	5	615	---
Tiamina (mg)	0.03	0.08	0.5
Rivoflavina (mg)	0.04	0.18	0.03
Niacina (mg)	0.4	1.1	0.9
Ácido Ascórbico (mg)	20	16	10
Valor energético (cal)	30	60	79

El uso principal del chayote es el alimenticio (Lira, 1996) centrándose en el fruto que se consume generalmente hervidos con sal o azúcar, agregándose a diferentes guisos, caldos y sopas; también se comen fritos, asados, cocidos al vapor o en horno a semejanza de las papas. El

fruto también es utilizado por la industria para la elaboración de alimentos infantiles, salsas y pastas. Los tallos duros y fibrosos, son la única parte de la planta que no se consume (Cadena-Iñiguez y Arévalo-Galarza, 2011). Diversas investigaciones científicas realizadas en torno *S. edule* han revelado actividad diurética (Jensen y Lai, 1986), antiinflamatoria e hipotensora, incluso como coadyuvante en la eliminación de cálculos renales. El chayote se utiliza como complemento en el tratamiento de arteriosclerosis e hipertensión, alivia la inflamación intestinal y cutánea, además de favorecer la cauterización de úlceras (Diré *et al.*, 2003) entre otros principales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos terapéuticos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cadena Iñiguez y Arévalo Galarza, 2011).

Tipo de extracto	Efecto	Fuente
Extracto metanólico	Antiinflamatorio cardiotónico	Salama <i>et al.</i> , 1986
β -sitosterol- β -D-glucopiranosido estigmas- terol- β -D- glucopiranosido	Antiinflamatorio	Salama, <i>et al.</i> , 1987.
Proteína “sechiumina” de extracto acuoso de semilla	Inactivación ribosomal Agente quimioterapéutico	Wu <i>et al.</i> , 1998
Extractos metanólico y acuoso	Antioxidante	Ordoñez <i>et al.</i> , 2006
Extractos crudos de ocho tipos biológicos	Antiproliferativo sobre L929 y P- 388	Cadena-Iñiguez <i>et al.</i> , 2005, 2007; 2013

4.2. Metabolismo en plantas

Se considera metabolismo a toda aquella reacción química que ocurre dentro del organismo con la síntesis o degradación de una molécula aprovechable para las funciones de la planta, estas moléculas se les conoce como metabolitos los cuales presentan diferencias en concentración y calidad siendo dependientes de diversos factores, tales como la edad del organismo, clima, época del año, tipo de suelo y humedad, entre otros. Una sola planta puede contener una amplia diversidad de principios activos, mostrando la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza (Ocegueda *et al.*, 2005; Ávalos y Urría, 2009). Las plantas también realizan la síntesis de metabolitos secundarios que no presentan una función definida en los procesos esenciales, pero participan indirectamente en la supervivencia, reproducción y protección de la planta. Estos compuestos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en

pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. La clasificación de los metabolitos secundarios se encuentra generalizada en cuatro grupos principales: compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignanos y taninos), glicósidos (Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos), terpenos (hormonas, pigmentos o aceites esenciales) y alcaloides (Ávalos y Urria, 2009). Los terpenos conforman el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40,000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y se forman por la unión de unidades de isopreno y se llama de acuerdo al número de unidades que los conforman generalmente por cinco átomos de carbono, es decir los triterpenos tienen seis unidades de isopreno con un total de treinta carbonos; y los terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial ya que, proporcionan caracteres como color, olor y sabor dentro de las plantas atrayendo el mercado alimentario, agrícola, cosmética y farmacéutico (Ávalos y Urria, 2009).4

4.3. Biosíntesis de metabolitos secundarios

La síntesis de los metabolitos secundarios en cucurbitáceas es la ruta metabólica del Ácido Mevalónico (AMV), (Figura 2).

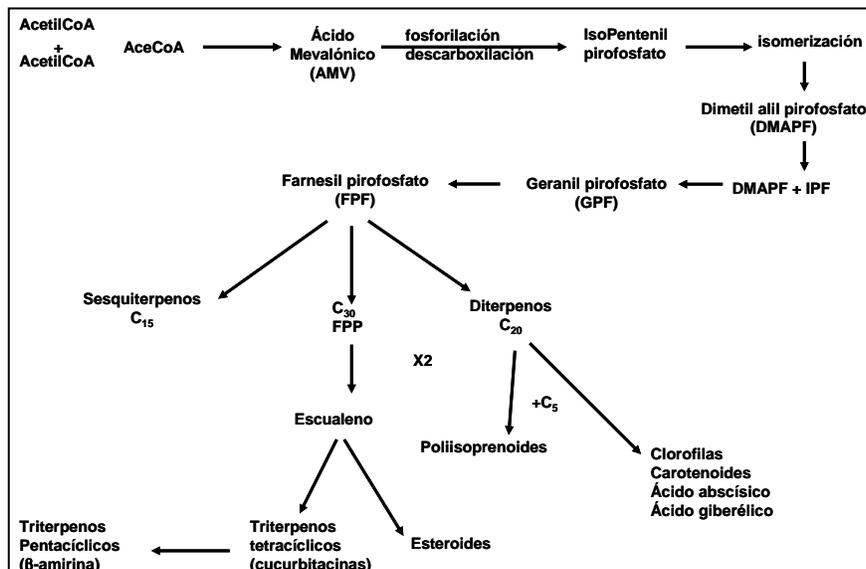


Figura 2. Biosíntesis de las cucurbitacinas, clorofilas y carotenoides a partir de la ruta del Ácido Mevalónico (Bramley, 1997).

En general, todos los compuestos terpenoides naturales como las cucurbitacinas, clorofilas y carotenoides, se biosintetizan por la ruta de la acetil coenzima a través de un intermediario común que es el AMV (Bramley, 1997). La ruta biogenética se inicia por condensación de dos moléculas de Acetil Coenzima, dando acetoacetil-CoA (AcCoA), la cual se condensa a su vez con otra molécula de AcCoA, originando 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Este compuesto, se reduce para convertirse en ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriánico), y posteriormente por fosforilación y descarboxilación en isopentenilpirofosfato (IPF), el cual, por isomerización, da lugar a dimetilalil-pirofosfato (DAMPF), compuesto altamente reactivo. El acoplamiento a DAMPF de nuevas unidades de IPF, origina al geranil pirofosfato (GPF), incrementándose el número de carbonos de cinco en cinco, formando a los diterpenos, tales como las clorofilas, carotenoides, y triterpenos, tales como las cucurbitacinas (Bramley, 1997). Estudios realizados en *Cucumis sativum*, demostraron que en la ruta metabólica de las cucurbitacinas y de otros compuestos de defensa de las plantas, las unidades isoprenicas como precursores similares fueron compartidas, de tal forma, que si la planta requería elaborar en mayor cantidad un metabolito, utiliza las unidades isoprenicas existentes reduciendo la síntesis de otros compuestos (Balliano *et al.*, 1982).

4.4. Curcubitacinas y su actividad biológica funcional

Las curcubitacinas han sido aisladas de diferentes especies de plantas (Abdullah, 2013), son triterpenos tetracíclicos (Soto-Hernández *et al.*, 2015), en la especie de *S. edule* se les consideran los metabolitos responsables del sabor amargo en los frutos están presentes en forma de glucósidos y estos muestran variación de su concentración dentro de la especie; y en el caso de los frutos de chayotes de *S. edule*, esta variación observada se atribuye a proceso de coevolución con el humano, quien es el responsable de la distribución y sometimiento de la especie a diferentes ambientes que de cierto modo han modificado las rutas de síntesis ajustando la ruta de AMV (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007a). Estos metabolitos son generalmente sustancias toxicas, a las que se les atribuye actividad antineoplásica (Anonimo, 1996), y en el caso de las curcubitacinas se dividen en veinte

grupos que se clasifican desde curcubitacinas A hasta curcubitacinas T (Soto-Hernández *et al.*, 2015), y muchas han demostrado tener potente actividad biológica con selectividad a células blanco actuando como citotóxico, con resultados antitumorales, protección hepática, anti-inflamatorios, antimicrobianas, antihelmíntico, cardiovascular y efectos antidiabéticos (Clericucio *et al.*, 2013), (Escandel *et al.*, 2007), (Recio *et al.*, 2004). Otros estudios revelan funciones en la planta como regulador de crecimiento y repelente frente insectos. Se ha demostrado que a un nivel molecular las curcubitacinas tienen un papel de inhibición ante la ruta JAK/STAT3, considerada como la ruta más importantes ante la oncogénesis, aunque el mecanismo de acción de las curcubitacinas frente a células cancerígenas no está del todo claro (Soto-Hernández *et al.*, 2015).

4.5. Flavonoides y su actividad biológica funcional

Otros metabolitos importantes reportados para frutos de *Sechium P. Browne*, son los flavonoides. El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano, que se originan mediante una ruta biosintética mixta ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos (Lopez, 2017) los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos (Cartaya *et al.*, 2001). Los flavonoides, son grupo de metabolitos secundarios derivados de plantas, como compuestos con potente actividad antioxidante previniendo en daño causado por los radicales libres por muchos mecanismos diversos (Procházková *et al.*, 2011). Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆-C₃-C₆, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (Cartaya *et al.*, 2001). Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres (Bahor *et al.*, 1999; Baker *et al.*, 1995). Se han notificado más de 6000 flavonoides (Harborne, 2000) y se han subdividido en clases que incluyen flavonoles, flavonas, flavanoles y antocianinas, de acuerdo con el nivel de oxidación del anillo C y la posición del anillo B (2, 3), la naturaleza de las sustituciones (hidroxilo, metilo, glicosilo), combinación, grado de polimerización, y enlaces entre las unidades básicas (Loic-Lepinie *et al.*, 2006). Benaventarga (1997), describe distintas actividades biológicas reportadas de los flavonoides, tales como antioxidante (Bors *et al.*, 1990 a,b), antilipoperoxidante

(Wang y Zheng, 1992), antimicrobiana (Kaul et al., 1985), antimutagénicos (Stapleton y Walbot, 1994), antiproliferativos (Deschener et al., 1993) e inhibición de la invasión de células cancerígenas (Bracke *et al.*, 1989) entre otras actividades señaladas.

4.6. Técnicas moleculares y su aplicación

La familia de Cucurbitaceae es considerada dentro de las más amplias y diversas cuentan con un total de 130 géneros y unas 800 especies (Jeffrey, 2005). Las herramientas que se están convirtiendo en imprescindibles para modernizar la mejora de hortalizas son mapas físicos y genéticos de alta densidad (Shirasawa *et al.*, 2010), bajo la constante de buscar nuevas poblaciones con mayor eficiencia; las cuales, se emplean para el mapeo de características cuantitativas (Esteras-Gómez, 2012); donde resultan puntos fundamentales la caracterización de la variabilidad a escala genómica, el desarrollo de poblaciones y líneas de pre-mejora, la selección asistida por marcadores y la disección génica de características cuantitativas, aportando apoyo directo en los programas de mejora (Grewal *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2012). Existen marcadores de tipo codominante y dominante como los (AFLP), aunque ciertamente resultan ser una técnica laboriosa, pero han resultado ser fiables en comparación de otros marcadores como RAPD, permitiendo la detección de una gran número de bandas polimórficas en un solo loci, en lugar de altos niveles de polimorfismo en cada loci, como es el caso de los métodos de SSR. Aunque presente una menor sensibilidad frente la detección de heterocigotos y homocigotos, brindan un alto número de polimorfismo por loci (Gerber *et al.*, 2000), brindando una mayor eficiencia para detección de polimorfismo que cualquier RAPD o marcador de RFLP (García-Mas *et al.*, 2000). También se sabe que la técnica AFLP tiene costos iniciales más bajos y es más transferible a través de especies que los métodos de SSR. La técnica basada en AFLP's se han aplicado en distintas investigaciones como en la cartografía del genoma (Zimnoch-Guzowska *et al.*, 2000), huella de ADN (Powell *et al.*, 1996), estudios de diversidad genética (Russellet, 1997) y análisis de parentesco (Gerber *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2001), resultando una herramienta muy útil en la disección de características genéticas complejas.

Con base en lo anterior, se realizó un estudio sobre el polimorfismo genético y la expresión de metabolitos con actividad biológica funcional en tres especies de *Sechium* P. Browne, dividido en tres capítulos, abordando en el primero, la información publicada acerca de diferentes

accesiones de *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum*, relacionando variables morfológicas, bioquímicas, genéticas y actividad biológica funcional, mediante un meta análisis con enfoque bioprospectivo. En el segundo capítulo, se realizó un análisis de diversidad genética con accesiones del Banco Nacional de Germoplasma (BANGESe) morfológicamente contrastantes, y finalmente una estimación de perfiles fitoquímicos con base a cucurbitacinas y flavonoides de genotipos de sabor ligeramente dulce, neutro y amargo, y su posible relación con bandas polimórficas obtenidas por AFLP's.

6. Literatura citada

- Aguñiga-Sánchez, I. (2017). Efecto antitumoral in vivo de *Sechium* P. Browne (Cucurbitaceae), Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 262 p.
- Aguñiga-Sánchez, I. 2013. Potencial antileucémico in vitro de extractos de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México, 95 p.
- Aguñiga-Sánchez, I., Soto, M., Cadena, J., Ruíz, L., Cadena, J., González, A. Santiago, E. (2015). Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and cancer*, 67(2):250-257. 10.1080/01635581.2015.989370
- Alatorre G. (1995). Bioprospección, ¿una herramienta para el manejo sostenible de los recursos naturales? Diálogos, propuestas, historias para una Ciudadanía Mundial. México; Disponible en: URL: <http://base.d-p-h.info/es/fiches/premierdph/fichepremierdph-1858.html>
- Andrade-Cetto A. 2013. Plants and herbs for the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 148: 344.
- Artuso, A. 2002. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. *World Development*. 30(8), 1355-1368.

- Bishayee, A., Ahmed, S., Brankov, N., Perloff, M. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 16, 980.
- Cadena-Iñiguez, J. 2005. Caracterización Morfoestructural, Fisiológica, Química y Genética de Diferentes Tipos de Chayote *Sechium edule* (Jacq.)Sw. (Tesis Doctorado en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 137 p.
- Cadena-Iñiguez, J., Arévalo, L., Avendaño, C., Soto, M., Ruiz, L., Santiago, E., Ochoa, D. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Fresh produce*, 1(1), 41-53.
- Cadena-Iñiguez, J., Avendaño, C., Soto, M., Ruiz, L., Aguirre, J., Arévalo, L. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 835-847.
- Cadena-Iñiguez, J., Soto, M., Arévalo, M., Avendaño Arrazate, H., Aguirre, J., Ruiz, L. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(SPE. 2), 45-55.
- Cadena-Iñiguez, J., Soto, M., Torres, A., Aguiñiga, I., Ruiz, L., Rivera, A., Santiago, E. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of medicinal plants research*, 7(8): 455-460.
- Cadena-Zamudio, J. 2013. Inducción de la fragmentación del ADN en líneas leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. (Tesis Licenciatura de Biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores. México, D.F., 95 p.
- Camacho, C. P. C., Gutiérrez, F. A. A. 2002. Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 100-106.
- Cartaya, O., I. Reynaldo. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22(2).

- Cordero, C. 2002. Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anti cáncer de extractos vegetales, empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Trabajo de grado. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia, 100-106 p.
- Córdoba, M., Bruno, C., Balzarini, M., Costa, J. L. 2012. Análisis de componentes principales con datos georreferenciados: Una aplicación en agricultura de precisión. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 44(1), 27-39.
- De Luna, E. 1995. Bases filosóficas de los análisis cladísticos para la investigación taxonómica. Acta Botánica Mexicana, (33), 63-79.
- De Luna, E., Guerrero, J. A., Chew-Taracena, T. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. Hidrobiológica, 15(3), 351-370.
- De Sousa, M., Ribeiro, A. 2009. Revisión sistemática y meta análisis de estudios de diagnóstico y pronóstico: una guía. Arq Bras Cardiol, 92(3), 235-245.
- Díaz, S., Piñeros, M., Sánchez, O. 2005. Detección temprana del cáncer de mama: aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. Rev Colomb Cancerol, 9(3), 93-105.
- Eguiarte, L. Souza, V., Nuñez-Farfán, J., Hernández-Baños, B. 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. Bol. Sac. Bot. México 60: 169-181
- Eguiarte, L., Souza, V., Aguirre, X., 2007. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. IEPSA. 591(1), 42-152.
- Esteras, Cristina, et al. High-throughput SNP genotyping in Cucurbita pepo for map construction and quantitative trait loci mapping. BMC genomics, 2012, vol. 13, no 1, p. 80.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791
- Ferreira, I., Urrútia, G., Alonso-Coello, P. 2011. Revisiones sistemáticas y meta análisis: bases conceptuales e interpretación. Revista Española de Cardiología, 64(8), 688-696.

- Firdous, S., Sravanthi, K., Debnath, R., Neeraja, K. 2012. Protective effect of ethanolic extract and its ethylacetate and n-butanol fractions of *Sechium edule* fruits against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1), 354-9.
- Franco, T.L., Hidalgo, R.2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico No.8. Instituto internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cal, Colombia, 89 p
- Freshney, R. 2010. Culture .of animal cell. A manual of basic tecnique. John Wiley and sons Inc. New York. Doi. 10.1002/9780470649367
- Futuyma, D., Keese, M., Funk, D. 1995. Genetic constraints on macroevolution: the evolution of host affiliation in the leaf beetle genus *Ophraella*. *Evolution*, 797-809.
- García, S. 2015. El método que nos une: el empleo de la cladística en Antropología. *Herbario CICY 7*: 23–27
- González, I., Urrútia, G., Coello, P. 2011. Revisiones sistemáticas y metaanálisis: bases conceptuales e interpretación. *Revista Española de Cardiología*, 64(8), 688-696.
- González-Ugarte, A. 2014. Producción diferencial de citocinas promotoras e inhibidoras de la proliferación mieloide en el sobrenadante de cultivos de la línea celular wehi-3, células de medula ósea de ratón normal y suero de ratones tratados con extractos de *Sechium* spp. (Tesis Licenciatura en biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F, 100 p
- Grant, R. P., Grant, R. 2006 Evolution of Character Displacement in Darwin's Finches. *Science* 14 July 2006: Vol. 313. no. 5784, pp. 224 – 226. DOI: 10.1126/science.1128374.
- Hernández-Manrique. R. D. 2002. El meta análisis: consideraciones sobre su aplicación. *CES med*, 16(1), 55-65.
- Jordano, P. 2003. Coevolución: patrones y procesos. Universidad de Sevilla-CSIC. 2000. Curso de doctorado "Biogeografía y Evolución" Programa de Biología Vegetal y Ecología 1999-2003

- Kamble, M.B., Dumbre, R.K., Rangari V.D. 2008. Hepatoprotective activity studies of herbal formulations. *Int J Green Pharm*; 2:147-51.7. Gordon EA, Guppy LJ, Nelson M. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho- Cho (*Sechium edule*). *West Ind Med J* 2000; 49(1): 27-31
- Kitching, I. J. 1998. *Cladistics: the theory and practice of parsimony analysis* (No. 11). Oxford University Press, USA, 121 p.
- Lanyon, S. M. 1985. Detecting internal inconsistencies in distances data. *Systematic Zoology* 34: 397-403
- Lira, R. 1996. Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 58 p.
- Lira, R., Castrejon, J., Zamudio, S., Rojas-Zenteno, C. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, (49):47-61.
- Ma, J.; Yan, G. J.; Liu, C. J. 2012. Development of near-isogenic lines for a major QTL on 3BL conferring Fusarium crown rot resistance in hexaploid wheat. *Euphytica*, vol. 183, no 2, p. 147-152.
- Mans, D.R.A., Da Rocha A.B., Schwartzmann, G. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5:185-198
- Martínez, F., Meca, J., López, J. 2009. El metaanálisis en el ámbito de las Ciencias de la Salud: una metodología imprescindible para la eficiente acumulación del conocimiento. *Fisioterapia*, 31(3), 107-114.
- Melgarejo, L. 2013. Bioprospecting as a possible development mechanism for colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 19-30. Retrieved February 28, 2017, from

- Mendoza, M., Pérez-Ponce, G. 1998. Relaciones filogenéticas entre las especies del género *Cynoscioncola* (Monogenea: Microcotylidae). *Revista de biología tropical*, 46(2), 355-368.
- Monroy-Vázquez, M. 2009. Estudio biodirigido de *Sechium edule* (jacq.) Sw. (cucurbitaceae) (Tesis Maestría en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 66 p.
- Monroy-Vázquez, M., Soto, M., Cadena, J., Santiago, E., Ruiz, L., Rosas, H. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*, 43(8), 777-790.
- Mumtaz, S., Paul, S., Bag, A. 2012. Effect of *Sechium edule* on chemical induced kidney damage in experimental animals. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 8(1):28-35.
- Neeraja, K., Debnath, R., Firdous, S. 2015. Cardioprotective activity of fruits of *Sechium edule*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10(1):125-130.
- Newstrom, L. 1986. Studies and the origin and evolution of chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae). Thesis Ph.D. University of California. Berkeley, California, 149 p.
- Nixon KC, Wheeler QD. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6(3):211-223.
- Núñez-Colín, C. A., López, D. E. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415-427.
- Ocegueda S., Moreno E., Koleff P. 2005. Plantas utilizadas en la medicina Tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas* 62: 12-15.
- OMS. 2014. World Health Organization, 2014
- Ordoñez, A., Gómez, J., Cudmani, N., Vattuone, M., Isla, M. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Microbial ecology in health and disease*, 15(1):33-39

- Ordoñez, A., Gómez, J., Vattuone, M. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food chemistry, 97(3):452-458. Ostrander, E. (2008) Base genética de la morfología canina. Investigación y ciencia, 27 p.
- Pardo, C., Guzmán, J., Rodríguez, O. 2013. Cáncer en la Unidad de Cancerología de Huila, 2006-2008. Revista Colombiana de Cancerología, 17(2), 62-68.
- Petronelli, A., Pannitteri, G., Testa, U. 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. Anti-cancer drugs, 20(10), 880-892.
- Pinedo-Vasquez, M.; Padoch, C.; Mcgrath, D.; Ximenes, T. 2000. Biodiversity as a product of small holders' strategies for overcoming changes in their natural and social landscapes: a report prepared by the Amazonia cluster. Plec News and Views 15: 11-21
- Piñero, D. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435.
- Reyes, C. R. 1999. Prueba de Bootstrap para hipótesis de no preferencia en estudios con variables dicotómicas. Colegio de Postgraduados, Estado de México. pp1662
- Reyes, E. 2012. Estudio del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.). (Monografía para obtener título licenciatura en biología). Universidad Veracruzana Córdoba, Veracruz.
- Richardson, L.C., Pollack, L. A. 2005. Therapy insight: influence of type 2 diabetes on the development, treatment and outcomes of cancer. Nature clinical practice Oncology, 2(1), 48-53.
- Rivera-Martínez, R. 2011. Efecto del extracto *Sechium chinantlense* Lira & f. Chiang., *Sechium compositum* (Donn. Sm.) C. Jeffrey y el híbrido H-387-07-Gisem sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929. (Tesis licenciatura de biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F., 68 p.
- Riviello-Flores L.M. 2015. Evaluación de compuestos de importancia funcional en jugo de dos genotipos *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Tesis Maestría en ciencias). Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba. Amatlán de los reyes, Veracruz, 93 p.

- Salama, A., Polo, A., Contreras, C., Maldonado, L. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. Revista colombiana ciencias químicas farmacológicas, 15:79-82.
- Salazar-Aguilar, S. 2016. Microencapsulación de extractos de chayote (*Sechium edule* (jacq.) swartz) con fines terapéuticos (Tesis Doctorado en ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 101 p.
- Sateesh, G., Hussaini, S., Kumar, G., Rao, B. 2012. Anti-ulcer activity of *Sechium edule* ethanolic fruit extract. The Pharma Innovation, 1(5).
- Setzet, S. 2003. Plan derived triterpenoid as potencial antineoplastic agents. Mini reviews in Medicinal chemistry 3(6):540-556
- Siciliano, T., De Tommasi, N., Morelli, I., Braca, A. 2004. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 52(21), 6510-6515.
- Soler, J.J. 2002. *Evolución la base de la biología*. Estación experimental de zonas áridas (C.S.I.C.) Selección natural y adaptación Capítulo 7: 127-212: Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Sosa-Hernández, N. 2008. Evaluación del efecto de extractos de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. sobre la proliferación y citotoxicidad en líneas celulares tumorales L929 Y HeLa. (Tesis Licenciatura en Biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F., 55 p
- Srivastava V., Negi A.S., Kumar J.K., Gupta M.M. 2005. Plant-based anticancer molecular: A chemical and biological profile of some important leads. Bioorganic Med Chem 13, 5892–5908.
- Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K. A., Brown, G. A., Horning, S., Korsmeyer, S. J. 2000. Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. Nature genetics, 24(3), 287

- Stace, C. A. 1986. The present and future infraspecific classification of wild plants. The Systematics Association Special Volume No. 29:10-20
- Tamayo, J., Peña, G., de la Paz C., Pacheco, C., Campusano, Y. A. 2016. *Sechium edule* (Jacq.) Sw: potencia fitoterapéutica como agente antibacteriano. Medisur, 14(6).
- Tiburcio, R. 2011. Efecto de extractos crudos de especies silvestres de *Sechium* spp. (*S. chinantlense* (Lira & Chiang) *S. compositum* (J.D. Smith) Jeffrey y un híbrido h-387-07-Gisem, sobre proliferación de líneas leucémicas mieloides de ratón) (Tesis licenciatura en biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F., 59 p.
- Uriostegui-Arias, M.T. 2014. Análisis fitoquímicos y efecto antirproliferativo de genotipos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. sobre cáncer de mama (Tesis Maestría en ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 78 p.
- Vega Á.E., Velasco-Lezama, R., Jiménez-Estrada, M. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. Bioquímica, 31(3), 97-111.
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., Vigneri, R. 2009. Diabetes and cancer. Endocrine-related cancer, 16(4), 1103-1123.
- Zimmet P., Alberti K.G., Magliano D.J., Bennett P.H. 2016. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. Nature Reviews. 12: 616–622.
- Zurita, M. 2002. Los genes homeóticos y el desarrollo de la mosca de la fruta. Ciencias 65, enero-marzo, 32-37

CAPÍTULO I. BIOPROSPECCIÓN DE VARIEDADES DE *Sechium* spp., PARA SELECCIÓN DE CARACTERES CON ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA; UNA REVISIÓN

Resumen

La bioprospección busca, mediante investigación y clasificación de resultados, identificar nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, y otros con valor económico actual o potencial partiendo de la biodiversidad. Se realizó una revisión con fines bioprospectivos en 10 genotipos de *Sechium* spp., mediante un meta análisis a partir de 20 fuentes de información considerando cinco variables morfológicas, 19 bioquímicas, tres de actividad biológica de extractos sobre proliferación de cinco líneas celulares malignas y 188 bandas polimórficas de caracterización genética. Caracterización mediante AFLP's, para identificar las variables más relevantes que faciliten diseñar entrecruzamientos genéticos. Se correlacionaron, asociaron y compararon, matrices de similitud, distancia de caracteres fenotípicos, genéticos, coincidencia entre estructuras taxonómicas y enfoque cladístico (NTSYSpc versión 2.20N y Winclada 1.00.08, 2002). Se obtuvieron relaciones significativas de caracteres morfológicos y bioquímicos con actividad antiproliferativa en líneas celulares, con cinco componentes principales (PC) SAS/ETS® (SAS Institute, Inc., 2008) se identificaron variables con significancia menor a 0.7 y valores de Pearson ≥ 0.7 ., se obtuvo el valor acumulado de 80.81% de la variación y 110 bandas genéticas. Con NTSYSPC se recuperaron 39 variables donde 30 mostraron correlación de Pearson (>0.5) y nueve variables (<0.05), resaltando 65 bandas genéticas, además del color verde oscuro del fruto, presencia de espinas, sabor amargo, forma piriforme y oblongo, además de , Clorofila a, Clorofila b, ocho cucurbitacinas ICbE, DHCbE, CbE, ICbD, CbB, DHCbB, DHCbD y CbQI concentración para cada una de las 5 líneas celulares malignas, e IC50 para las líneas HeLa L929, P388, WEHI-3.

Palabras clave: Biodiversidad; cáncer; chayote; leucemia.

1.1 Introducción

En los últimos años se han evidenciado propiedades de actividad biológica funcional en algunas especies del género *Sechium* P. Browne (Cucurbitaceae) de origen neotropical cuya mayor

biodiversidad se registra en Mesoamérica (Newstrom, 1986; Lira, 1996, 1999); sus frutos se denominan chayotes, y su domesticación ha sido dirigida principalmente a uso alimentario. Sin embargo, existe registro de su aplicación en la medicina tradicional para tratar padecimientos renales, inflamatorios (Salama *et al.*, 1986), cardiovasculares (Neeraja *et al.*, 2015), además de tener propiedades antioxidantes (Ordonez *et al.*, 2006), antiulcerosas (Sateesh *et al.*, 2012), antibacterianas (Tamayo *et al.*, 2016) y hepato protectoras (Kamble *et al.*, 2008; Firdous *et al.*, 2012; Mumtaz *et al.*, 2013). Las propiedades funcionales atribuidas al chayote son respaldadas por la variación y concentración de metabolitos identificados en hojas y frutos, destacando los aminoácidos (Reyes, 2012), peroxidasas, esteroides, saponinas, fenoles, polifenoles, flavonoides (Siliciano *et al.*, 2004) y terpenos tetracíclicos (Cadena-Iñiguez, 2005, 2007; 2010; Monroy-Vázquez *et al.*, 2009; Riviello-Flores, 2015, Aguiñiga-Sánchez, 2017). Estos metabolitos son de interés farmacológico por sus propiedades terapéuticas, siendo los triterpenos los que tienen mayor efecto sobre líneas celulares cancerígenas (Bishayee *et al.*, 2011; Petronelli *et al.*, 2009; Vega *et al.*, 2006). En la actualidad, se ha apostado al desarrollo de compuestos anticancerígenos a partir de fuentes naturales, buscando reducir efectos tóxicos o actividades no selectivas, originando escenarios de aprovechamiento farmacéutico (Vega *et al.*, 2006; Mans *et al.*, 2000). En el género de *Sechium* P. Browne, se describen diez especies (Lira, 1999), de las cuales sobresalen para México, *S. chinantlense* (Aguiñiga-Sánchez, 2013; González-Ugarte, 2014) *S. compositum* (Rivera-Martínez, 2011; Tiburcio, 2011) y *S. edule* (Cadena-Iñiguez, 2005; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007, 2008), por sus evaluaciones bioquímicas y de actividad antiproliferativa sobre líneas cancerígenas a partir de extractos de frutos. En *S. edule*, por ser la especie domesticada se ha clasificado su variación infraespecífica en 12 grupos varietales denominados: *nigrum levis*, *albus levis*, *albus dulcis*, *nigrum conus*, *albus minor*, *nigrum minor*, *amarus silvestryis*, *nigrum maxima*, *nigrum xalapensis*, *virens levis*, *nigrum spinosum*, *albus spinosum* (Cadena-Iñiguez, 2005). Riviello-Flores (2015), señala propiedades nutraceuticas de extractos acuosos obtenidos del grupo *virens levis* y *nigrum spinosum*, mientras que Aguiñiga-Sánchez (2016), Aguiñiga-Sánchez *et al.* (2015), Salazar-Aguilar *et al.* (2016), Cadena-Iñiguez *et al.* (2013), y Monroy-Vázquez *et al.* (2009), han reportado actividad biológica de *Sechium edule*, *S. chinantlense*, *S. compositum* e híbridos de sabor amargo, sobre líneas celulares derivadas de tumores malignos HeLa, P-388, L929, WEHI-3, J774 (Cordero, 2002; Freshney, 2010), además

de demostrar la fragmentación del ADN e inducción de apoptosis (Cadena-Zamudio, 2013) con extractos crudos obtenidos a partir de *S. spinosum*, *S. chinatlense*, *S. compositum* y el híbrido H38707. A este respecto, el aprovechamiento bioprospectivo busca, mediante la investigación y clasificación de resultados, identificar nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, y otros, con valor económico actual o potencial, partiendo de la biodiversidad (Alatorre, 1995; Artuso, 2002; Cordero, 2002; Melgarejo, 2013), y en el caso de la amplia diversidad de metabolitos y variación de concentraciones reportadas en *Sechium*, conllevan al reto de identificar las variables morfológicas, bioquímicas, y genéticas relevantes, relacionadas con dicha actividad, con el fin de aumentar las posibilidades de uso de los chayotes. Lo anterior genera un escenario de alto impacto, así como áreas de oportunidad al ofertar alternativas naturales a problemas de interés públicos, tales como el cáncer y diabetes ubicadas como principales causas de muerte con un alto costo para salud pública (Zimmet *et al.*, 2016; OMS, 2014; Pardo *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2005); diversos estudios revelan que estas patologías multifactoriales pueden presentar una influencia recíproca y son problemas de salud que continúan creciendo (Vigneri *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2005), por tanto, abordar temas de tal interés, requieren de la revisión y análisis de información actualizada a través de un meta análisis, definido como un proceso de síntesis de la evidencia científica, respecto a un tema con interés clínico, administrativo o de tecnología en salud, de tal forma que facilite tomar decisiones objetivas con base en resultados cuantitativos (Hernández-Manrique, 2002; Ferreira *et al.*, 2011). Lo anterior permitiría diseñar nuevos enfoques de investigación, como por ejemplo en mejoramiento genético, e intentar potencializar aquellos caracteres que brinden efectividad funcional, tales como actividad antineoplásica y selectiva sobre células malignas y normales (Aguñiga *et al.*, 2015; Cadena-Zamudio, 2013). En los resultados publicados se menciona la actividad biológica de extractos en etanol de frutos de chayote sobre células normales y malignas (Aguñiga-Sánchez *et al.*, 2015; Aguiñiga-Sánchez, 2017; Salazar-Aguilar., 2016), lo cual, aunado a que son en su mayoría frutos comestibles con alta producción (54-136 t ha⁻¹) (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2007; Cadena-Iñiguez, 2005) ubican a este grupo de plantas como fuente importante de metabolitos, o bien para desarrollar cultivares derivados del estudio bioprospectivo. El reto de la revisión y meta análisis en *Sechium*, fue integrar todas las variables evaluadas en investigaciones independientes, pero que pueden guardar una relación significativa

con la actividad biológica antiproliferativa, antineoplásica y selectiva (SetzerSetzer, 2003; Siliciano *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005; Monroy-Vázquez *et al.*, 2009; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015). En este trabajo se incluyeron los resultados de investigaciones publicadas sobre la biodiversidad de tres especies de *Sechium*, con el fin de identificar y asociar las principales variables morfológicas, bioquímicas y genéticas con actividad biológica funcional, con fines de bioprospección terapéutica-farmacológica para diseñar nuevas variedades por variables sobresalientes en los genotipos.

1.2 Materiales y Métodos

La revisión y meta análisis aporta un método sistemático, objetivo y científico, para la revisión cuantitativa de investigaciones primarias sobre una temática común (De Souza *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009), considerando una síntesis rigurosa sobre la mejor evidencia disponible (González *et al.*, 2011). Para esta revisión, la información en torno a *Sechium*, fue catalogada bajo el criterio inicial de identificación de la especie y genotipo empleado (grupo varietal). La búsqueda se realizó en bases de datos: Google scholar, CAB abstracts, Agris, Web of science, Biological abstracts, Microsoft academy y Scopus, con las palabras clave *S. edule*, *S. edule* metabolismo secundario, *S. chinantlense*, *S. compositum*, chayote, variedades, apoptosis, antiproliferativo, caracterización, cucurbitacinas, extracción ADN, peroxidasas, fenoles, flavonoides, y cromatografía. Se identificaron 7427 resultados, de los cuales al aplicar los criterios de especie y grupo varietal identificado en cada publicación, la muestra se redujo a 20 (Cuadro 1.1). Con lo anterior se elaboró una base de datos compuesta por cinco variables morfológicas de frutos (sabor, color, forma, tamaño y espinas), 19 bioquímicas (clorofila a, b, presencia de 13 cucurbitacinas, carotenoides totales, sólidos totales, acidez titulable y ácido ascórbico), tres determinaciones para evaluación biológica de extractos vegetales (porcentaje de proliferación, IC₅₀ y dosis de mayor efecto antiproliferativo) sobre líneas celulares malignas de cáncer cérvico uterino (HeLa), Leucemia en ratones (P388), fibroblastos (L929) sarcoma (J774) y leucemia (WEHI-3), además de células normales de médula ósea de ratón, y 188 bandas de caracterización genéticacaracterización genética polimórficas mediante AFLP's para *S. chinantlense*, *S. compositum* y ocho grupos varietales de *S. edule* (*albus minor*, *albus dulcis*, *albus levis*, *nigrum levis*, *nigrum xalapensis*, *nigrum spinosum*, *amarus silvestrys*, *virens levis*).

Las unidades de las concentraciones reportadas en las diferentes publicaciones, fueron uniformizadas a $\mu\text{g ml}^{-1}$ para el análisis.

1.3 Criterios de selección

Se consideraron las publicaciones que abordaron como tema central a frutos de *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum*, excluyendo trabajos que no especificaron el genotipo empleado, que compartieran trabajos de evaluación respecto actividad biológica, con métodos muy similares, y que consideraran variables que en reportes previos han permitido algún tipo de clasificación varietal relacionada con la temática (Cuadro 1.2). El análisis se desarrolló con dos enfoques; el primero, mediante un análisis cladístico, debido a que incorpora racionalismo crítico popperiano a través de la refutación de hipótesis filogénicas, examinadas bajo un principio de parsimonia (De luna *et al.*, 2005; De luna, 1995); y mediante la estadística no paramétrica y empleando el programa WinClada ver.1.00.08 por K. Nixon (2002) (licencia libre) con pruebas de Bootstrap/Jackknife, tratando los genotipos como una población, a través de la simulación aleatoria (Reyes, 1999), realizando una eliminación azarosa de variables hasta generar un cladograma parsimonioso (Felsenstein, 1985), para definir la estabilidad de los clados e identificar el estado del carácter sobresaliente. El análisis se repitió 1000 veces creando un porcentaje que fue empleado como índice de soporte o confianza en los cladogramas (Lanyon, 1985). El segundo análisis fue mediante multivariado con el programa NTSYS pc versión 2.20N, para identificar variables con significancia menor a 0.5 y valores de Pearson ≥ 0.5 , distancias genéticas por UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic), y Componentes principales mediante SAS/ETS® (SAS Institute, Inc., 2008) para identificar variables con significancia menor a 0.7 y valores de Pearson ≥ 0.7 .

Cuadro 1.1. Publicaciones incluidas para el meta análisis bioprospectivo en *Sechium sp.*

Variable	Genotipo	Investigación realizada	Referencia
Actividad biológica funcional	H38707; Perla negra; <i>Sechium edule</i> (<i>albus minor</i> ; <i>albus dulcis</i> ; <i>albus levis</i> ; <i>virens levis</i> ; <i>nigrum levis</i> ; <i>nigrum xalapa</i> ; <i>nigrum spinosum</i> ; <i>amarus silvestrys</i>); Madre negra-GISeM; Amargo 290-GISeM; H38707; HD-369-12-GISeM; <i>S. compositum</i> ; <i>S. chinantlense</i>	Bioensayo en líneas celulares cancerígenas P388; J774; WEHI-3; HeLa; P388; L929; MCF7, evaluación de apoptosis y determinación de fragmentación de ADN.	Aguñiga-Sánchez, 2017; Aguiñiga-Sánchez, et al., 2015; Cadena <i>et al.</i> , 2013; Monroy-Vázquez <i>et al.</i> , 2009; Uriostegui-Arias, 2014; González-Ugarte, 2014; Aguiñiga-Sánchez, 2013; Cadena-Zamudio, 2013; Salazar-Aguilar, 2016; Rivera Martínez, 2011; Tiburcio Félix, 2011; Monroy-Vázquez, 2009; Sosa-Hernández, 2008
Bioquímicas	<i>Sechium edule</i> (<i>albus minor</i> ; <i>albus dulcis</i> ; <i>albus levis</i> ; <i>virens levis</i> ; <i>nigrum levis</i> ; <i>nigrum xalapa</i> ; <i>nigrum spinosum</i> ; <i>amarus silvestrys</i>); <i>S. compositum</i> ; <i>S. chinantlense</i> ; Perla negra; H38707	Determinación de perfil bioquímico (cucurbitacinas, Clorofila b y a, carotenoides, sólidos totales, acidez titulable, ácido ascórbico)	Cadena-Iñiguez <i>et al.</i> , 2011; Monroy-Vázquez <i>et al.</i> , 2009; Cadena-Iñiguez <i>et al.</i> , 2007; Cadena-Iñiguez <i>et al.</i> , 2005; Aguiñiga-Sánchez, 2017; Riviello-Flores, 2015; González-Ugarte, 2014; Aguiñiga-Sánchez, 2013; Salazar-Aguilar, 2016; Monroy-Vázquez, 2009; Cadena-Iñiguez, 2005
Morfológicas	<i>Sechium edule</i> (<i>albus minor</i> ; <i>albus dulcis</i> ; <i>albus levis</i> ; <i>virens levis</i> ; <i>nigrum levis</i> ; <i>nigrum xalapa</i> ; <i>nigrum spinosum</i> ; <i>amarus silvestrys</i>); <i>S. compositum</i> ; <i>S. chinantlense</i>	Descripción de caracteres de fruto con base a descriptores (UPOV)	Cadena-Iñiguez <i>et al.</i> , 2008, Cadena-Iñiguez, 2005,
AFLP's (Amplified fragment length polymorphism)	<i>Sechium edule</i> (<i>albus minor</i> ; <i>albus dulcis</i> ; <i>albus levis</i> ; <i>virens levis</i> ; <i>nigrum levis</i> ; <i>nigrum xalapa</i> ; <i>nigrum spinosum</i> ; <i>amarus silvestrys</i>); <i>S. compositum</i> ; <i>S. chinantlense</i> ; H38707	Determinación de 228 bandas de AFLP's	Cadena-Iñiguez, 2005

Cuadro 1.2. Variables morfológicas, bioquímicas, de efectividad biológica y caracterización genética en *S. edule*, *S. chinantlense*, *S. compositum* para el análisis bioprospectivo.

No	Caracter	Estado de caracter	No	Caracter	Estado de caracter
1	Longitud fruto (cm)	0=3.07;1=5.77;2=5.94; 2=5.99;3=7.8;4=8.1; 5=8.28;6=10.54;7=13.55; 8=14.96	2	Ancho fruto (cm)	0=2.70;1=4.47;2=5.2; 3=5.4;4=5.65; 5=5.82; 6=6.8; 7=8.19; 8=8.47;9=9.0
3	Fondo fruto (cm)	0=0; 1=3.12; 2=3.40; 3=4.20; 4=4.60; 5=5.30; 5=5.34;6=5.50; 7=5.85; 8=6.24	4	Color (°Hue)	0=60.8; 1=67.3; 2=68.3;3=126.5; 4=167.2;5=198.4;6=200; 7=201.1;8=222.9;8=223
5	Forma (UPOV)	2=Pirifome;3= Esférico; 4=Oblongo;6=Obovoide	6	Sabor (UPOV)	0=Neutro;1=Dulce; 2=Amargo
7	Espinas (UPOV)	0= Ausencia; 1= Presencia	8	Clorofila a (mg g ⁻¹)	0=0.00234; 1=0.00362; 2=0.0175; 3=0.06; 4=0.084; 5=0.119; 6=0.198; 7=0.223
9	Clorofila b (mg g ⁻¹)	0=0.0034;1=0.00418; 2=0.00541;3=0.0712; 4=0.0846; 5=0.0922; 6=0.1231;7=0.2458	23	Carotenoides totales (mg g ⁻¹)	0= No determinado; 1= 0.0042;2=0.0056; 3=0.01028
10-22	Cucurbitacinas (0=Ausente; 1=Presente)	10=Dihidrocucurbitacina I (DHCbI) 11=Glicósidocucurbitacina B (GCbB); 12=GlicoCucurbitacina E GLCbE); 13=Dihidrocucurbitacina E (DHCbE); 14=Cucurbitacina QI (CbQI); 15=Cucurbitacina P (CbP); 16=Isocucurbitacina E (ICbE); 17=Dihidrocucurbitacina D (DHCbD); 18=Isocucurbitacina D (ICbD); 19=Dihidrocucurbitacina B (DHCbB); 20=Cucurbitacina B (CbB); 21=Curcubitacina L (CbL); 22=Curcubitacina E (CbE)	24	Sólidos totales (°Brix)	0=No determinado; 1=4.93;2=5.14; 3=5.47;4= 6.43; 5=7.21;6=7.66; 7=8.08;8=10.92
			25	Acidez titulable (%)	0=No determinado; 1=0.029;2=0.032; 3=0.035;4=0.038; 5=0.04;6=0.045; 7=0.059
			26	Ácido ascórbico (mg g ⁻¹)	0=No determinado; 1=3.99; 2=4.95; 3=6.53; 4=6.65; 5=6.76; 6=7.42; 7=7.75; 8=7.82
27	HeLa [µg ml ⁻¹]	0=1180; 1=2400; 2=2.50; 3=5.0	28	HeLa Proliferación (%)	0=6;1=10; 2=13; 3=15; 4=17; 5=19; 6=21;

29	P-388 [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	0=2400; 1=5.0; 2=10.0	30	P-388 Proliferación (%)	7=22; 8=23 0=18; 1=21; 2=27; 3=34; 4=40; 5=45; 6=47
31	L-929 [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	1=2400; 2=2.50; 3=10.0	32	L-929 Proliferación (%)	0=11; 1=18; 2=22; 3=26; 4=34; 5=44; 6=51; 7=84
33	J-774 [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	0= No determinado; 1=2500; 2=5.0; 3=10.0	34	J-774 Proliferación (%)	0=No determinado; 1=2; 2=17
35	WEHI-3 [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	0=No determinado 1=2370; 2=2.50; 3=5.0	36	WEHI-3 Proliferación (%)	0=No determinado; 1=10; 2=20
37	HeLa IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0=0.74;1=1.51;2=500; 3=600;4=840;5=880; 6=930;7=1170;8=1510	38	P388 IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0=0.98; 1=2.75; 2=480;3=730;4=940; 5=1010;6=1060; 7=1120;8=1970; 9=1980
39	L929 IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0=No determinado; 1=3.33;2=6.37;3=370; 4=1100;5=1400;6=1800; 7=1900	40	J774 IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0= No determinado; 1=0.26;2=1.96
41	WEHI-3 IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	0=No determinado; 1=803.1;2=0.93;3=0.3	42- 229	AFLP's (bandas)	0= Ausencia 1=Presencia

1.4 Resultados y discusión

El cladograma general (Figura 1.1) muestra la distribución de *S. chinantlense*, *S. compositum* y *S. edule* tomando en cuenta variables morfológicas, bioquímicas, actividad biológica funcional y caracterización genética, observando un árbol monofilético, donde *albus minor* se ubicó como el más cercano al estado basal de los genotipos o taxones. Lo anterior difiere a lo reportado por Cadena-Iñiguez *et al.* (2008), donde el orden filogenético ubica a *albus minor*, *albus dulcis* y *albus levis* como los genotipos de mayor evolución morfoestructural respecto al pariente silvestre, basado en su especialización adaptativa al ambiente. En el presente estudio dichos genotipos de fruto amarillo fueron los más próximos a la raíz, y puede deberse a que registran el menor número de caracteres asociados a las variables bioprospectivas de proliferación, IC₅₀, concentración más eficiente (dosis del extracto aplicado a la línea celular y menor porcentaje de proliferación) respecto a líneas celulares malignas. Las pruebas de Bostrapp y Jackknife, mostraron alto grado de parsimonia, con valores desde 100/100 como máximo, y 60/51 como mínimo, en base a homoplasias, con Longitud de L=566, índice de consistencia (Ci 59), y retención (Ri 51) (Kitching, 1998) por caracteres aparentemente similares que resultan de una evolución independiente (Jordano, 2003; Grant *et al.*, 2006). Los tres genotipos del grupo *albus*,

reflejaron menor actividad biológica por menor número de caracteres asociados a ésta (Cuadro 3), excepto *albus levis* quien registró contenido de cucurbitacina P (CbP) como un carácter autopomórfico. A partir del cuarto clado (*nigrum levis*, *S. edule*, *virens levis*, *nigrum xalapensis*) se observó mayor asociación a porcentaje de proliferación e IC₅₀ sobre líneas celulares, y caracteres, relacionados a forma piriforme del fruto, cucurbitacinas ICbD, DHCbE, alto contenido de clorofila a, b, sólidos solubles y carotenoides totales, que son de origen sinapomórfico (Eguiarte, 2007, Morrone, 2000; Kitching, 1998), que podrían evidenciar efectos de su manipulación humana, creando diferentes historias de vida en los genotipos, fomentando la variación de *S. edule* como complejo infraespecífico (Cuadros 1.3 y 1.4). Los caracteres ancestrales de origen simplesiomórfico, tales como el color verde oscuro, sólidos totales, ácido ascórbico, clorofila a, b, y acidez titulable, se relacionaron con el porcentaje de proliferación, IC₅₀, líneas celulares HeLa, P388, L929, resaltando que para *S. chinantlense* y *S. compositum* los caracteres de forma piriforme del fruto, bandas polimórficas y porcentaje de proliferación e IC₅₀, sobresalieron en su asociación con la línea leucémica WEHI-3, HeLa, J774 y L929 (Cuadros 1.5 y 1.6). *S. chinantlense* y *S. compositum* mostraron en los clados, caracteres morfológicos y bioquímicos relevantes, a diferencia de *S. edule* y sus grupos varietales, debido posiblemente, a que las dos primeras son especies sin manipulación humana, y a que no existe evidencia reportada de usos alimenticios, medicinales, y no han desarrollado variación morfológica, como sucede en el caso de *S. edule*. Futuyma *et al.* (1995), Zurita (2002), Ostrander (2008), mencionan que la expresión morfológica y bioquímica obedece a la expresión génica, y respecto a lo anterior, el mismo clado muestra que las bandas polimórficas comprendidas entre la 42 y 227 para *S. chinantlense* y las ubicadas entre la 44 y 218 para *S. Compositum* son estados ancestrales o primitivos producto de la especiación (Mendoza *et al.*, 1998; Soler, 2002). Los caracteres ubicados en las ramas previas a la formación de un clado (Morrone, 2000; Siddall y Whiting, 1999), mostraron caracteres ancestrales, tales como clorofila a, b, CbE, CbB, DHCbD, DHCbB, sólidos totales, ácido ascórbico y color verde obscuro a verde muy obscuro y sabor amargo (Lira *et al.*, 1999; Cadena-Iñiguez, 2005) asociados a variables con interés terapéutico (Freshney, 2010; Camacho *et al.*, 2002).

Cuadro 1.3. Caracteres apomórficos provenientes del Clado heurístico con variables morfológicas, bioquímicas y genéticas en diez genotipos de *Sechium* spp., La diagonal indica el carácter y su estado de carácter relevante.

Genotipo	Carácter/estado de carácter	Morfológicas	Bioquímicas	Genéticas	Actividad asociada
<i>S. edule albus minor</i>	43/1,93/1,105/1,178/1			43,93,105,178	
<i>S. edule albus dulcis</i>	2/3,150/1,187/1,206/1,229/1	Ancho 5.65 cm		150,187,206,229	
<i>S. edule albus levis</i>	2/3,15/1,30/3,37/2,54/1,120/1,181/1,187/1,206/1,215/1,220/1	Ancho 5.65 cm	CbP	54,120,181,206,215,22	P-388 proliferación 34%, HeLa IC ₅₀ 500 µg ml ⁻¹
<i>Sechium edule</i>	6/2,7/1,8/7,9/7,13/1,15/1,105/1,107/1,119/1,126/1,143/1,198/1,224/1	Amargo, Espinas, Ancho 9.0 cm	Clorofila a 0.223 mg g ⁻¹ , Clorofila b 0.2458 mg g ⁻¹ DHCbE,CbP, Color198 °Hue	105,107,119,126,143,198,224	
<i>S. edule nigrum levis</i>	47/1,54/1			47,54	
<i>S. edule virens levis</i>	5/2,37/2,42/1,119/1,125/1,150/196/1,1,211/1	Piriforme		42,119,125,211	HeLa IC ₅₀ 500 µg ml ⁻¹
<i>S. edule nigrum xalapensis</i>	4/8,5/4,15/1,16/1	Oblongo	Color 223° Hue, CbP, ICbE		
<i>S. edule nigrum spinosum</i>	5/2,7/1,18/1,36/2,109/1,143/1,216/1	Piriforme, Espinas	ICbD	94,144,197,216	Proliferación WEHI-3 20%
<i>S. chionantlense</i>	1/2,2/2,4/8,5/4,54/1,70/1,109/1,120/1,126/1,132/1,142/1,143/1,150/1,178/1,198/1,206/1,215/1,224/1	Longitud 5.94cm, Ancho 5.2cm, Oblongo	Color 223°Hue, Clorofila a 0.119 mg g ⁻¹	54,70,86,109,120,126,132,142,143,150,178,206,215,224	
<i>S. compositum</i>	5/2,7/1,90/1,145/1,211/1,220/1	Piriforme, Espinas		90,145,211,220	

Los caracteres apomórficos son rasgos o caracteres biológicos evolutivamente novedosos, derivados del taxón ancestral filogenéticamente más próximo (Eguiarte., 2007, Morrone, 2000). Los caracteres apomórficos mostrados en el cuadro 1.4, presentaron pocos caracteres y estados de carácter asociados con variables de actividad biológica funcional, registrando cinco morfológicos (espinas, amargo, piriforme, ancho y largo del fruto), ocho bioquímicas (concentraciones más elevadas de clorofila a y b, cucurbitacina P, isocucurbitacina E, isocucurbitacina D, dihidrocucurbitacina E, color verde claro y verde oscuro del fruto), variables de actividad biológica, (tales como porcentajes de proliferación en líneas P-388, WEHI-3, e IC₅₀ en HeLa); mientras que los caracteres simpliomórficos (Cuadro 1.5) que registran un rasgo compartido por dos taxones emparentados, cuando éste coincide con el carácter presente en el antepasado común de ambos, mostró mayor número dentro del cladograma, revelando asociación con efecto antiproliferativo en P-388, L-929, J-774, HeLa y WEHI-3, IC₅₀, y dosis más eficiente, con diferentes estados de carácter por genotipo, tales como la forma oblonga, y tamaño grande del fruto, mientras que los de origen bioquímico mostraron valores diversos de clorofila a y b, con influencia en la variación de color del fruto de amarillo a verde con distintas intensidades, ácido ascórbico, sólidos totales, acidez titulable presencia de cucurbitacina B, dihidrocucurbitacina B y D. Dicho de otra manera, los caracteres ancestrales presentaron mayor variabilidad de caracteres y estados de carácter identificados por el enfoque cladístico como variables bioprospectivas que determinan su actividad biológica funcional.

Cuadro 1.4. Caracteres apomórficos y plesiomórficos identificados en las ramas del clado heurístico con base en variables morfológicas, bioquímicas y genéticas de diez genotipos de *Sechium* spp. La diagonal indica el caracter y su estado de caracter relevante.

Rama	Caracteres apomórficos	Rama	Caracteres plesiomórficos
1	Logitud 5.77 cm, Ancho 5.2 cm, 55, 70, 206	1	Clorofila b 0.00418 mg g ⁻¹ , CbE; 71, 134, 202, 223, HeLa proliferación 21%
2	n/a	2	Fondo 3.40 cm; Clorofila b 0.00541 mg g ⁻¹ , DHbD, CbB, Solidos totales 8.08 ° Brix, 78, 99, 104; L929 proliferación 44%, P388 IC ₅₀ 1010 µg ml ⁻¹ , L929 IC ₅₀ 370 µg ml ⁻¹
3	93, 229	3	Color 167.2° Hue, Clorofila a 0.119 mg g ⁻¹ , Clorofila b 0.0846 mg g ⁻¹ , DHCbB, Acidez titulable 0.038%, Ácido ascórbico 6.53 mg g ⁻¹ ; L929 proliferación 26%, HeLa IC ₅₀ 840 µg ml ⁻¹
4	P-388 Proliferación 15%, 100, 111	4	Fondo 4.20 cm; Neutro, Solidos totales 5.47 ° Brix ; HeLa proliferación 15%
5	198.4° Hue, DHCbE, 128	5	Longitud 8.1, Ancho 6.8 cm, fondo 5.34, 186; P388 proliferación 18%, L929 proliferación 22%
6	Espinas, ICbD, 187, 198	6	Longitud 13.55 cm, Ancho 8.19; CbQI, Solidos totales 5.14 ° Brix; L929 IC ₅₀ 1400 µg ml ⁻¹
7	Amargo, 101, 105	7	Color 200 ° Hue, Clorofila b 0.0922 mg g ⁻¹ , Ácido ascórbico 4.95 mg g ⁻¹ , 135, 226, L929 proliferación 18%, J774 proliferación 10%, P388 IC ₅₀ 480 µg ml ⁻¹ , WEHI-3 IC ₅₀ 0.93 µg ml ⁻¹
8	Clorofila a 0.223, Clorofila b 0.2458, 42, 43, 47, 50, 55, 63, 66, 107, 121, 125, 187, 188, 196	8	45, 46, 48, 49, 56, 65, 80, 81, 84, 91, 114, 129, 138, 153, 154, 162, 170, 171, 172, 176, 182, 185, 192, 194, 201, 204, 210, 221, 228 HeLa [2400 µg ml ⁻¹], HeLa proliferación 6%, P388 [2400 µg ml ⁻¹], L929 [2.5 µg ml ⁻¹], J774 [5.0 µg ml ⁻¹], J774 proliferación 17%, WEHI-3 [2.5 µg ml ⁻¹], HeLa IC ₅₀ 1.51 µg ml ⁻¹ , P388 IC ₅₀ 0.98 µg ml ⁻¹ , L929 IC ₅₀ 6.37 µg ml ⁻¹ , J774 IC ₅₀ 0.26 µg ml ⁻¹

Cuadro 1.5. Caracteres simplesiomórficos provenientes del clado heurístico generado a partir de variables morfológicas, bioquímicas y genéticas de diez genotipos de *Sechium* spp.

Genotipo	Caracter/estado	Morfología	Bioquímica	Genética	Actividad biológica
<i>S. edule albus dulcis</i>	1/5,3/0,8/0,24/5,28/8,30/5,37/8,38/9	Longitud 8.28 cm	Clorofila a 0.00234 mg g ⁻¹		P388 proliferación 45% HeLa IC ₅₀ 1510 µg ml ⁻¹ , P-388 IC ₅₀ 1980 µg ml ⁻¹
<i>S. edule albus levis</i>	3/6,4/0,24/7,26/7,28/7,38/4,39/7,60/1	Fondo 5.50 cm	Color 60.8 °Hue, Solidos totales 8.08° Brix, Ácido ascórbico 7.82 mg g ⁻¹	60	HeLa proliferación 17%, P388 IC ₅₀ 940 µg ml ⁻¹ , L929 IC ₅₀ 1900 µg ml ⁻¹
<i>Sechium edule</i>	1/3,4/5,5/6,24/8,25/7,30/6,32/3,37/7,39/4	Longitud 7.8 cm, Ovoide	Color 198.4°Hue, Sólidos totales 10.92° Brix, acidez titulable 0.059 %		P388 proliferación 47%, L929 proliferación 84%, HeLa IC ₅₀ 1170 µg ml ⁻¹ , L929 IC ₅₀ 1100 µg ml ⁻¹
<i>S. edule nigrum levis</i>	1/1,2/1,8/6,25/6,26/4,32/6,37/5,38/6,	Longitud 5.77 cm, Ancho 4.47 cm	Clorofila a 0.198 mg g ⁻¹ , Acidez titulable 0.045%, Ácido ascórbico 6.65 mg g ⁻¹		L929 proliferación 51%, HeLa IC ₅₀ 880 µg ml ⁻¹ , P388 IC ₅₀ 880 µg ml ⁻¹
<i>S. edule virens levis</i>	2/6,4/3,8/3,9/3,25/5,26/5,28/4,38/3	Ancho 8.74 cm	Color 126.5°Hue, Clorofila a 0.06 mg g ⁻¹ , Clorofila b 0.0712 mg g ⁻¹ , Acidez titulable 0.04%,		HeLa proliferación 17%, P388 IC ₅₀ 730 µg ml ⁻¹
<i>S. edule nigrum xalapensis</i>	1/8,3/7,9/6,24/1,25/2,30/2,32/4,38/7,39/6	Largo 14.96 cm, fondo 5.85,	Clorofila b 0.1231 mg g ⁻¹ , Solidos totales 4.93° Brix, Acidez titulable 0.032%,		P388 proliferación 27%, L929 proliferación 34%, P388 IC ₅₀ 1120 µg ml ⁻¹ , L929 IC ₅₀ 1800 µg ml ⁻¹
<i>S. edule nigrum spinosum</i>	1/6,2/7,3/8,4/7,8/4,24/4,28/5,77/1	Longitud 10.54 cm, Ancho 9.00cm, Fondo 6.24 cm	Solidos totales 6.43° Brix,	77	HeLa proliferación 19%,
<i>S. chiantlense</i>	3/4,35/3,41/3,51/1,52/1,58/1,83/1,92/1,98/1,113/	Fondo 4.6 cm,		51,52,58,83,9,98,113,115,127,131,152,164,	WEHI-3 [0.3 µg ml ⁻¹]

	1,115/1	165,169,189, 200,207,209, 217, 222, 225, 227	
S. com- positum	27/3,28/0,29/2,3 1/3,33/3,40/2,44 /1,57/1,69/1,116 /1,130/1,149/1,1 63/1	44,57,69,116,1 30,149,163,19 1,195,203,208, 212,213,218	HeLa [5.0 µg ml ⁻¹], HeLa proliferación 6%, L929 [10.0 µg ml ⁻¹], J774 [10.0 µg ml ⁻¹], J774 IC ₅₀ 1.96µg ml ⁻¹

1.5 Análisis multivariado

El análisis multivariado permitió identificar las variables que explican la mayor variabilidad total contenida en los datos, además de explorar las correlaciones y reducir la dimensión del análisis con nuevos índices (Córdoba *et al.*, 2012). Se determinó que con cinco componentes principales (PC), se obtuvo el valor acumulado de 80.81% de la variación (Cuadro 1.6, 1.7, 1.8).

Cuadro 1.6. Valores característicos y su proporción acumulada para cinco primeros componentes principales del análisis de 229 variables morfológica, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica de frutos de diez genotipos de *Sechium* spp.

PC	Eigenvalues	Difference	Variance	Cumulative variance	%
1	48.71	12.01	0.28	0.28	28.49
2	36.70	12.61	0.21	0.50	49.95
3	24.09	8.15	0.14	0.64	64.03
4	15.94	3.20	0.09	0.73	73.36
5	12.74		0.07	0.81	80.81

Cuadro 1.7. Vectores característicos del análisis de 229 variables morfológica, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica de frutos de diez genotipos de *Sechium* spp.

Caracter	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Longitud del fruto	-0.04524	-0.00769	-0.16111	-0.06994	0.02867
Ancho del fruto	-0.03345	0.01857	-0.16263	0.01423	0.02682
Fondo del fruto	0.00121	0.03002	-0.13941	0.03266	0.05199
Color del fruto	0.05023	0.04151	-0.14366	0.05107	0.07284
Forma del fruto	0.03729	-0.05812	0.03033	-0.01781	0.18951
Sabor del fruto	0.07670	0.07707	0.09244	0.00519	0.10792
Presencia de espinas	-0.02267	0.08481	-0.04393	0.15985	0.09606
Clorofila b (BCLFb)	0.07228	0.07928	-0.07577	0.02160	0.12088
Dihidrocucurbitacina E (BDHcE)	-0.05068	0.05222	-0.14751	0.01722	0.07887
Cucurbitacina QI (BcQI)	-0.03738	-0.03189	-0.13406	-0.16161	-0.01147
Dihidrocucurbitacina D (BDHcD)	0.02997	0.03844	-0.12153	0.00719	0.15736
Isocucurbitacina D (BIcD)	-0.04531	-0.03732	-0.16878	-0.00500	-0.04508
Dihidrocucurbitacina B (BDHcB)	0.05486	0.05835	-0.05079	0.15351	0.05338
Cucurbitacina B (BcB)	0.02221	0.02730	-0.14062	0.02372	0.14749
Curcubita L (BcL)	0.00793	0.02068	-0.01228	-0.04253	-0.19613
Cucurbitacina E (BcE)	0.03684	0.03955	0.00237	0.06428	0.15947
Carotenoides totales (BCT)	-0.02551	-0.03265	0.16134	-0.02069	-0.10832
Dosis más eficiente para HELA	-0.09732	-0.10710	0.00724	-0.00483	-0.06686
Proliferación para P388	-0.05457	-0.04417	0.14698	-0.00224	0.07366
Proliferación para L929	0.06711	0.02431	0.14143	-0.06525	-0.11086
Dosis más eficiente para J-774	-0.01927	-0.01384	-0.07914	0.20791	-0.05360
Dosis más eficiente para WEHI-3	-0.01909	-0.01434	-0.07914	0.20788	-0.05361
Proliferación para WEHI-3	0.08871	0.04309	-0.07063	0.14569	-0.04878
IC50 para L929	-0.04620	-0.05157	-0.06058	-0.09235	0.16805
IC50 para WEHI-3	-0.01933	-0.01430	-0.07910	0.20785	-0.05358

Los valores en negritas son aquellos que estadísticamente fueron los más significativos por componente principal.

Cuadro 1.8. Principales bandas polimórficas tomadas de Cadena-Iñiguez, 2005, por su peso estadístico en cinco componentes principales (CP), del análisis de 229 variables morfológica, bioquímicas, genéticas y de actividad biológica de frutos de diez genotipos de *Sechium* spp.

CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
Banda 043	Banda 031	Banda 172	Banda 073	Banda 067
Banda 046	Banda 039	Banda 042	Banda 161	Banda 081
Banda 097	Banda 040	Banda 069	Banda 217	Banda 149
Banda 115	Banda 062	Banda 025	Banda 173	Banda 101
Banda 123)	Banda 090	Banda 028	Banda 111	Banda 034

Banda 124	Banda 113	Banda 106	Banda 060	Banda 035
Banda 155	Banda 127	Banda 116	Banda 117	Banda 221
Banda 164	Banda 138	Banda 027	Banda 025	
Banda 189	Banda 146	Banda 030	Banda 028	
Banda 194	Banda 157	Banda 094	Banda 041	
Banda 023	Banda 158	Banda 175		
Banda 107	Banda 179	Banda 119		
Banda 053	Banda 111	Banda 061		
Banda 009	Banda 052			
Banda 003	Banda 053			
Banda 078	Banda 026			
Banda 093	Banda 009			
Banda 211	Banda 003			
Banda 099	Banda 206			
Banda 222	Banda 218			
Banda 015	Banda 004			
Banda 016	Banda 021			
Banda 022	Banda 033			
Banda 048	Banda 087			
Banda 054	Banda 103			
Banda 058	Banda 125			
Banda 064	Banda 141			
Banda 083	Banda 180			
Banda 086	Banda 184			
Banda 100	Banda 195			
Banda 105	Banda 203			
Banda 121	Banda 207			
Banda 128	Banda 209			
Banda 143	Banda 216			
Banda 145				
Banda 150				
Banda 178				
Banda 182				
Banda 190				
Banda 202				
Banda 204				
Banda 210				
Banda 214				
Banda 220				
Banda 223				
Banda 225				

Los cinco CP, identificaron 110 bandas polimórficas como de mayor peso estadístico, sin embargo, en un ambiente de selección de parentales para mejoramiento genético, resulta relevante identificar las asociadas en cada componente con variables bioprospectivas, tales como las anotadas en el cuadro 1.7.

Los métodos de agrupamiento, buscan la formación de grupos de unidades básicas de caracterización (UBC's) con características similares a partir de las similitudes o disimilitudes que se presentan entre pares, ya sea, mediante la matriz de distancias o índices de similitud (Nuñez-Colín *et al.*, 2011). A este respecto, la Figura 1.2, muestra el dendrograma con cuatro grupos de genotipos (Nuñez-Colín *et al.*, 2011), observando que *S. chinantlense* y *S. compositum* están separados atribuido a su origen silvestre respecto a los genotipos de *S. edule*, mostrando mayor distancia, equivalente a menor índice de similitud (Piñero *et al.*, 2008), A pesar de que comparten caracteres morfológicos y bioquímicos (color, sabor amargo, cucurbitacinas) con *S. edule*, éste se ubicó distante, compartiendo mayor número de caracteres con sus variantes domesticadas. Resaltan los chayotes comestibles *n. xalapensis*, *v. levis* y *n. spinosum*, de frutos verdes, mayor tamaño y espinas en este último, quienes están relacionados con mayor proximidad por su actividad biológica con las dos especies silvestres, como lo mencionan González-Ugarte (2014); Cadena-Iñiguez *et al.* (2013); Monroy-Vázquez *et al.* (2009), mientras que los genotipos de frutos color amarillo, fueron los de mayor disimilitud y menos relevantes para variables bioprospectivas. A este respecto, Cadena-Iñiguez *et al.* (2011) mencionan que los chayotes de fruto amarillo (*albus*), registran hasta diez y cien veces menos contenido de cucurbitacinas que las variantes de chayote con frutos color verde y su ancestro silvestre (*S. edule*) respectivamente, de tal forma que para efectos de actividad anti proliferativa no resultan relevantes bioprospectivamente. El cladograma y dendrograma reflejaron una distribución semejante para los genotipos de *Sechium* spp., únicamente se invirtió la posición de *S. chinantlense* por *S. compositum* (Figura 1.1 y 1.2), sin embargo, no cambian de rama en el agrupamiento, conservando las distancias, y ocurre de igual forma en *S. edule* y *nigrum levis*. A diferencia del análisis multivariado, el enfoque cladístico mostró el carácter relevante y estado del mismo, lo que mejora la identificación de la variable asociada a la actividad biológica funcional (variables bioprospectivas), que puede ayudar a discriminar o decidir su importancia en programas de investigación básica o mejoramiento genético.

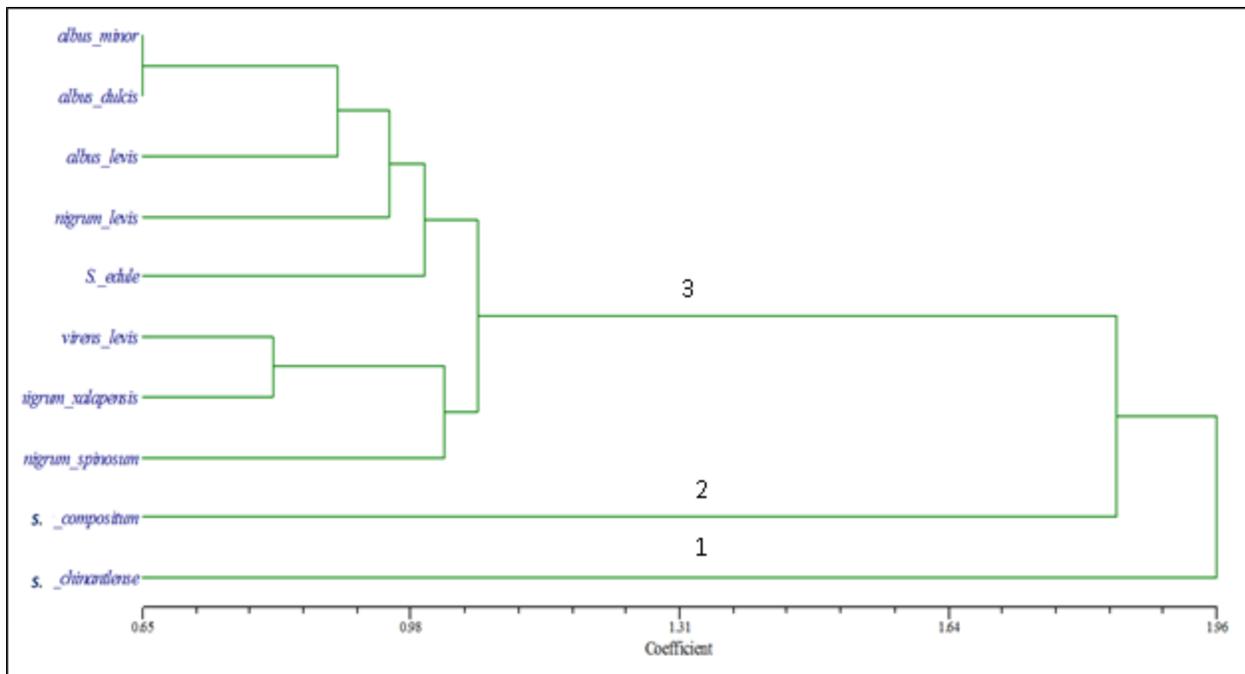


Figura 1.2. Dendrograma a partir del coeficiente de asociación o similitud, con el programa NTSYSpc (Sneath and Sokal, 1973) con base en 229 variables multi estado morfológicas, bioquímicas, genéticas y actividad biológica de frutos de diez genotipos de *Sechium* spp.

El análisis cladístico ayuda a identificar las relaciones filogenéticas con enfoque evolutivo de los taxones (Morrone, 2000), sin embargo, en el presente caso, el cladograma estuvo orientado a identificar posibles caracteres bioprospectivos, lo cual influyó fuertemente en la relación de los taxones, mostrando que los genotipos silvestres presentan caracteres de mayor peso estadístico sugeridas como variables bioprospectivas en comparación a *S. edule* y sus genotipos domesticados, de cuyo grupo sobresalen únicamente por mayor eficiencia biológica *n. xalapensis*, *virens levis* y *n. spinosum*, los cuales son identificados como los tipos comestibles con mayor nivel de domesticación, mientras que *a. minor*, *a. dulcis* y *a. levis* cuyos caracteres morfológicos, bioquímicos y genéticos no contribuyeron significativamente a las variables bioprospectivas, y están más relacionadas al efecto ambiental (Figura 1.2) (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008), resaltando además que están más distantes a *S. chinantlense* y *S. compositum* de sabor amargo, así como a los grupos de frutos verdes de *S. edule*. De acuerdo a Sotelo *et al.* (1995), Lindig-Cisneros *et al.* (1997, 2002) y Gols *et al.* (2008) los genotipos silvestres sintetizan mayor

cantidad de metabolitos secundarios en comparación con las variantes domesticadas (Gept *et al.*, 2004). Dentro de los terpenos se encuentra un grupo de triterpenos conocidos como cucurbitacinas, estrechamente relacionadas con la familia Cucurbitaceae, y se le atribuye el sabor amargo presente en los tipos silvestres de *Sechium*.

Lo anterior permitiría considerar como variables bioprospectivas importantes en la selección de progenitores para cruzamiento genético, a frutos grandes, piriformes, oblongos de color verde oscuro, con espinas y sabor amargo, o bien, que presenten los más altos niveles de clorofila a y b, presencia de cucurbitacinas (ICbE, DHCbE, CbE, ICbD, CbB, DHCbB, DHCbD y CbQI) asumiendo una posible asociación con las respectivas bandas polimórficas (Eguiarte, 2007). Los análisis que determinan distancias han recibido críticas debido que estos no consideran los procesos evolutivos, ya que, varios caracteres que se encuentran correlacionados no evolucionan de manera independiente (Felsenstein, 1985), mientras que los métodos cladísticos tienden a analizar a todos los caracteres de forma individual, contrario a la reducción de información para ser explicado mediante índices de distancias genéticas (Eguiarte *et al.*, 1997). Es importante resaltar que muchas veces un mismo patrón puede explicarse a través de diferentes historias poblacionales (Eguiarte, 2007), lo cual sugiere profundizar en aspectos que guardan relación con el número de genes que determinan un carácter (Piñero *et al.*, 2008). La variabilidad contenida se puede clasificar en características visibles que conforman el fenotipo, y las no visibles, que se refiere a los procesos o productos internos de la planta. Lo anterior sugiere una continua interacción dinámica de adaptación con los factores en los que crece la población, y cada especie, ajusta la información contenida en el genoma de acuerdo a sus necesidades de supervivencia, por ello, resulta importante el manejo de descriptores, características o atributos medibles, para registrar y evaluar las referencias de forma, estructura o comportamiento de una accesión o genotipo, pues estos son de interés para fitomejoradores y agrónomos (Franco *et al.*, 2003). Los resultados sugieren que aun cuando los genotipos son muy próximos taxonómicamente, sobre todo en el complejo de *S. edule*, existen diferencias notables en sus componentes bioquímicos, evidenciando diversidad de metabolitos que pueden ser aprovechados en aplicaciones distintas a las alimenticias, como por ejemplo, terapéuticas o farmacológicas.

Otros estudios farmacológicos han revelado propiedades diuréticas de las semillas, así como, cardiovasculares y antiinflamatorias de las hojas y frutos, (Lira-Saade, 1996). En dicho contexto se ha observado también que extractos de *S. edule* tienen actividad contra bacterias gram-positivas (Ordoñez *et al.*, 2003), mientras que estudios *in vitro* han comprobado su actividad antioxidante (Ordoñez *et al.*, 2006). Reportes realizados con ratas Wistar han mostrado que el extracto de *S. edule* tiene actividad hipotensora (Cambar *et al.*, 1980), además de la capacidad de alterar el marcaje de elementos sanguíneos con el radionúclido tecnecio-99m, alterar la morfología de eritrocitos, promover la fijación de radioactividad en las proteínas sanguíneas y la biodistribución del radio farmacéutico pertecnetato sódico. Otros estudios han registrado que dichos extractos inducen daño a la molécula de DNA, reducen los niveles de glucosa, globulina y la presión sanguínea diastólica. En suma, se sugiere que los efectos biológicos mostrados pueden ser porque el chayote presenta en su composición compuestos que actúan como metabolitos activos *in vivo* con propiedades antioxidantes (Diré *et al.*, 2001, 2002, 2003a, b, 2005). Estudios fitoquímicos en *S. edule* han identificado alcaloides no fenólicos, saponinas, esteroides, triterpenos (Salama *et al.*, 1986) y ocho flavonoides glicosilados (Siciliano *et al.*, 2004), cuyo patrón de compuestos son compartidos por especies taxonómicamente relacionadas (Vicanco *et al.*, 2005) y muchos de ellos asociados con actividad antitumoral (Cragg y Newman, 2005). Estudios realizados por Wu *et al.* (1998) permitieron aislar y caracterizar, a partir de la semilla de chayote, a la proteína sechiumina, molécula con la propiedad de inactivar la función ribosomal en la línea de cáncer cérvico-uterino humano HeLa y se le ubicó como un posible agente quimioterapéutico. Lo anterior es muy relevante y contribuye ampliamente con la búsqueda de alternativas de fuentes naturales para tratamiento de enfermedades de interés público, sin embargo, en el 99% de los estudios farmacológicos y fitoquímicos reportados para *S. edule* no se describe el tipo biológico o grupo varietal evaluado, presentando dificultades de reproducibilidad, y riesgo para su aplicación farmacológica en humanos.

Es relevante mencionar la importancia de una disciplina taxonómica para clasificar a los genotipos de un complejo infraespecífico, como es el caso de *S. edule*, ya que facilita su identificación por caracteres secundarios; y en referencia a lo anterior, el carácter distintivo del concepto varietal es de bajo valor taxonómico, es subjetivo, se presta a discusión y a diferentes interpretaciones, sin embargo Stace (1986), en su concepto de taxonomía informal, resalta que:

“es mucho mejor dar un nombre a cualquiera de las variantes de un complejo infraespecífico, ya que con ello se mejora y disciplina su identificación en labores de investigación y puede prevenir su pérdida, que hacer un agrupamiento masal donde los caracteres secundarios quedan diluidos”, como sería el caso propuesto por Lira *et al.* (1999), quienes agruparon a las variantes domesticadas de *S. edule* en una subespecie, y el tipo silvestre en otra, lo cual y de acuerdo a los resultados discutidos en el presente trabajo, existen fuertes diferencias entre las variantes biológicas, que incluyen caracteres morfológicos, bioquímicos y genéticos, sin alcanzar la categoría de sub especie. De acuerdo a Pinedo-Vásquez *et al.* (2000), la jerarquía varietal se establece de forma intermedia entre la especie y la subespecie, y describen a la variedad (no cultivar agronómico) como aquella que tiene un suficiente número de caracteres distintivos de genes en común y que se mantienen en las poblaciones a través de una reproducción panmíctica (cruzamiento fortuito o azaroso) dentro de la propia zona geográfica de adaptación, mientras que la subespecie se ubica en un área geográficamente distinta, por ejemplo; a *S. chinantlense* en el valle de la Chinantla, Oaxaca, y a *S. compositum* en la región del Soconusco, Chiapas, México.

1.6 Conclusiones

El meta análisis llevado a cabo en tres especies de *Sechium* tomando en cuenta variables morfológicas, bioquímicas, de actividad biológica funcional y caracterización genética, permitió transformar conclusiones de estudios independientes a recomendaciones integradas mediante un enfoque holístico y estudio retrospectivo, identificando como principales variables bioprospectivas al color verde oscuro, sabor amargo, presencia de espinas, forma oblonga, forma piriforme, presencia de ocho cucurbitacinas (ICbE, DHCbE, CbE, ICbD, CbB, DHCbB, DHCbD y CbQI), los valores más altos de clorofila a y b. Los resultados de bandas polimórficas representativas mostraron 62 bandas para los caracteres apomórficos, y 67 para los simpleiomórficos en los genotipos *S. chinantlense* y *S. compositum*; y con el apoyo de análisis multivariado resultaron relevantes 100 de un total de 188 bandas polimórficas, ubicadas en cinco componentes principales. Es importante considerar de forma estricta la identificación taxonómica (formal e informal) de la variante biológica evaluada, ya que aun cuando pertenecen a la misma especie, registran grandes diferencias morfobioquímicas, genéticas y de actividad biológica funcional.

1.7 Bibliografía

- Aguiñiga-Sánchez I., M. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, L. Ruíz, J.D. Cadena-Zamudio, A. González, E. Santiago. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and cancer*, 67(2):250-257. 10.1080/01635581.2015.989370
- Aguiñiga-Sánchez, I. 2013. Potencial antileucémico in vitro de extractos de cuatro genotipos de *Sechium* spp. (Cucurbitaceae). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 95 p.
- Aguiñiga-Sánchez, I. 2017. Efecto antitumoral in vivo de *Sechium P. Browne* (Cucurbitaceae), Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 262 p.
- Alatorre G. 1995. Bioprospección, ¿una herramienta para el manejo sostenible de los recursos naturales? Diálogos, propuestas, historias para una Ciudadanía Mundial. México; Disponible en: URL: <http://base.d-p-h.info/es/fiches/premierdph/fichepremierdph-1858.html>
- Artuso A. 2002. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. *World Development*. 30(8), 1355-1368.
- Bishayeen A., S. Ahmed, N. Brankov, M. Perloff. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 16, 980.
- Cadena-Iniguez J., C.H. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L.M. Ruíz-Posadas, J.F. Aguirre-Medina, L. Arévalo-Galarza. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 835-847.
- Cadena-Iñiguez J. 2005. Caracterización Morfoestructral, Fisiológica, Química y Genética de Diferentes Tipos de Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Tesis Doctorado en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 137 p.

- Cadena-Iñiguez J., L. Arévalo-Galarza., C.H. Avendaño-Arrazate, M.R. Soto-Hernández, Ruiz-Posadas, L., E. Santiago-Osorio, D. Ochoa. 2007. Production, genetics, postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fresh produce, 1(1), 41-53.
- Cadena-Iñiguez J., M.R. Soto-Hernández, M. Arévalo-Galarza, C.H. Avendaño-Arrazate, J.F. Aguirre, L. M. Ruíz-Posadas. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. Revista Chapingo. Serie horticultura, 17(SPE. 2), 45-55. Cadena-Iñiguez, J., Soto, M., Torres, A.,
- Cadena-Iñiguez, J., M.R. Soto-Hernández, A. Torres, I. Aguiñiga-Sánchez, L.M. Ruíz-Posadas, A. Rivera, E. Santiago-Osorio. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties *Sechium edule* (Jacq.) Sw. on tumour cell lines. Journal of medicinal plants research, 7(8): 455-460.
- Cadena-Zamudio J.D. 2013. Inducción de la fragmentación del ADN en líneas leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. (Tesis Licenciatura de Biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores. México, D.F., 95 p.
- Camacho C. P. C., F. A. A. Gutiérrez. 2002. Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. Revista Colombiana de Biotecnología, 4(1), 100-106.
- Cambar, P., P. Portillo, E. Tabara, Pineda, L., Tovar, O., Casco, J., Alvarado, C., Díaz, G., Casco, B., Cantillo, L. (1980). Estudio preliminar sobre las acciones farmacológicas de *Sechium edule*. Revista Médica de Honduras, 48:97-99.
- Cordero C. 2002. Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anti cáncer de extractos vegetales, empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Trabajo de grado. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia, 100-106 p.

- Córdoba M., C. Bruno, M. Balzarini, J. L. Costa. 2012. Análisis de componentes principales con datos georreferenciados: Una aplicación en agricultura de precisión. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 44(1), 27-39.
- Cragg, G., D. Newman. 2005. Plants and source of anticancer agents. Journal of Ethnopharmacology, 100(1):72-79.
- De Luna E. 1995. Bases filosóficas de los análisis cladísticos para la investigación taxonómica. Acta Botánica Mexicana, (33), 63-79.
- De Luna E., J.A. Guerrero, T. Chew-Taracena. 2005. Sistemática biológica avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. Hidrobiológica, 15(3), 351-370.
- De Sousa M., A. Ribeiro. 2009. Revisión sistemática y meta análisis de estudios de diagnóstico y pronóstico: una guía. Arq Bras Cardiol, 92(3), 235-245.
- Díaz S., M. Piñeros, O. Sánchez. 2005. Detección temprana del cáncer de mama: aspectos críticos para un programa de tamizaje organizado en Colombia. Rev Colomb Cancerol, 9(3), 93-105.
- Diré, G. F., L. A. Dias, G. J. Vilela, L. C. Brito, S. F. Soares, M. L. Gomes, M. L. Fernandes. 2005. Evaluation of the biological effects of a natural extract of chayotte (*Sechium edule*): a radiolabeling analysis.
- Diré, G., E. Lima, D. Mattos, M. B. Oliveira, M. J. Pereira, S. Moreno, M. Bernardo. 2001. Effect of chayotte (*Sechium edule*) extract on the biodistribution of technetium-99m and on the morphometry of red blood cells. Journal of labelled compounds and radiopharmaceuticals, 44(S1), S648-S650.
- Diré, G., E. Lima, M. Gomes, M. Bernardo-Filho. 2003. The effect of a chayotte (*Sechium edule*) extracts (decoct and macerated) on the labeling of blood elements with Technetium-99m and on the biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate in mice: an in vitro and in vivo analysis. Pakistan journal of nutrition, 2(4), 221-227.

- Diré, G., E. Lima, M. Gomes, S. Moreno, M. Faria, R. Jales, M. Catanho, F. Bernardo. 2003. Evaluation of the Biological Effects of a Natural Extract of Chayotte (*Sechium edule*): A Molecular and Cellular Analysis. *Pakistan journal nutrition*, 4:249-253.
- Diré, G., E. Lima, M. Pereira, M. Oliveira, S. Moreno, R. Mattos, F. Bernardo. 2002. Effect of a chayotte (*Sechium edule*) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m: in vitro and in vivo studies. *Cell Molecular Biology*, 48:751-755.
- Eguiarte L. V. Souza, J. Nuñez-Farfán, B. Hernández-Baños. 1997. El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. *Bol. Sac. Bot. México* 60: 169-181
- Eguiarte L., V. Souza, X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. IEPSA. 591(1), 42-152.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using thebootstrap. *Evolution* 39: 783-791
- Ferreira I., G. Urrútia, P. Alonso-Coello. 2011. Revisiones sistemáticas y meta análisis: bases conceptuales e interpretación. *Revista Española de Cardiología*, 64(8), 688-696.
- Firdous S., K. Sravanthi, R. Debnath, K. Neeraja. 2012. Protective effect of ethanolic extract and its ethylacetate and n-butanol fractions of *Sechium edule* fruits against carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1), 354-9.
- Franco T.L., R. Hidalgo. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Boletín técnico No.8*. Instituto internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cal, Colombia, 89 p
- Freshney R. 2010. *Culture of animal cell. A manual of basic technique*. John Wiley and sons Inc. New York. Doi. 10.1002/9780470649367
- Futuyma D., M. Keese, D.Funk. 1995. Genetic constraints on macroevolution: the evolution of host affiliation in the leaf beetle genus *Ophraella*. *Evolution*, 797-809.
- Gepts, P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant breeding review*. 24(2):1-44.

- Gols, R., R. Wagenaar, Bukovinszky, N. Van Dam, M. Dicke, J. Bullock, J. Harvey. 2008. Genetic variation in defense chemistry in wild cabbages affects herbivores and their endoparasitoids. *Ecology*, 89(6):1616-1626.
- González I., G. Urrútia, P. Coello. 2011. Revisiones sistemáticas y metaanálisis: bases conceptuales e interpretación. *Revista Española de Cardiología*, 64(8), 688-696.
- González-Ugarte A. 2014. Producción diferencial de citocinas promotoras e inhibidoras de la proliferación mieloide en el sobrenadante de cultivos de la línea celular wehi-3, células de médula ósea de ratón normal y suero de ratones tratados con extractos de *Sechium* spp. (Tesis Licenciatura en biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F, 100 p
- Grant R.P., R. Grant. 2006. Evolution of Character Displacement in Darwin's Finches. *Science* 14 July 2006: Vol. 313. no. 5784, pp. 224 – 226. DOI: 10.1126/science.1128374.
- Hernández-Manrique R.D. 2002. El meta análisis: consideraciones sobre su aplicación. *CES med*, 16(1), 55-65.
- Jordano P. 2003. Coevolución: patrones y procesos. Universidad de Sevilla-CSIC. 2000. Curso de doctorado "Biogeografía y Evolución" Programa de Biología Vegetal y Ecología 1999-2003
- Kamble M.B., R.K. Dumbre, V.D. Rangari. 2008. Hepatoprotective activity studies of herbal formulations. *Int J Green Pharm*; 2:147-51.7. Gordon EA, Guppy LJ, Nelson M. The antihypertensive effects of the Jamaican Cho- Cho (*Sechium edule*). *West Ind Med J* 2000; 49(1): 27-31
- Kitching I. J. 1998. *Cladistics: the theory and practice of parsimony analysis* (No. 11). Oxford University Press, USA, 121 p.
- Lanyon S. M. 1985. Detecting internal inconsistencies in distances data. *Systematic Zoology* 34: 397-403

- Lindig, R., Benrey, B., Espinosa-García, F. (1997). Phytoalexins, resistance traits, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *Journal of chemical ecology*, 23(8):1197-1201.
- Lira R. 1996. Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 58 p.
- Lira R., J. Castrejon, S. Zamudio, C. Rojas-Zenteno. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, (49):47-61.
- Mans D.R.A., A.B. Da Rocha, G. Schwartzmann. 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5:185-198
- Martínez F., J. Meca, J. López, 2009. El metaanálisis en el ámbito de las Ciencias de la Salud: una metodología imprescindible para la eficiente acumulación del conocimiento. *Fisioterapia*, 31(3), 107-114.
- Melgarejo L. 2013. Bioprospecting as a possible development mechanism for Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 19-30. Retrieved February 28, 2017, from
- Mendoza M., G. Pérez-Ponce 1998. Relaciones filogenéticas entre las especies del género *Cynoscioncola* (Monogenea: Microcotylidae). *Revista de biología tropical*, 46(2), 355-368.
- Monroy-Vázquez M. 2009. Estudio biodirigido de *Sechium edule* (Jacq.) sw. (Cucurbitaceae) (Tesis Maestría en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 66 p.
- Monroy-Vázquez M., M.R. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, E. Santiago-Osorio, L.M. Ruiz-Posadas, H. Rosas. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia*, 43(8), 777-790.

- Morrone, J. J. 2003. El lenguaje de la cladística. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 110 p
- Mumtaz S., S. Paul, A. Bag. 2012. Effect of *Sechium edule* on chemical induced kidney damage in experimental animals. Bangladesh Journal of Pharmacology, 8(1):28-35.
- Neeraja K., R. Debnath, S. Firdous. 2015. Cardioprotective activity of fruits of *Sechium edule*. Bangladesh Journal of Pharmacology, 10(1):125-130.
- Newstrom L. 1986. Studies and the origin and evolution of chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae). Thesis Ph.D. University of California. Berkeley, California, 149 p.
- Nixon KC, QD.Wheeler. 2002. An amplification of the phylogenetic species concept. Cladistics 6(3):211-223.
- Núñez-Colín C.A., D.E. López. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. Agronomía Mesoamericana, 22(2), 415-427.
- NTSYS pc versión 2.21. 2008. Numerical taxonomy and multivariate analysis system
- OMS. 2014. Organización Mundial de la Salud. Página de web: www.who.
- Ordoñez A., J. Gómez, N. Cudmani, M. Vattuone, M. Isla. 2003. Antimicrobial activity of nine extracts of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. Microbial ecology in health and disease, 15(1):33-39
- Ordoñez A., J. Gómez, M. Vattuone. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. Food chemistry, 97(3):452-458.
- Ostrander, E.A. 2008. Base genética de la morfología canina. Investigación y ciencia, 376:26-34
- Pardo C., J. Guzmán, O. Rodríguez. 2013. Cáncer en la Unidad de Cancerología de Huila, 2006-2008. Revista Colombiana de Cancerología, 17(2), 62-68.
- Petronelli A., G. Pannitteri, U. Testa. 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. Anti-cancer drugs, 20(10), 880-892.

- Pinedo-Vasquez M., C. Padoch, D. Mcgrath, T. Ximenes. 2000. Biodiversity as a product of small holders' strategies for overcoming changes in their natural and social landscapes: a report prepared by the Amazonia cluster. *Plec News and Views* 15: 11-21
- Piñero D. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-435.
- Reyes C.R. 1999. Prueba de Bootstrap para hipótesis de no preferencia en estudios con variables dicotómicas. Colegio de Postgraduados, Estado de México. pp1662
- Reyes E. 2012. Estudio del chayote (*Sechium edule* (Jacq.) SW.). (Monografía para obtener título licenciatura en biología). Universidad Veracruzana Córdoba, Veracruz.
- Richardson L.C., L.A. Pollack. 2005. Therapy insight: influence of type 2 diabetes on the development, treatment and outcomes of cancer. *Nature clinical practice Oncology*, 2(1), 48-53.
- Rivera-Martínez R. 2011. Efecto del extracto *Sechium chinantense* lira & f. *chiang.*, *Sechium compositum* (Donn. sm.) c. Jeffrey y el híbrido h-387-07-gisem sobre la proliferación de la línea celular HeLa y L929. (Tesis licenciatura de biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F., 68 p.
- Riviello-Flores L.M. 2015. Evaluación de compuestos de importancia funcional en jugo de dos genotipos *Sechium edule* (jacq.) sw. (Tesis Maestría en ciencias). Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba. Amatlán de los reyes, Veracruz, 93 p.
- Salama A., A. Polo, C. Contreras, L. Maldonado. 1986. Análisis fitoquímico preliminar y determinación de las actividades antiinflamatoria y cardíaca de los frutos de *Sechium edule*. *Revista colombiana ciencias químicas farmacológicas*, 15:79-82.
- Salazar-Aguilar S. 2016. Microencapsulación de extractos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) con fines terapéuticos (Tesis Doctorado en ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 101 p.
- SAS Institute Inc.2008 SAS/ETS 9.2. User guide. SAS Institute Inc., Cary, NC. 7869 p.

- Sateesh G., S. Hussaini, G. Kumar, B. Rao. 2012. Antiulcer activity of *Sechium edule* ethanolic fruit extract. The Pharma Innovation, 1(5).
- Setzer, W., M. Setzer. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini reviews in medicinal chemistry, 3(6):540-556.
- Siciliano T., N. De Tommasi, I. Morelli, A. Braca. 2004. Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 52(21), 6510-6515.
- Siciliano, T., De Tommasi, N., Morelli, I., A., Braca. (2004). Study of flavonoids of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) different edible organs by liquid chromatography photodiode array mass spectrometry. Journal of agricultural and food chemistry, 52(21), 6510-6515.
- Siddall, M. E., M. F., Whiting. (1999). Long-branch abstractions. Cladistics, 15(1), 9-24. Siddall,doi:10.1111/j.1096-0031.1999.tb00391
- Sneath, P. H., R. R. Sokal. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification, 573 p.
- Soler J.J. 2002. Evolución la base de la biología. Estación experimental de zonas áridas (C.S.I.C.) Selección natural y adaptación Capítulo 7: 127-212: Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Sosa-Hernández N. 2008. Evaluación del efecto de extractos de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. sobre la proliferación y citotoxicidad en líneas celulares tumorales L929 Y HeLa. (Tesis Licenciatura en Biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F., 55 p
- Sotelo, A., Sousa, H., Sanchez, M. (1995). Comparative study of the chemical composition of wild and cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*). Plant foods for human nutrition, 47(2):93-100.
- Srivastava V., A.S.Negi, J.K. Kumar, M.M. Gupta. 2005. Plant-based anticancer molecular: A chemical and biological profile of some important leads. Bioorganic Med Chem 13, 5892–5908.

- Stace C.A. 1986. The present and future infraspecific classification of wild plants. The Systematics Association Special Volume No. 29:10-20
- Tamayo J., G. Peña, C. de la Paz, C. Pacheco, Y.A. Campusano. 2016. *Sechium edule* (Jacq.) Sw: potencia fitoterapéutica como agente antibacteriano. *Medisur*, 14(6).
- Tiburcio-Felix R. 2011. Efecto de extractos crudos de especies silvestres de *Sechium* spp. (*S. chinantlense* (Lira & Chiang) *S. compositum* (J.D. Smith) Jeffrey y un híbrido H-387-07-Gisem, sobre proliferación de líneas leucémicas mieloides de ratón) (Tesis licenciatura en biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. México, D.F., 59 p.
- Uriostegui-Arias M.T. 2014. Análisis fitoquímicos y efecto antirproliferativo de genotipos de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. sobre cáncer de mama (Tesis Maestría en ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 78 p.
- Vega Á.E., R. Velasco-Lezama, M. Jiménez-Estrada. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Revisión. Bioquímica*, 31(3), 97-111.
- Vigneri V. P., F. Frasca, L.Sciacca, G. Pandini, R.Vigneri. 2009. Diabetes and cancer. *Endocrine-related cancer*, 16(4), 1103-1123.
- Vivanco, J., E. Cosio, V. M. Loyola, H. Flores. 2005. *Investigación y ciencia*, 341(2):68-75.
- Wu, T., L. Chow, J. Lin. 1998. Sechiumin, a ribosome-inactivating protein from the edible Gould, *Sechium edule* Swartz. Purification, characterization, molecular cloning and expression. *European Journal of Biochemistry*, 255: 400-408.
- Zimmet P., K.G. Alberti, D.J. Magliano., P.H. Bennett. 2016. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature Reviews*. 12: 616–622.
- Zurita M. 2002. Los genes homeóticos y el desarrollo de la mosca de la fruta. *Ciencias* 65, enero-marzo, 32-37

CAPÍTULO II. VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Sechium* P. Browne (Cucurbitaceae) EVALUADA CON MARCADORES AFLP's

Resumen

La diversidad reportada de *Sechium* P. Browne, así como datos lingüísticos y documentos precolombinos, señalan a este género originario de Mesoamérica. La clasificación taxonómica para *Sechium*, se realizó con base a clasificaciones morfológicas y cromosómicas, sin embargo, se ha reportado que algunos caracteres son influidos por factores ambientales modificando el fenotipo sin alterar al genoma. En la actualidad para trazar líneas poblacionales se emplean herramientas moleculares que permiten la generación de mayor información, donde los AFLP's, se emplean a desconocimiento de la secuencia de ADN del material de interés. En México son pocas las investigaciones encaminadas a evaluar la diversidad genética de accesiones *Sechium*, a pesar de que ciertas variantes biológicas se reportan con potencial para el desarrollo de suplementos antineoplásicos. Se evaluó la diversidad genética de una muestra de 95 accesiones de tres especies de *Sechium*, con el fin de identificar afinidades genéticas que faciliten la selección de variantes biológicas para mejoramiento genético. Se evaluó mediante ocho combinaciones de AFLP's reportando solo las cuatro más polimórficas (EcoRI ACC + MseI 1 CAC, EcoRI ACC + MseI CAT, EcoRI ACC+ MseI CGC y EcoRI ACC+ MseI CGG), el ADN se obtuvo de hojas de 95 accesiones del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* México, organizadas en tres poblaciones con base en el sabor del fruto (dulces, neutros y amargos). Se obtuvo un porcentaje de polimorfismo promedio 47.91, Heterocigocidad promedio de 0.16, bandas polimórficas 32.83 y F_{st} con valor cero, así como, un análisis de PCoA con GenAIEx 6.5 y AFLPsurv v 1.0, observándose, que la mayoría de accesiones domesticadas (dulces y neutros) se separan de los tipos de sabor amargo. La matriz de Neighbor-Joining con distancias mediante MEGA v 7., generó un árbol monofilético, mostrando flujo genético entre todos los tipos y especies, sin barreras reproductivas aparentes, identificando que *S. compositum* y *S. chinantlense* son genotipos derivados de *S. edule*.

Palabras Clave: Anticancerígeno, chayote, diversidad, Mesoamérica,

2.1 Introducción

A diferencia de lo que ocurre con otras especies cultivadas, en *Sechium* P. Browne (Cucurbitaceae) no existen evidencias arqueológicas o relictos que ayuden a precisar la antigüedad de su origen y manejo. La testa suave de la semilla y su fruto carnoso no permiten su conservación (Lira, 1995). La mayor evidencia de su origen es la existencia de chayotes silvestres en la región centro y sur de México y Centro América. Se considera que el término moderno chayote es una modificación de los vocablos Náhuatl “*chayotl*”, “*chayotli*” y “*huitzayotl*”, lo cual, confirmaría su uso desde tiempos precolombinos (Cook, 1901; Cadena-Iñiguez, 2005). En la búsqueda del origen de *S. edule*, Newstrom (1986), realizó colectas de los parientes silvestres en los Estados de Oaxaca y Veracruz, México, y clasificó lo encontrado, con base en la variación morfológica de los frutos, como chayotes silvestres tipo I y tipo II. De acuerdo a Cruz-León (1985-86), el chayote silvestre tipo I, podría ser reliquia de los verdaderos ancestros silvestres del chayote domesticado, mientras que el chayote tipo II, pudo ser el resultado de cruzamientos espontáneos de plantas silvestres con los ya domesticados, favorecidos por la proximidad de las áreas de cultivo. Trabajos realizados por Lira y Chiang (1992), Lira (1995), Lira-Saade (1996), y Lira *et al.* (1999), no mostraron evidencias de la existencia de algún ancestro de los actuales parientes silvestres. Durante muchos años se consideró que *Sechium* era un género monotípico cuya única especie era *S. edule* (Jacq.) Swartz, sin embargo, Jeffrey (1978), incluyó otras seis especies con las secciones *Frantzia* y *Polakowskia*. Sin embargo, diversos autores han considerado que por lo menos *Polakowskia* y *Frantzia* están muy distantes del centro de origen de *Sechium* y taxonómicamente son diferentes. Actualmente se consideran sinónimos de *Sechium* a los siguientes taxones: *Sicyos edulis* Jacq., *Chayota edulis* Jacq., *Sechium americanum* Poir., *Cucumis acutangulus* Descourt., y *Sechium chayota* Hemsley (Flores, 1989; Lira y Chiang, 1992; Becerra, 1996), y se acepta en el género *Sechium* a diez especies; ocho silvestres: *S. chinantlense*, *S. compositum*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, *S. vilosum*) y dos cultivadas *S. tacaco* y *S. edule* con una distribución desde México hasta Panamá (Lira-Saade, 1996). Lira *et al.* (1999), hicieron una propuesta de clasificación taxonómica para *S. edule*, donde incluyeron dos subespecies: *Sechium edule* ssp *edule* y *Sechium edule* ssp *silvestre*. Las consideraciones en que dichos autores fundamentaron esta separación fueron diferencias morfológicas y cromosómicas a través de la

identificación de cariotipos. En México se ha reportado importante variación en los estados de Chiapas, Oaxaca y Veracruz, y se ha documentado presencia de *S. hintonii*, *S. chinantlense*, *S. compositum* y *S. edule*, donde este último principalmente es aprovechado como alimento (Lira-Saade, 1996). Con el apoyo de la caracterización morfoestructral, bioquímica y genética (cadena-Iñiguez *et al.*, 2008, 2011, 2013), se han descrito 12 grupos varietales en *S. edule*, lo cual ha permitido su identificación, conservación e investigación de forma disciplinada, resaltando caracteres estables y heredables. Sin embargo, existen caracteres que responden ante factores ambientales (Azofeifa-Delgado, 2006) generando expresiones epigenéticas (Phillips *et al.*, 1995) modificando el fenotipo sin alterar el genoma (Clegg y C. 1999). Eguiarte (2007), señala que un mismo patrón puede ser explicado por diferentes historias poblacionales y para trazar estas líneas se requiere emplear herramientas moleculares, con las cuales se puede generar información con un número ilimitado de marcadores. Un marcador se refiere a cualquier molécula, ya sea, proteína, ARN o ADN que presenta un peso molecular conocido y que logra ser monitoreado (Azofeifa-Delgado, 2006), y permiten identificar diferencias genéticas entre individuos o especies, y actúan como señales próximas a genes que controlan la característica de interés (Collard *et al.*, 2005). El desarrollo de técnicas que emplean ADN han generado perfiles genéticos únicos por cada organismo (Barrett *et al.*, 1998; Aggarwal *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2002), ya sea, determinando aspectos dominantes o codominantes (Clegg *et al.*, 1999). Cabe resaltar que estas herramientas moleculares son confiables y sensibles y no son influidas por el ambiente, y no dependen del estado fisiológico del individuo, permitiendo evaluaciones filogenéticas, de diversidad y organización del genoma (Árcade *et al.*, 2000; Barrazán-Morales *et al.*, 2006; Gill-Langarica *et al.*, 2008). Entre algunas técnicas empleadas se encuentra el polimorfismo en el fragmento de restricción (RFLP) (Valadez *et al.*, 2000), el locí de caracteres cuantitativos (QTL) (Miklas *et al.*, 2006), intermicrosatélites (ISSR) (Huang *et al.* 2009), microsatélites (SSRs) (Azpilicuenta *et al.* 2004), polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD) (Torres *et al.* 2003), y polimorfismo en la longitud de fragmento amplificado (AFLP) (Wen-Kun *et al.* 2008) citados por Azofeifa-Delgado *et al.*, (2006) y Gill-Langarica *et al.*,(2008). Esta última técnica ha resultado ser reproducible y genera numerosos fragmentos polimórficos, además su aplicación no requiere conocimiento previo de la secuencia del ADN del material de interés (Vos *et al.*, 1995; Meudt y Clarke 2007). Son pocas investigaciones dirigidas al estudio

de la diversidad genética de las accesiones de *Sechium* P. Browne en México, y es aún menor el número de trabajos realizados con el apoyo de marcadores moleculares (Avendaño-Arrazante *et al.*, 2012; Machida-Hyrano *et al.*, 2015), considerando los avances reportados por Cadena-Iñiguez (2005) y Cadena-Iñiguez *et al.* (2008), que evidenciaron variación infraespecífica en *S. edule*, favoreciendo el agrupamiento de genotipos evaluados con posible intercambio genético entre sí, generando un proceso dinámico de hibridación infraespecífica, obteniendo variantes con diferentes características morfo bioquímicas. A este respecto, en la última década se han realizado evaluaciones *in vivo* e *in vitro* empleando extractos crudos obtenidos a partir de frutos de las especies *S. edule*, *S. chinantlense*, *S. compositum* e híbridos intra e interespecíficos con énfasis en evaluar la actividad antiproliferativa y antineoplásica (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2013; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015; Salazar-Aguilar *et al.*, 2017), por lo cual resulta relevante identificar la diversidad genética de una muestra biológica de *Sechium*, con el fin de describir el dinamismo del proceso de diferenciación genética, sea por domesticación o adaptación al ambiente, que favorezca nuevos planteamientos de uso y conservación. Con base en lo anterior, se realizó un estudio de diversidad genética considerando tres especies de *Sechium*, de las cuales una registra variación infraespecífica atribuida a domesticación y adaptación ambiental, y las otras son silvestres, con el fin de identificar afinidades genéticas que faciliten la selección de variantes biológicas de *Sechium* para mejoramiento genético.

2.2 Materiales y Métodos

El material biológico provino del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechium edule* México (BANGESe), ubicado en Huatusco, Veracruz, México (19° 08'48' N y 97° 57'00" O), con vegetación de bosque Mesófilo de Montaña (bosque nubloso) a 1340 m de altitud y temperatura media anual de 19 °C y 85 % de humedad relativa, con 2250 mm de precipitación anual. Los suelos son luvisoles vítricos, ricos en nutrientes, de fertilidad moderada, textura gruesa y fragmentos de vidrio volcánico, y pH ligeramente ácidos a ácidos (4.3-6.5), ricos en materia orgánica, bajos en calcio y altos en hierro, manganeso y zinc (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2006). El material fue seleccionado y organizado en tres poblaciones con base a características fenotípicas contrastantes (Cuadro 2.1) (Bergmann *et al.*, 1989; Gillet, 1996). Se recolectaron 96 accesiones de chayote, clasificadas en tres grupos de 32 accesiones de acuerdo al sabor del fruto, como

ligeramente dulces de fruto amarillo, otra de color verde con y sin espinas de sabor neutro, y un último de sabor amargo (Cuadro 2.1). La procedencia de las accesiones se muestra en la Figura 2.1 y es con base en los datos pasaporte del BANGESe.

Cuadro 2.1. Accesiones de *Sechium P. Browne* evaluadas mediante AFLPs procedentes del BANGESe , 2016.

Genotipo	Accesión	Genotipo	Accesión
<i>albus levis</i>	761-d	<i>albus levis</i>	764-d
<i>albus spinosum</i>	805	<i>virens levis</i>	N2
<i>virens levis</i>	804-a	<i>albus dulcis</i>	Xa-7b
<i>albus levis</i>	369-b	<i>nigrum xalapensis</i>	646-a
<i>albus dulcis</i>	286-c	<i>virens levis</i>	610-b
<i>nigrum spinosum</i>	803-b	<i>albus minor</i>	330-c
<i>virens levis</i>	273	<i>virens levis</i>	TO2
<i>nigrum minor</i>	698	<i>albus levis</i>	719-b
<i>nigrum xalapensis</i>	530-a	<i>albus levis</i>	719-a
Hibrido(<i>albus minor/perla negra</i>)	709-a	<i>nigrum spinosum</i>	766-d
<i>albus levis</i>	346	<i>virens levis</i>	676
<i>nigrum spinosum</i>	411	<i>albus dulcis</i>	Xa-3
<i>nigrum spinosum</i>	412	<i>nigrum spinosum</i>	735
<i>vires levis</i>	765	<i>albus dulcis</i>	Xa-4
<i>albus levis</i>	761-d	<i>H-D-Victor-1</i>	644-a
<i>albus dulcis</i>	286-d	<i>virens levis</i>	T-10
<i>virens levis</i>	361-a	<i>albus levis</i>	719-b
<i>S.chinantlense</i>	747-e	<i>nigrum xalapensis</i>	628-a
<i>virens levis</i>	726	<i>nigrum xalapensis</i>	628-b
<i>albus minor</i>	709-c	<i>nigrum levis</i>	700
Hibrido (<i>chinantlense</i>)	387	<i>albus minor</i>	330-b
<i>nigrum levis</i>	263-a	<i>nigrum xalapensis</i>	530-b
<i>nigrum maxima</i>	745	<i>albus dulcis</i>	Xa-7a
<i>virens levis</i>	360	<i>nigrum spinosum</i>	746
<i>albus levis</i>	761-b	<i>nigrum xalapensis</i>	747-b
<i>albus levis</i>	761-a	<i>albus dulcis</i>	Xa-7c
<i>virens levis</i>	504	<i>nigrum xalapensis</i>	630-g
<i>virens levis</i>	508-b	<i>albus dulcis</i>	608-b
<i>nigrum xalapensis</i>	750-b	<i>nigrum spinosum</i>	651
<i>albus levis</i>	761-c	Hibrido (<i>HD-Victor</i>)	643-c
<i>nigrum xalapensis</i>	529-a	Hibrido (<i>chinantlense</i>)	387-b
<i>virens levis</i>	516	<i>S.edule silvestre</i>	652-b

<i>virens levis</i>	612-c	<i>S. chinantlense</i>	636
<i>albus dulcis</i>	768-a	<i>Sechium edule silvestre</i>	652-c
<i>nigrum spinosum</i>	802-a	<i>Sechium edule silvestre</i>	659-a
Hibrido	634-c	<i>Sechium edule silvestre</i>	661
<i>S. compositum</i>	20	<i>Nigrum spinosum</i>	658-b
Hibrido (<i>chinantlense</i>)	387-d	<i>Sechium edule silvestre</i>	652-c
Hibrido (HD-Victor 6)	649-a	<i>Sechium edule silvestre</i>	659-e
<i>S. edule</i>	12	<i>nigrum spinosum</i>	657
<i>Sechium edule silvestre</i>	653-d	Hibrido (HD-Victor 5)	648
<i>Sechium edule silvestre</i>	659-e	<i>Sechium edule silvestre</i>	653-d
<i>Sechium compositum</i>	20	<i>nigrum spinosum</i>	658-a
Hibrido(<i>spinosum x compositum</i>)	634-b	<i>Sechium compositum</i>	6
<i>Sechium edule silvestre</i>	653-a	<i>perla negra</i>	631
<i>Sechium edule silvestre</i>	653-b	Hibrido (<i>chinantlense</i>)	H-387-b
<i>Sechium edule silvestre</i>	659-c	<i>Sechium compositum</i>	921
<i>virens levis</i>	610-b	Hibrido (<i>spinosum x compositum</i>)	635-f

2.3 Combinaciones de AFLP's

Las accesiones fueron evaluadas con ocho combinaciones de AFLP's (EcoRI ACC + MseI CAA, EcoRI ACC + MseI CAC, EcoRI ACC + MseI CAG, EcoRI ACC + MseI CAT, EcoRI ACC + MseI CGA, EcoRI ACC + MseI CGC, EcoRI ACC + MseI CGG EcoRI ACC + MseI CGT), de la cuales se seleccionaron las cuatro combinaciones que presentaron mayor número de bandas polimórficas (EcoRI ACC + MseI 1 CAC, EcoRI ACC + MseI CAT, EcoRI ACC+ MseI CGC y EcoRI ACC+ MseI CGG). El ADN se obtuvo a partir de hojas jóvenes y sanas, las cuales fueron conservadas a -80 °C, y liofilizadas en un equipo LABCONCO FREEZONE 12 (-82 °C, 0.0358 mbar; Kansas, USA), y molido en homogeneizador de balines Tissue Lyser II (QUIAGEN) durante 90 segundos a 30 Hz. La extracción de ADN se realizó con el método de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)) según el protocolo de Saghai Maroof *et al.* (1984) modificado, fue necesario 50 mg de material seco y molido por accesión (De león, 1994). La determinación de concentración del ADN se realizó mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) con una relación de lectura de 260/280 nm, obteniendo concentraciones de 100-300 ng µl⁻¹. Se evaluó la integridad del ADN en gel de agarosa (1%), a una dilución de 10 ng µl⁻¹, se aplicó 100 µg por accesión; las condiciones de corrida fueron 80

volts durante 45 minutos. El ADN integro fue ajustado a una concentración de 100 ng μl^{-1} del cual se tomaron 2 μg por reacción para el desarrollo de metodología de AFLP según Vos *et al.* (1995) modificado. Para la digestión del ADN se emplearon las enzimas de restricción de corte raro EcoRI que reconoce 6-8 pb y de corte frecuente la MseI que reconoce 4 pb (Gonzaga-Gutierrez, 2004). Para la ligación se emplearon adaptadores MseI (GACGATGAGTCCTGAG) y EcoRI (AATTGGTACGCAGTC). La reacción de PCR se preparó con RedTaq Mix Ready Mix PCR Reaction Mix (Sigma Aldrich) a 1 X, la concentración final de los iniciadores fue diferente del iniciador MSE I, del cual se requirió 5 μM , mientras que el iniciador EcoRI marcado con el fluoróforo FAM (Sigma Aldrich), fue de 3 μM . Se añadieron 3 μl de producto de pre-amplificación, el cual, fue previamente diluido en 80 μl de H_2O tipo 1, el volumen final para esta reacción se ajustó a 10 μl con agua tipo 1. Las condiciones de PCR-selectiva fueron la desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 40 segundos; 54 °C por 40 segundos; 72 °C por 30 segundos; y una elongación final a 72 °C durante 40 minutos. Los productos de la amplificación selectiva fueron separados en geles de poliacrilamida al 6 %, a 200 volts durante tres horas, los geles se tiñeron con nitrato de plata, posteriormente los productos de PCR-selectiva se evaluaron en secuenciador capilar 3500 XL (Genetic Analyzer), condiciones de corrida AFLP's predeterminado en equipo, con los datos de amplificación, se generó una matriz binaria de presencia y ausencia (1/0), la matriz binaria fue generada mediante el software Gene Mapper (Applied Biosystems). Para en análisis de coordenadas principales, porcentaje de polimorfismo por banda y porcentaje de variación explicada, se realizó el análisis con los programas GenAIEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) y AFLPsurv v 1.0 (Vekemans *et al.*, 2002), mientras que para la generación del árbol filogenético se realizó con el paquete Phylip 3.695 (Felsenstein, 2013) y MEGA v 7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016) mediante el análisis Neighbor-Joining, con una matriz ausencia presencia de distancias calculada mediante la fórmula de Nei-Lynch.

2.4 Resultados y discusión

De las ocho combinaciones evaluadas cuatro fueron seleccionadas por presentar mayor patrón de bandas polimórficas. Las combinaciones mostraron buena calidad informativa (Gonzaga, 2004), generando entre 48-108 bandas, cuando normalmente se logra amplificar de 50 a 100 fragmentos

en cada reacción de AFLP's (Laport *et al.*, 2016) y generando un total de 274 bandas polimórficas para 95 muestras amplificadas. Obteniendo los siguientes valores por combinación evaluada (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Valores determinados en GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) y AFLPsurv (v1.0 Vekemans *et al.*, 2002). Primer valor de columna corresponde a GenAIEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), y segundo valor por AFLPsurv (v1.0 Vekemans *et al.*, 2002).

combinación Eco RI+ (Aflps)	Polimorfismo (%)			Heterocigosidad esperada (He)			Bandas polimórficas (Núm.)		
	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
Poblaciones	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
Mse1 CAC	45.20**	66.59	78.28	0.15	0.16	0.18	27	32	35
	43.10***	47.80	56.20	0.15	0.16	0.18	25	28	32
Mse1 CAT	62.50	79.92	87.50	0.18	0.17	0.20	28	27	36
	52.10	54.20	66.70	0.19	0.18	0.21	25	26	32
Mse1 CGA	49.20	61.90	47.60	0.08	0.10	0.12	27	30	37
	25.40	36.50	47.60	0.08	0.10	0.12	16	23	30
Mse1CGG	70.37	47.07	49.63	0.16	0.16	0.19	58	63	37
	43.50	46.30	55.60	0.17	0.18	0.20	47	50	60
Promedio	56.82	63.87	65.75	0.15	0.15	0.17	35	38	36.25
	41.06	46.20	56.53	0.15	0.15	0.18	28.25	31.75	38.5

*Cada población corresponde a un grupo de chayote: 1= chayotes dulces; 2= chayotes neutros; 3= chayotes amargos. **Obtenido con GenAIEx 6.5; *** Obtenido con AFLPsurv v1.0

El cuadro 2.2, muestra los parámetros de porcentaje de polimorfismo, heterocigosidad esperada (He) y número de bandas polimórficas obtenidos con GenAIEx 6.5, y AFLPsurv 1.0, por población, y combinación de AFLP's. De las tres poblaciones evaluadas, la tercera (chayotes amargos) presento los índices más elevados en los tres parámetros (Cuadro 13), indicando ser la población con mayor variación (Eguiarte, 2007) compuesta por los tipos silvestres de *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum*. La población uno compuesta por chayotes de sabor dulce, color amarillo y sin espinas, fue el grupo más diferenciado morfológicamente respecto a las poblaciones 2 y 3, sin embargo, mostraron los niveles más bajos de heterocigosidad (0.1502), atribuido a que las diferencias fenotípicas son producto de la adaptación ambiental (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008; Cadena-Iñiguez, 2005). Valores similares de heterocigosidad fueron obtenidos por la población dos de chayotes con frutos verdes, sabor neutro con y sin espinas

(0.1542), que incluyó a los chayotes de mayor preferencia por el consumidor. Sherry *et al.* (2013) y Bourguiba *et al.* (2013) señalan que las variedades domesticadas pueden registrar mayor diferenciación genética respecto al ancestro silvestre por efectos de la domesticación, sin embargo, son en conjunto menos diversos genéticamente. El promedio de bandas polimórficas fue de 32.83 de un total de 68.5 bandas amplificadas, de lo cual, 47.92% fueron informativas, consideradas como un buen acercamiento para la diversidad genética de la muestra de *Sechium*. La combinación CGG presentó el mayor polimorfismo por locí, y mayor número de bandas; mientras que la combinación CAT fue la que registró los valores más altos de heterocigosidad para las tres poblaciones. Los valores estadísticos de F_{st} o índice de fijación de Wright (Vekemans *et al.*, 2002) estiman la diferenciación genética entre poblaciones (Eguiarte, 2007), y en el presente estudio, oscilaron entre 0 y 0.1123, lo cual indicó baja diferenciación entre accesiones, basado en el modelo de islas, que indica que las poblaciones presentan una distribución continua o discreta, y el aislamiento por distancia influye negativamente el flujo génico (Wright, 1951). Para este estudio, se considera que existe un balance entre deriva génica y flujo génico, dado que los valores F_{st} están cercanos a cero (Eguiarte, 2007). La diversidad genética total (H_t) fue de 0.1725 para la combinación CAC, y de 0.1947 para CAT; de 0.1029 para CGA y de 0.1897 para la combinación CGG. La Figura 2.1, muestra la distribución de coordenadas principales (GenAIEx 6.5), donde una serie corresponde a accesiones de frutos sabor dulce y liso, otra serie a la población con sabor neutro, color verde claro con y sin espinas, y la serie tres, con chayotes de sabor amargo, color verde oscuro con y sin espinas.

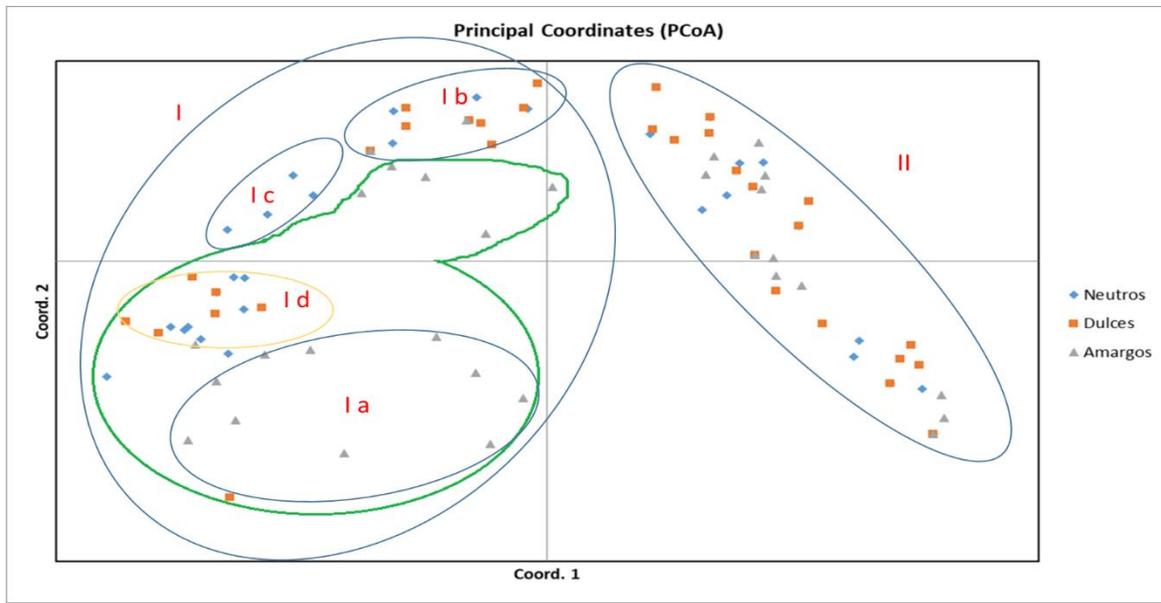


Figura 2.1. Distribución de coordenadas principales (GenAIEx 6.5) de 95 accesiones de *Sechium P. Browne* con la combinación de AFLP's Cat. La serie uno corresponde a accesiones de sabor dulce y lisos; la serie dos a la población con sabor neutro, color verde claro con y sin espinas, y la tres representa accesiones de sabor amargo, color verde oscuro con y sin espinas. Con tres ejes se explicó el 79.22%, en eje uno con 54.42%, segundo 14.64% y tercer eje 10.18%.

El análisis molecular de varianza (AMOVA) realizado con el programa GenAIEx 6.5, para estimar la partición de la variación de AFLP's dentro y entre poblaciones para las 95 accesiones evaluadas, considerando la matriz de distancia derivada de los datos genotípicos, y basado en procedimientos de permutación (Excoffier *et al.*, 1992; Sonaut *et al.*, 2015), mostró que la variación identificada entre accesiones por marcadores dominantes explicó el 79.22% de la varianza total, considerado como polimorfismo alto comparado con 57.14% reportado por Abdelnour *et al.* (2008) con accesiones de Costa rica, y 59.8% obtenido por Avendaño-Arrazante *et al.* (2012) mediante marcadores isoenzimáticos. La distribución en el presente estudio, fue de 54.42%, para el primer eje, 14.63% para el segundo, y 10.18% para el tercero. Las diferencias entre los autores citados y el presente trabajo, pueden deberse a que en el presente estudio, la muestra incluyó más accesiones, haciéndola, más diversa infraespecífica e interespecíficamente, ya que México centro de origen y domesticación cuenta con la mayoría de los tipos biológicos de

S. edule, *S. chinantlense* y *S. compositum* (Newstrom, 1986; Lira-Saade, 1996; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008). La Figura 2.1, muestra que la dispersión de las accesiones fue en dos grandes grupos separados por los ejes, los cuales a su vez reflejaron diferentes subgrupos, resaltando el formado por accesiones de frutos amargos (Ia), seguido de una dispersión de accesiones con frutos sabor neutro y dulce (Ib, Ic y Id). El sub grupo Ia, incluyó ocho accesiones de *S. edule* silvestre, dos de perla negra, y las accesiones 648 y 649, que son una variedad e híbridos amargos respectivamente derivados del tipo silvestre, así como una de *S. chinantlense* y dos de *S. compositum*. Los sub grupos Ib, Ic Id incluyeron accesiones domesticadas de *S. edule*; sobresaliendo en el primero, genotipos de fruto amarillo y dulces, excepto las accesiones 504 y 726 de *S. edule virens levis* con frutos verde claro y sabor neutro, mientras que el grupo Id contuvo accesiones de *S. compositum*. El grupo II, registró en su dispersión un total de 44 accesiones, de las cuales 36 fueron variantes domesticadas de *S. edule* y dos accesiones silvestre de éste (659), así como dos accesiones híbridas de frutos amargo (387), otra obtenida entre *albus minor* por *nigrum minor var.* Perla negra (709), y dos más obtenidas por cruzamiento interespecífico entre *nigrum spinosum* y *S. compositum* (634, 635), más una accesión de *S. chinantlense* (747). La presencia de los híbridos interespecíficos, aun cuando son amargos, puede explicarse a que *nigrum spinosum* fue emasculada para ser madre receptora del polen de *S. compositum*, transfiriendo mayor número de caracteres morfoestructurales y genéticos. A este respecto, Mousseau *et al.* (2009) y Uller *et al.* (2011), mencionan que el efecto materno, promueve ciertos cambios en el fenotipo, y que han sido heredados genéticamente de la madre. La presencia de la única accesión de *S. chinantlense* en este grupo, sugiere que éste, podría no estar totalmente diferenciado como especie, como lo anota Lira-Saade (1996), ya que al igual que en el caso de *S. compositum*, los cruzamiento se realizan con variantes domesticadas sin aparentes barreras reproductivas. Es claro que no existe un patrón definido en la dispersión de este grupo, y es posible atribuirlo a que todas las accesiones provienen de diferentes áreas geográficas, sugiriendo rutas diferentes de domesticación o adaptación al ambiente. Un ejemplo de lo anterior son las accesiones 804 y 508 de *virens levis* procedentes de Jalisco y Oaxaca, México respectivamente, cuya dispersión correspondió a grupos distintos, resaltando su distancia genética. El Árbol Neighbor-Joining (Saiton y Nei, 1987) fue elaborado con MEGA 7 (Kumar, Stecher, and Tamura 2016) y comparado con el árbol Phylip3.695 (Felsenstein, 2013) mediante

la fórmula Nei-Lyn para generar una matriz de distancias genéticas. El primer acercamiento es que existe un dinamismo evolutivo que produce un pool genético entre *S. edule*, *S. chinantlense* y *S. compositum*. En los extremos del árbol se aprecia como el grupo uno, contiene chayotes de frutos amargos (652.68, 652.90, 659.73, 657.60, 918.31) correspondientes a *S. edule* silvestre, y el último grupo (7f) a las accesiones 659.85, 635.87, 803.36, 916.23, 360.14 y 387.88, resaltando que en ambos extremos del árbol NJ estas ramificaciones pueden girarse o voltearse, se ubican genotipos silvestres de *S. edule*, dos segregantes de la reproducción del híbrido 387 (amargo), un *virens levis* de Veracruz (sabor neutro), y un *nigrum spinosum* (sabor neutro) de Jalisco, México, relacionados estos últimos con el linaje de dicho híbrido .

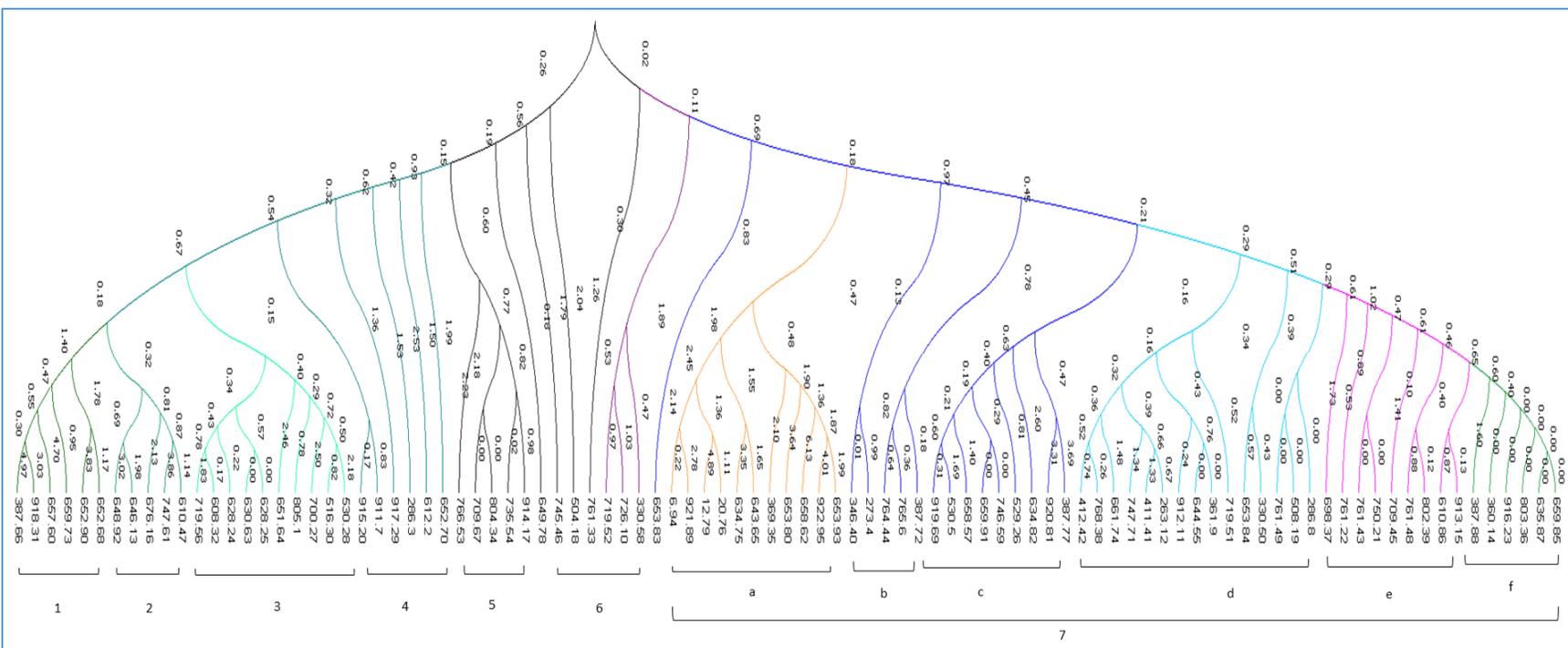


Figura 2.2. Árbol Neighbor-joining de 95 accesiones de genotipos domesticados y silvestres de *Sechium*. Elaborado con MEGA versión 7 (Kumar, Stecher, and Tamura, 2016).

De acuerdo a Cordosa *et al.* (2000) la diferenciación genética entre poblaciones está correlacionada con la distancia geográfica; y García-Mas *et al.* (2000), reportó para el caso de *Cucumis melo* (Cucurbitaceae) que los marcadores por AFLPs lograron separar a las variedades cultivadas de sabor dulce, de las no cultivadas con base en el mayor eficiencia de polimorfismo genético. Los marcadores dominantes AFLP'S permiten la detección de especies o subespecies (Vos *et al.*, 1995), y con base en la Figura 2.2, se observa a *S. edule* silvestre (653.83) como el genotipo raíz, y dentro de sus grupos derivados, se aprecia a *S. chinantlense* (747.61), además de la 6.94, 921.89, 12.79 y 20.76 que corresponden a *S. compositum*, así como, las 634.75 y 643.65 (H-D-Victor), correspondientes a híbridos interespecíficos obtenidos entre *nigrum spinosum* y *nigrum xalapensis* con *S. compositum* (amargos, color verde oscuro, presencia de espinas). Lo anterior sugiere que aparentemente no existen barreras reproductivas entre los genotipos, y que la diferenciación por aislamiento reproductivo de *S. chinantlense* y *S. compositum* no ha sido suficiente para ser especies verdaderas, sino subespecies de *S. edule*; por ejemplo, las accesiones 747.71 y 747.61 son *S. chinantlense* recolectadas en 2011 en dos localidades de la región de la Chinantla, Oaxaca, México, con cercanía a huertos de traspatio con chayotes domesticados de *S. edule*, y se observa que dichos registros se ubican en diferentes extremos del dendograma. El primer genotipo se ubica entre dos accesiones de *nigrum spinosum*, y el segundo entre dos de *viridis levis*; lo cual sugiere la posibilidad de que ambos genotipos sean híbridos espontáneos por proximidad. Lira-Saade (1996) ubica a esta especie como endémica de la región geográfica de la Chinantla, argumentando barreras reproductivas, sin embargo, la evidencia en este estudio muestra lo contrario. La misma Figura 2.2, indica la derivación de los grupos 6 y 7 a partir de *S. edule* silvestre (653.83), sobresaliendo el subgrupo 7a, con seis genotipos de *S. compositum* (6.94, 921.89, 20.76, 634.75, 643.65, 922.95) que parten de *S. edule* silvestre. De acuerdo a los índices de diversidad genética (Heterocigosidad, número de bandas polimórficas, porcentaje de polimorfismo) (Romesburg, 2004), los genotipos no formaron conglomerados estrictos por uniformidad; y comparado con la distribución del árbol Neighbor-Joining se considerara que existe un alto flujo génico entre las tres especies evaluadas de *Sechium*, debido posiblemente a diferentes rutas evolutivas y de adaptación ambiental, ya que la muestra biológica evaluada deriva de la colección núcleo del banco de germoplasma, cuyas procedencias son diversas (Slatkin, 1994; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011; Avendaño-Arrazante *et al.*, 2012), y el ADN fue

extraído de hoja del mismo ejemplar introducido a la colección núcleo del banco de germoplasma.

De acuerdo a la biología evolutiva los individuos están unidos por relaciones de descendencia en patrones jerárquicos de grupos, anidados en otros grupos más inclusivos, lo que permite construir relaciones filogenéticas, como en el presente caso de *Sechium* (De Luna, 1996). La diversidad de los seres vivos surge como consecuencia del proceso de especiación, y consiste en formar una o más especies diferentes a partir de otra ancestral (Grant, 1989). Cierta aislamiento reproductivo induce variaciones genéticas y provoca a su vez variaciones morfológicas, fisiológicas y químicas (Futuyma, 1988; Luna, 2001). Sin embargo, en este estudio, los resultados indican que los genotipos caracterizados de *Sechium*, pueden agruparse como un complejo, que aún no guarda barreras reproductivas, con un dinamismo y flujo génico que es potencial para formar nuevas variantes biológicas con usos diversos. Existen caracteres en este complejo con valores entre dos extremos, tales como sabor (amargo, neutro y dulce), color (verde muy oscuro, verde claro y amarillo), espinas, dimensión y contenido y diversidad de metabolitos secundarios, que sugieren que la variación es clinal (Font, 1979). Las especies están conformadas por una serie de poblaciones conectadas por flujo génico, y el conjunto de todas las poblaciones entre las que existe dicho flujo, constituyen una especie (Eguiarte *et al.*, 2013). Lo anterior no apoya la propuesta de clasificación de subespecies sugerida por Lira *et al.* (1999), ya que la distribución observada (Figura 2.2) es muy estrecha en un árbol monofilético, evidenciando que no hay barreras biológicas que impidan el intercambio de genes (Eguiarte, 2007), es decir no se aprecian subespecies (Cadena-Iñiguez, 2005), y a pesar de las diferencias morfo estructurales citadas por diversos autores, las accesiones evaluadas registraron baja heterocigosidad. Aun cuando los resultados de AFLPs, pueden ser ambiguos para algunos autores respecto a la direccionalidad del desplazamiento genético (Hébert *et al.*, 2016), son de utilidad como marcadores previos. Es prudente aprovechar esta muestra biológica para aplicar técnicas de mayor profundidad, tales como next generation sequencing, para obtener datos de grandes secciones del genoma de las especies involucradas, para acceder a la historia evolutiva de *Sechium*.

2.5 Conclusiones

La muestra biológica de *Sechium*, mostró bajos índices de heterocigosidad, un número medio aceptable de bandas polimórficas, y alto porcentaje de polimorfismo, que superó los valores

reportados por otros autores para la misma especie. Se logró diferenciar en las coordenadas principales a la mayoría de accesiones domesticadas separadas de los tipos silvestres de sabor amargo. La muestra evaluada compuesta de tres especies, reflejo que no existen barreras reproductivas aparentes para el entrecruzamiento genético, y mostró a *S. edule* como el taxón raíz, derivando inclusive como sub grupos a *S. compositum* y *S. chinantlense*, sugiriendo que la diferenciación no ha sido suficiente para ser tratadas como especies, lo cual quedó en evidencia con los híbridos amargos obtenidos entre éstas dos, y accesiones domesticas de *S. edule*. En general los genotipos se comportaron como un solo complejo con fuerte dinamismo evolutivo que genera un pool genético. Es posible diseñar nuevos genotipos a partir de este acervo genético.

2.6 Literatura citada

- Abraham-Juárez M. J., R. Ramírez-Malagón, K.D. C. Gil-Vega, J. Simpson. 2009. AFLP analysis of genetic variability in three reproductive forms of *Agave Tequilana*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(3), 171-175.
- Aguiñiga-Sánchez, I., J. Cadena-Iñiguez, E. Santiago-Osorio, G. Gómez-García, V. M. Mendoza-Núñez, J. Rosado-Pérez, R. M. Soto-Hernández. 2017. Chemical analyses and in vitro and in vivo toxicity of fruit methanol extract of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1638-1645.
- Arcade A., F. P.F. Anselin, Rampant, M.C. Lesage, L.E. Paques, D. Prat. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(2), 299-307.
- Arnold C.M., Rossetto, J. McNally, R J Henry. 2002. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. *Am. J. Bot.*89:22-28.
- Avendaño-Arrazate C. H., J. Cadena-Iñiguez, M.L. Arévalo-Galarza, V.M. Cisneros-Solano, J.F. Aguirre-Medina, E.D.C. Moreno-Pérez, P. Ramírez-Vallejo. 2012. Genetic variation of an infraspecific chayote complex evaluated by isoenzymatic systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(2), 244-252.
- Azofeifa-Delgado, Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2).
- Barranco, D., L. Rallo, L. León. 2001. Obtención de nuevas variedades de olivo. *Alcuza*, 44, 28-31.
- Barraza-Morales, A., F. L. Sánchez-Teyer, M. Robert, M. Esqueda, A.Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw., de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1).
- Becerra, Z. J. 1996. Estudio agroecológico del chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. En el Estado de Veracruz. Universidad Veracruzana, Xalpa, Veracruz, México. Pp. 12-18
- Brand-Williams W., M.E. Cuvelier, C.L.W.T. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Cadena-Iniguez J., C.H. Avendaño-Arrazate, R.M. Soto-Hernández, L.M. Ruíz-Posadas, J.F. Aguirre-Medina, L. Arévalo-Galarza. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 835-847.
- Cadena-Iñiguez J. 2005. Caracterización Morfoestructral, Fisiológica, Química y Genética de Diferentes Tipos de Chayote (*Sechium edule* (Jacq.)Sw.) (Tesis Doctorado en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 167 p
- Cadena-Iñiguez, J., Soto, M., Torres, A., Aguiñiga-Sánchez I., L.M. Ruiz-Posadas, A. Rivera-Martínez, E. Santiago-Osorio. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of medicinal plants research*, 7(8): 455-460.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL), mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169-196
- Cook, O. F. 1901. The chayote: A tropical vegetable. Bulletin No. 28. Division of Botany, U.S. Department of Agriculture, USA. pp. 7-31
- Cruz León, A. 1985. Catálogo de recursos genéticos de chayote (*Sechium edule* Sw.) en el Centro Regional Universitario Oriente de la Universidad Autónoma de Chapingo (No. 04; SB351. C4, C7.).
- Delaveau C., G. Fuentes-Arce, E. Ruiz, R. Hasbún, M. Uribe, S. Valenzuela. 2013. Variabilidad genética mediante AFLP en tres relictos de Gomortega keule (Molina) Baillon: especie endémica chilena en peligro de extinción. *Gayana. Botánica*, 70(2), 188-194.
- Eguiarte L., V. Souza, X. Aguirre. 2007. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología. IEPSA. 591(1), 42-152.
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., Souza, V. 2013. Genómica de poblaciones: nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(1), 42-56.

- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- de León, D. G. 1994. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Cimmyt.
- Felsenstein, J. (Ed.). 2013. Numerical taxonomy (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- Flores M.E. 1989. El chayote, *Sechium edule* Swartz (Cucurbitaceae) *Revista Biología Tropical*. 37 (1): 1-54
- Gill-Langarica H. R., N. Mayek-Pérez. 2008. Los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de la resistencia a enfermedades del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 164-176.
- Gonzaga L.G. 2004. Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de aliso *Alnus acuminata* HBK. *Scientia et Technica*, 2(25).
- Hébert J. B., S.J. Scheffer, D.J. Hawthorne. 2016. Evidence for ecological speciation via a host shift in the holly leaf miner, *Phytomyza glabricola* (Diptera: Agromyzidae). *Ecology and evolution*, 6(18), 6565-6577.
- Homas, C. M., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D. A., Norcott, K. A., Chadwick, B. P., & Jones, J. D. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 8(5), 785-794.
- Innan H., R. Terauchi, G. Kahl, F. Tajima. 1999. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*, 151(3), 1157-1164.
- Jeffrey, C. 1978. Further Notes on Cucurbitaceae: IV: Some New-World Taxa. *Kew Bulletin*, 347-380.
- Laport R.G., R.L. Minckley, J. Ramsey. 2016. Ecological distributions, phenological isolation, and genetic structure in sympatric and parapatric populations of the *Larrea tridentata* polyploid complex. *American Journal of Botany*, 103(7), 1358-1374.

- Leida C., C. Moser, C. Esteras, R. Sulpice, J.E. Lunn, F. de Langen, B. Picó. 2015. Variability of candidate genes, genetic structure and association with sugar accumulation and climacteric behavior in a broad germplasm collection of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC genetics*, 16(1), 28.
- Lira R. 1996. Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, 8. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 58 p.
- Lira R., J. Castrejon, S. Zamudio, C. Rojas-Zenteno. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, (49):47-61.
- Lira, R., Chiang, F. 1992. Two new combinations in *Sechium* (Cucurbitaceae) from Central America, and a new species from Oaxaca, Mexico. *Novon*, 227-231.
- Lira-Saade, R. 1995. Estudios taxonomicos ecogeograficos de las Cucurbitaceae Latinoamericanas de importancia economica (No. SB351. C8. L57 1995.). International Plant Genetic Resources Institute.
- López P.G., K. Tremetsberger, T.F. Stuessy, S. Gómez-González, A. Jiménez, C.M. Baeza. 2010. Patterns of genetic diversity in colonizing plant species: *Nassauvia lagascae* var. *lanata* (Asteraceae: Mutisieae) on Volcán Lonquimay, Chile. *American journal of botany*, 97(3), 423-432.
- Machida-Hirano, R., Cortés-Cruz, M., González, B. A. A., Cadena-Íñiguez, J., Shirata, K., & Watanabe, K. N. 2015. Isolation and Characterization of Novel Microsatellite Markers in Chayote [*Sechium edule* (Jacq.) Sw.]. *American Journal of Plant Sciences*, 6(13), 2033.
- Mannen H., T. Kojima, K. Oyama, F. Mukai, T. Ishida, S. Tsuji. 1998. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. *Journal of Animal Science*, 76(1), 36-41.
- Meudt, H. M., Clarke, A. C. 2007. Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in plant science*, 12(3), 106-117.
- Nei M. 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics*, 23(4), 341-369.

- Newstrom, L. E. 1986. Studies in the origin and evolution of chayote, *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Cucurbitaceae) (No. 04; TESIS.).
- Phillips, w.; rodríguez, h.; fritz, p. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p. PHILLIPS, W.; RODRÍGUEZ, H.; FRITZ, P. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Rieseberg L. H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, 5(1), 99-105.
- Saitou N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Salazar-Aguilar, S., Ruiz-Posadas, L. D. M., Cadena-Iñiguez, J., Soto-Hernández, M., Santiago-Osorio, E., Aguiñiga-Sánchez, I. & Aguirre-Medina, J. F. 2017. *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, a New Cultivar with Antiproliferative Potential in a Human Cervical Cancer HeLa Cell Line. *Nutrients*, 9(8), 798.
- Sanou, H., Angulo-Escalante, M. A., Martínez-Herrera, J., Koné, S., Nikiema, A., Kalinganire, A., Nielsen, L. R. 2015. Loss of Genetic Diversity of L. through Domestication: Implications for Its Genetic Improvement. *Crop Science*, 55(2), 749-759.
- Silva-Caballero A., G.León-Ávila G., Valenzuela-Galván D., Maldonado, J. E., Ortega, J. 2017. Patterns of Genetic Diversity of the White-Nosed Coati Reveals Phylogeographically Structured Subpopulations in Mexico. *Natural Resources*, 8(01), 31.
- Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* (submitted). <http://www.kumarlab.net/publications>
- Tamura K., S Kumar. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages *Molecular Biology and Evolution* 19:1727-1736.

- Valdés-infante, J., Rodríguez, N. 2003. Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales tropicales., [http. Fao. Cubasi. cu](http://Fao.Cubasi.cu) (Sitio virtual de la FAO).
- Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M., Roldán-Ruiz, I. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular ecology*, 11(1), 139-151.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Xu, H., D. J. Wilson, S. Arulsekhar, A. T. Bakalinsky. 1995. Sequence-specific polymerase chain-reaction markers derived from randomly amplified polymorphic DNA markers for fingerprinting grape (*Vitis*) rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(5), 714-720.

CAPITULO III. PERFILES FITOQUÍMICOS DE GENOTIPOS CONTRASTANTES DE *Sechium P. Browne*

Resumen

Los productos naturales son altamente demandados en los sectores alimentario, industrial, cosmético, textil y farmacéutico debido a que ciertos metabolitos secundarios (Ms) son fuentes de colorantes, antioxidantes, saborizantes, principios activos o agentes anticancerígenos de menor agresividad y selectivos, resaltando los triterpenos y flavonoides, por inhibir la carcinogénesis. Para *Sechium P. Browne* cuyo fruto es conocido como chayote, existen evidencias científicas de actividad antiproliferativa en líneas cancerígenas, atribuido a su diversidad y complejidad fitoquímica registrada en más de una variante biológica; por ello, se evaluaron genotipos de *Sechium* de sabor y morfología contrastante, para identificar Ms con actividad antiproliferativa en células malignas, además de identificar bandas de AFLPs, relacionadas con el sabor de los frutos mediante un enfoque cladístico, como posible forma de selección de parentales para mejoramiento genético. Los análisis en cromatografía de capa fina (TLC) y de HPLC, mostraron que los genotipos con frutos amargos registran mayor número de MS con actividad farmacológica, seguidos por los de sabor neutro y dulce. El sabor en los frutos es debido a la cantidad y diversidad de MS, que evolutivamente ha disminuido por efectos de domesticación y adaptación al ambiente. Es factible seleccionar genotipos de *Sechium* con base en el sabor de los frutos para un programa de mejoramiento genético.

Palabras clave: Cucurbitacinas; flavonoides; fruto; triterpenos; sabor

3.1 Introducción

El uso de plantas medicinales es un conocimiento empírico cultural, que ha sido preservado por generaciones (Palma-Tenango et al., 2017) con el fin de mejorar o preservar la salud (Cortés, 2011). En México se estima que 5,000 especies poseen propiedades curativas (Villaseñor, 2016, González-Stuart y Rivera, 2009; Ocegueda *et al.*, 2005), y de estas plantas se han aislado distintos principios activos obteniendo en ocasiones más de uno por planta (Molina-Mendoza *et al.*, 2012). Dichos principios corresponden a metabolitos secundarios, que son biomoléculas que permiten la supervivencia, adaptación y reproducción de las plantas ante depredadores o condiciones de estrés, y por años, estos compuestos fueron considerados como desechos

metabólicos o productos de desintoxicación (Piasecka *et al.*, 2015; Robbins, 2003). Sin embargo, actualmente han adquirido importancia en los sectores alimentario, industrial, cosmético, textil y farmacéutico (Bourgau *et al.*, 2001), se han identificado aproximadamente 200,000 metabolitos secundarios. Estos compuestos se agrupan en categorías, tales como, terpenoides, alcaloides, y compuestos fenólicos (Croteau *et al.*, 2000); y entre las plantas con amplia diversidad y compleja composición de metabolitos reportada en México, se ubica al género *Sechium* P. Browne, cuyo fruto es conocido como chayote (Cook, 1901; Lira *et al.*, 1999). Existen registros de su aplicación en la medicina tradicional (Ortega- Paczka *et al.*, 1998), sin embargo, recientemente Aguiñiga-Sánchez *et al.* (2017); Salazar-Aguilar (2017); Riviello-Flores (2015); Cadena-Iñiguez *et al.* (2013) y Cadena-Iñiguez (2005), han reportado con evidencia científica efectos terapéuticos de alguna variante biológica de *Sechium*. Entre los fitocompuestos que han despertado un interés particular son los triterpenos por su propiedad antiproliferativa, evaluada con diversos modelos *in vitro* e *in vivo*, que intentan definir el mecanismo de acción, y efectos frente líneas celulares cancerígenas (Bishayee *et al.*, 2011; Petronilli *et al.*, 2009; Vega *et al.*, 2006, Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2017). Los flavonoides son otra clase de metabolitos identificados en *Sechium*, y se tienen reportes de su actividad antineoplásica (Deschner *et al.*, 1993; Barcket *et al.*, 1989; Benavente-García *et al.*, 1997), cuya acción a nivel membrana, o enzimática, interfiere con el metabolismo, inhibiendo la glucólisis, que es una ruta metabólica generalmente muy activa en células tumorales (Manach *et al.*, 1996). Con la intención de desarrollar compuestos anticancerígenos a partir de fuentes naturales, se han extraído y comercializado diversos principios activos, tales como la vincristina, camptotecina y taxol, sin embargo, algunos de éstos han revelado efectos tóxicos o actividades no selectivas, que provocan la eliminación de toda célula con alta tasa de proliferación, por ejemplo, linfocitos y células del cabello (Vega *et al.*, 2006; Jacobo-Herrera *et al.* 2015). Bajo esta premisa en años recientes se ha iniciado el mejoramiento genético con ciertos genotipos de chayote, ya que, a través de ensayos *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado actividad antineoplásica en las líneas celulares WEHI-3, HeLa, P 388, J774 y L929, entre otras principales (Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2017; Cadena Iñiguez *et al.*, 2013), y se ha contrastado este efecto con células mononucleadas de médula ósea, donde se registra fragmentación del ADN de células malignas, y revela cierta actividad selectiva de los extractos de frutos de chayote (Cadena-Zamudio, 2013). Las ventajas citadas, aunadas a ser un cultivo con incrementos anuales, tanto en sus áreas de producción como en volumen por

hectárea (SIAP, 2017), le confieren importancia como fuente de biomásas para principios activos con fines farmacológicos. Lo anterior sugiere desarrollar grupos varietales con mayor rendimiento en campo (biomasa) y en metabolitos de interés terapéutico, para obtener principios activos, que amplíen las opciones farmacológicas y desarrollar suplementos alternativos (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2008; 2016). Con base en lo anterior, se evaluaron genotipos contrastantes de *Sechium* P. Brown, para identificar metabolitos secundarios con actividad antiproliferativa de células malignas, a partir del sabor de los frutos, como posible ruta de selección de parentales para mejoramiento genético.

3.2 Materiales y métodos

Se utilizaron frutos de chayotes en madurez hortícola (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2012) de genotipos contrastantes en su sabor, como frutos dulces a los grupos varietales de *S. edule* (*var. albus levis*, y *var. albus minor*); de sabor neutro a *var. nigrum minor*, *var. virens levis*, *var. nigrum xalapensis*, y a los tipos silvestres *S. edule* y *S. compositum* como frutos amargos (Cuadro 3.1). Se consideraron a las accesiones 769, 761, 330, 681, 273, 530-a, 11, 751 y 653, como representativas de los contrastes de sabor, ya que por estudios previos realizados por Cadena-Iñiguez *et al.* (2011), el sabor del fruto de los chayotes está determinado por los metabolitos secundarios presentes, se asocian al sabor amargo con un alto contenido de triterpenos tetracíclicos (cucurbitacinas), Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011 señalan que los frutos considerados dulces (frutos color amarillo) registran hasta 100 veces menos triterpenos que los frutos amargos (color verde oscuro) y diez veces menos que los frutos de sabor neutro (color verde claro y oscuro). Los frutos fueron cosechados en octubre del 2016 (Cuadro 3.1). Todos los frutos procedieron del banco nacional de germoplasma de *S. edule* en México (BANGESe), cuyas coordenadas geográficas y condiciones agroclimáticas son: 19°08'48' N y 97°57'00" O, con vegetación de bosque de bosque Mesófilo de Montaña (bosque nubloso) a 1340 m de altitud y temperatura media anual de 19 °C y 85% de humedad relativa, con 2250 mm de precipitación anual. Los suelos son luvisoles vítricos, ricos en nutrientes, de fertilidad moderada, textura gruesa y fragmentos de vidrio volcánico, y pH de ligeramente ácidos a ácidos (4.3-6.5), ricos en materia orgánica, bajos en calcio y altos en hierro, manganeso y zinc (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2006) (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.1. Características principales de las accesiones de *Sechium* P. Browne de sabor contrastante y tamaño de muestra para extracción química Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011.

Genotipo	Accesión	Color fruto	sabor	Estatus	Muestra (g)
<i>S. edule</i> var. <i>albus levis</i>	769	amarillo	dulce	semidomesticado	84.91
<i>S. edule</i> var. <i>albus levis</i>	761	amarillo	dulce	semidomesticado	34.3
<i>S. edule</i> var. <i>albus minor</i>	330	amarillo	dulce	semidomesticado	10.44
<i>S. edule</i> var. <i>nigrum minor</i>	681	verde	neutro	semidomesticado	9.63
<i>S. edule</i> var. <i>virens levis</i>	273	verde	neutro	domesticado	360
<i>S. edule</i> var. <i>nigrum xalapensis</i>	530-a	verde	neutro	domesticado	390
<i>S. compositum</i>	11	verde	amargo	silvestre	555
<i>S. compositum</i>	751	verde	amargo	silvestre	147
<i>S. edule</i> silvestre	653	verde	amargo	silvestre	119

Cuadro 3.2. Análisis fisicoquímico de suelo del Banco Nacional de Germoplasma de *Sechum edule* en México. Valores de 25 submuestras; laboratorio de Edafología, Colegio de Postgraduados Cadena-Iñiguez, 2005.

pH	CE, (dS/m)	Densidad aparente, (g/cm ³)	Nt %	P ppm	K (cmol/kg)	Ca (cmol/kg)	Mg (cmol/kg)
5.43	0.822	0.735	0.567	7.544	1.265	13.818	3.500
Fe ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	Arcillas %	Limos %	Arenas %	Textura
34.121	17.825	8.724	25.667	19.980	32.180	47.840	Franca

3.3 Proceso de extracción

Los frutos fueron lavados, cortados, pesados y llevados al horno (BLUE-M, Electronic Company/Blue Island, Illinois, USA.) con flujo de aire a 45 °C durante 72 horas, posteriormente se realizó la determinación de peso en seco para continuar con la molienda del fruto total (exocarpo, mesocarpo, espinas y semilla) con el apoyo de un molino (Hamilton Beach, USA). Se determinó el peso en fresco y seco por accesión se calculó el porcentaje de pérdida de agua y rendimiento del material biológico (Cuadro 3.1). Se realizó una extracción continua con metanol como disolvente orgánico que ha sido evaluado en distintos materiales de chayote (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2005, 2013; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2013, 2015). Se pesaron 2.5 g del material molido por cada accesión y sumergió en metanol al 80% a 1:10 en tubos eppendorf de 50 mL

respectivamente, las muestras fueron homogeneizadas y se llevaron a baño ultrasónico (BRANSON B-220 50/60 Hz), a temperatura ambiente, con dos ciclos de 10 minutos y un receso de cinco minutos para recuperar la fase acuosa por decantación. Este método se repitió diez veces añadiendo solvente metanol grado reactivo. Se recuperó un volumen total de 250 ml por muestra, el cual fue transferido a matraz bola de 500 ml para concentrar el extracto en un rotaevaporador (BUCHI R-114, Switzerland) a 45 °C y presión de 45 cm Hg, para posteriormente pasarlo por unos minutos a flujo de gas nitrógeno para eliminar excedentes del solvente. Se determinó el porcentaje de rendimiento por accesión los extractos fueron conservados en frascos ámbar a temperatura ambiente 22 °C ±2. Se realizó un análisis preliminar de metabolitos secundarios mediante cromatografía capa fina (CCF), para identificar presencia de compuestos de interés terapéutico, tales como, cucurbitacinas y flavonoides, reportados en el chayote (Aguñiga-Sánchez, 2017; Salazar-Aguilar, 2016; Riviello-Flores, 2015; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011 y Cadena-Iñiguez, 2005), cuya actividad antineoplásica y antiproliferativa ha sido registrada también por Soto-Hernández *et al.* (2015), Bishayee *et al.* (2011), Petronilli *et al.* (2009), Deschner *et al.* (1993), y Barcket *et al.* (1989). Para el análisis preliminar de cucurbitacinas se aplicaron nueve muestras y cuatro estándares de cucurbitacinas en extremos por punteo en una cromatoplaqueta de sílice gel de 20 x 20 cm. Los estándares fueron cucurbitacina B, I, E y D (Sigma-Aldrich, USA). Para la fase móvil se emplearon los solventes cloroformo-metanol en una relación de 90:10, y para corroborar la aplicación de estos y las muestras, se observó bajo luz-UV en cámara (COLE-PARMER 9818-Series, FRANCE) a 365 nm. La cromoplaqueta fue colocada en la cámara con una línea límite de corrida a los 19 cm, se mantuvo sellada hasta observar que los solventes alcanzaran el nivel indicado para migración, se observó bajo luz-UV y finalmente se realizó el revelado con el agente cromogénico vainillina-ácido fosfórico 50% etanol absoluto, la cromoplaqueta se llevó a 100 °C en horno durante cinco minutos. Para identificar presencia de flavonoides, se usó la metodología similar a la descrita para cucurbitacinas, con los estándares kaemferol, rutina, quercetina y mirecitina, y como fase móvil acetato de etilo-ácido fórmico, ácido acético-agua con una relación 75:3:4:9, De igual manera se procedió para correr la cromoplaqueta preparada para la detección de flavonoides de los extractos crudos de frutos contrastantes de chayote. El agente cromogénico empleado fue Natural Product's/Polietilenglicol (NP/PEG), finalmente las placas fueron observadas en cámara Luz-UV (COLE-PARMER 9818-Series; FRANCE), para la lectura de las bandas reveladas. Se

registraron los valores rf (Ratio of Front), distancia de compuesto/distancia del eluyente (Wagner y Blandt, 2009) para cada uno de los estándares aplicados y muestras. Para la preparación de las muestras para el análisis de cucurbitacinas y flavonoides en HPLC, se pesaron 20 mg de extracto crudo por muestra, disolviendo en 1 ml de metanol grado HPLC (Sigma- Aldrich, USA), y se filtraron con acrodiscos de membrana Nylon, diámetro 0.45 μm (Millipore, Irlanda). Una vez filtradas las muestras fueron conservadas y almacenadas en viales ámbar de 1.5 ml a 0 °C hasta su análisis. Las cucurbitacinas fueron analizadas a través de una columna phenomenex C18 (4.6 x 250 mm) (Waters, USA), mediante un análisis isocrático, es decir, las condiciones cromatográficas fueron constantes, así como, la fase móvil durante la separación (FEUM, 2016). La fase móvil empleada fue una solución de disolventes con diferentes índices de polaridad alto y dos medios (IP) agua (9.0), metanol (6.6) y acetonitrilo (6.2), consultado en tablas de miscibilidad Cienytech (2017), la relación de la solución preparada fue 50:30:20, donde el flujo de inyección aplicado por muestra se mantuvo a 1 mL min⁻¹ con una presión de 179 bares, todas las muestras estuvieron a temperatura de 25 °C. El volumen total inyectado por accesión evaluada fue de 20 μl , finalmente la identificación de cucurbitacinas se realizó con dos longitudes de onda (λ_1 235 nm y λ_2 254 nm), el tiempo requerido para concretar el análisis por HPLC (HPLC, del inglés "High Performance Liquid Chromatography") fue de 50 minutos. Se usaron como estándares de referencia cucurbitacina D, I, B, E (Sigma-Aldrich, USA). En el caso de la identificación de flavonoides se empleó la columna hypersyl ODS (125 x 40 mm) (Hewlett Packard). Para la fase móvil se preparó una solución (a) de agua a un pH de 2.5 mediante ácido trifluoroacético (TFA) y como disolvente (b) se utilizó el acetonitrilo (ACN). La velocidad de inyección aplicada con flujo de 1 mL min⁻¹, y una presión de 179 bares a 30 °C de temperatura, donde 20 μl fue el volumen de inyección por muestra analizada. Los flavonoides en metanol grado reactivo, se observaron a diferente longitud de onda 254 nm y 360 nm, en un tiempo total de análisis de 25 minutos por accesión, por último, durante el análisis de identificación y cuantificación de flavonoides en HPLC se utilizaron los estándares: rutina, florizidina, miricetina, quercetina, naringenina, florentina y galangina (Sigma-Aldrich, USA) (Aguñiga-Sánchez, 2013).

3.4 Análisis genético

Con la finalidad de mostrar un acercamiento a la relación entre los metabolitos secundarios del perfil fitoquímico y la expresión génica, se realizó un análisis por AFLP (Vos *et al.* 1995) se

recuperaron las bandas polimórficas de los genotipos de *Sechium*, mediante lo siguiente: Las accesiones fueron evaluadas con ocho combinaciones de AFLP's (EcoRI ACC + MseI CAA, EcoRI ACC + MseI CAC, EcoRI ACC + MseI CAG, EcoRI ACC + MseI CAT, EcoRI ACC + MseICGA, EcoRI ACC + MseI CGC, EcoRI ACC + MseI CGG EcoRI ACC + MseI CGT), de la cuales se seleccionaron las cuatro combinaciones que presentaron mayor número de bandas polimórficas (EcoRI ACC + MseI 1 CAC, EcoRI ACC + MseI CAT, EcoRI ACC+ MseI CGC y EcoRI ACC+ MseI CGG). El ADN se obtuvo a partir de hojas jóvenes y sanas, las cuales fueron conservadas a -80 °C, y liofilizadas en un equipo LABCONCO FREEZONE 12 (-82 °C, 0.0358 mbar; Kansas, USA), y molido en homogeneizador de balines Tissue Lyser II (QUIAGEN) durante 90 segundos a 30 Hz. La extracción de ADN se realizó con el método de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)) según el protocolo de Saghai Maroof *et al.* (1984) modificado, fue necesario 50 mg de material seco y molido por accesión (De león, 1994). La determinación de concentración del ADN se realizó mediante espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) con una relación de lectura de 260/280 nm, obteniendo concentraciones de 100-300 ng μl^{-1} . Se evaluó la integridad del ADN en gel de agarosa (1%), a una dilución de 10 ng μl^{-1} , se aplicó 100 μg por accesión; las condiciones de corrida fueron 80 volts durante 45 minutos. El ADN integro fue ajustado a una concentración de 100 ng μl^{-1} del cual se tomaron 2 μg por reacción para el desarrollo de metodología de AFLP según Vos *et al.* (1995) modificado. Para la digestión del ADN se emplearon las enzimas de restricción de corte raro EcoRI que reconoce 6-8 pb y de corte frecuente la MseI que reconoce 4 pb (Gonzaga-Gutierrez, 2004). Para la ligación se emplearon adaptadores MseI (GACGATGAGTCCTGAG) y EcoRI (AATTGGTACGCAGTC). La reacción de PCR se preparó con RedTaq Mix Ready Mix PCR Reaction Mix (Sigma Aldrich, USA) a 1 X, la concentración final de los iniciadores fue diferente del iniciador MSE I, del cual se requirió 5 μM , mientras que el iniciador EcoRI marcado con el fluoróforo FAM (Sigma Aldrich, USA), fue de 3 μM . Se añadieron 3 μl de producto de pre-amplificación, el cual, fue previamente diluido en 80 μl de H₂O tipo 1, el volumen final para esta reacción se ajustó a 10 μl con agua tipo 1. Las condiciones de PCR-selectiva fueron la desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 40 segundos; 54 °C por 40 segundos; 72 °C por 30 segundos; y una elongación final a 72 °C durante 40 minutos. Los productos de la amplificación selectiva fueron separados en geles de poliacrilamida al 6 %, a 200 volts durante tres horas, los geles se tiñeron con nitrato de plata,

posteriormente los productos de PCR-selectiva se evaluaron en secuenciador capilar 3500 XL (Genetic Analyzer), condiciones de corrida AFLP's predeterminado en equipo, con los datos de amplificación, se generó una matriz binaria de presencia y ausencia (1/0), la matriz binaria fue generada mediante el software Gene Mapper (Applied Biosystems).

3.5 Análisis cladístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante un enfoque cladístico, con la finalidad de identificar el carácter y su estado, de las variables fitoquímicas y genéticas. De la determinación en HPLC, se recuperaron las concentraciones de metabolitos a partir de la curva estándar, las cuales, para el análisis cladístico se capturaron en clases, para el análisis con WinClada 1.00.08 (2002), los grupos se generaron partiendo del valor cero (ausente) para los metabolitos no presentes hasta el valor cinco que contiene los compuestos identificados en mayor concentración. Las clases comprendieron las dos concentraciones próximas inmediatas. El análisis aplicado fue heurístico, con el apoyo de las pruebas Bootstrap/Jackknife, que generan el índice de consistencia y estabilidad respectivamente (Falsein, 1985; Layon, 1985).

3.6 Resultados y discusión

La relación de peso fresco, seco y rendimientos de extracto crudo, mostró que en promedio los genotipos de *Sechium P. Browne* evaluados están constituidos por 73.85% de agua, se ubicaron a los frutos de epidermis amarilla (*albus minor*, *albus levis*) con menor porcentaje (52.27%), mientras que los chayote con mayor porcentaje de agua fueron los de mayor consumo comercial de sabor neutro (82.40%), tal como señala Cadena-Iñiguez, (2005), seguido de los tipos silvestres con 79.76%. En el caso del rendimiento del extracto crudo, se registró 52.98% para genotipos de sabor neutro y domesticados, mientras que los *albus* (amarillos) rindieron 39.26%, y finalmente los de sabor amargo silvestres registraron 37.27% (Cuadro 3.3). Con relación al análisis por CCF, las muestras se colocaron de izquierda a derecha en el siguiente orden: estándar Cucurbitacina B rf (0.87), Cucurbitacina D rf (0.62), se colocaron las nueve accesiones en el orden mencionado (Figura 3.1 A), se continuó con la aplicación de estándares cucurbitacina I rf (0.67) y cucurbitacina E rf (0.89). En los nueve genotipos se observó presencia de cucurbitacinas B e I, ningún genotipo registró la cucurbitacina E, y sólo en frutos amargos se apreció la cucurbitacina D. En relación a presencia de flavonoides, las muestras se aplicaron intermedias a los estándares, se aplicaron dos estándares en cada extremo de la cromoplaca,

como sigue: kaemferol rf (0.87), rutina rf (0.62), quercetina rf (0.67), miricetina rf (0.89). En la CCF no se identificaron los flavonoides kaemferol y miricetina en ninguna accesión, sin embargo, rutina estuvo presente en todas las muestras, y solo los genotipos amarillos de sabor dulce, y la accesión 11 de sabor amargo (*S. compositum*) no revelaron presencia de quercetina (Figura 7 B).

Cuadro 3.3. Relación de peso fresco, seco y rendimiento porcentual de extractos crudos a partir de frutos en madurez hortícola de *Sechium* P. Browne de sabor contrastante.

Sabor fruto Variable	Accesión								
	Dulces			Neutros			Amargos		
	769	761	330	681	273	530	11	751	653
Peso fresco (g)	84.94	34.3	10.44	9.63	360	390	555	147.24	119.41
Peso seco (g)	27.60	19.10	4.70	3.30	37.9	29.7	80.6	27.3	33.00
Agua (%)	67.50	55.68	54.98	65.33	89.5	92.38	85.47	81.45	72.36
Materia seca (%)	32.49	44.31	45.02	34.26	10.5	7.61	14.52	18.54	27.63
Extracto crudo(g)	1.15	1.08	0.71	1.07	1.29	1.61	0.94	1.01	0.85
Rendimiento total %	46.04	43.29	28.47	42.94	51.6	64.37	37.44	40.52	33.91

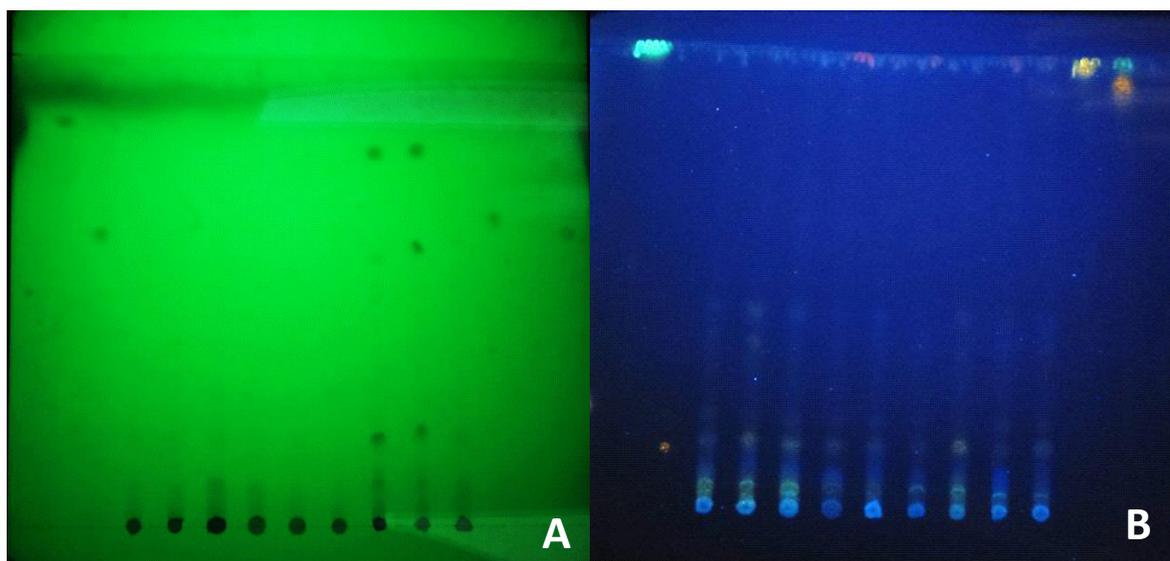


Figura 3.1. Cromoplacas para cucurbitacinas y flavonoides (Analytical Chromatography, Germany) de nueve extractos de fruto en madurez hortícola de *Sechium* P. Browne y cuatro estándares de flavonoides (Sigma-Aldrich, USA). A: para cucurbitacinas revelada con Vainillina, y visibilidad bajo luz UV a 254 y 365 nm.

B: para flavonoides revelada con agente cromogénico (NP/PEG) bajo luz UV a 254 y 365 nm.

El análisis por HPLC reflejó presencias de las cucurbitacinas D, I y B, y para el caso de la cucurbitacina E, únicamente se registró en la accesión 761 (*albus levis*) de sabor dulce. Para la determinación de flavonoides mediante HPLC, se emplearon siete estándares, con presencia de rutina, miricetina, floretina en los nueve genotipos, mientras que la galangina estuvo presente en todos excepto *virens levis* y *nigrum xalapensis* (chayotes de sabor neutro). La quercetina se registró en seis de nueve genotipos pero, ausente en *albus levis*, *virens levis* y *nigrum xalapensis*. Mientras que la naringenina se observó en *albus minor* y los dos silvestres de *S. compositum*. Finalmente la florizidina fue identificada en *virens levis* y en la accesión 11 de *S. compositum*. A diferencia de la cromatografía de capa fina, la sensibilidad de detección en HPLC fue mucho mayor, además permitió un análisis cuantitativo preciso para metabolitos (Rubiano *et al.*, 2012; Perona *et al.*, 1999) (Cuadro 3.4, 3.5).

Cuadro 3.4. Rendimiento de cucurbitacinas (mg g⁻¹) obtenido de frutos en madurez hortícola de sabor contrastantes de *Sechium P. Browne*.

Genotipo	CuD	CuI	CuB	CuE
S. edule var. albus levis	1.17	4.27	1.27	0
S. edule var. albus levis	4.77	3.52	0.46	1.73
S. edule var. albus minor	12.71	1.93	1.52	0
S. edule var. nigrum minor	1.06	5.84	0.27	0
S. edule var. virens levis	0.95	4.04	0.62	0
S. edule var. nigrum xalapensis	13.44	5.60	0.73	0
S. compositum	3.00	4.70	1.96	0
S. compositum	8.35	17.47	4.37	0
S. edule silvestre	1.04	3.10	0.18	0

CuD= cucurbitacina D; CuI= cucurbitacina I; CuB= cucurbitacina B; CuE= cucurbitacina E;

Las concentraciones identificadas y cuantificadas por HPLC se presentan mg g⁻¹ de peso seco, donde los chayotes con mayor concentración para el caso del CuD y CuE fueron los de fruto amarillo (*albus minor*, *albus levis*), y referente a mayor cantidad de Cucurbitacina B y Cucurbitacina I, fueron los chayotes amargos (*S. compositum*, *S. edule silvestre*). Para el caso de Cucurbitacina D, se observó en *nigrum xalapensis* la mayor concentración, seguido por *albus minor* y *S. compositum*. En cuanto a Cucurbitacina I, la mayor concentración fue identificada en

S. compositum y *nigrum minor*, y en el caso de Cucurbitacina B, la mayor concentración fue en *S. compositum* y *albus minor*. El único material que reveló presencia de Cucurbitacina E, fue *albus levis* (accesión 761). El mismo análisis de HPLC registró a seis de siete estándares en los genotipos evaluados, no se identificó el flavonoide apigenina. Los flavonoles rutina, miricetina, quercetina y galangina, así como, las dihidroclachonas florizidina, floretina, y la flavona naringenina (Benavente-García *et al.*, 1997), se registraron con mayor concentración en los genotipos amargos, seguido por los chayotes de color verde claro y sabor neutro, con excepción del flavonoide rutina y naringenina para las accesiones *albus*, que mostraron mayor concentración que los de sabor neutros (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Contenido de flavonoides (mg g⁻¹) obtenido de frutos en madurez hortícola de sabor contrastantes de *Sechium* P. Browne.

Genotipo	Ru	Fz	Mi	Qu	Na	Ft	Ap	Ga
<i>S. edule var. albus levis</i>	0.26	0.00	0.78	0.00	0.00	0.09	0	0.46
<i>S. edule var. albus levis</i>	0.13	0.00	0.55	0.00	0.00	0.10	0	0.43
<i>S. edule var. albus minor</i>	0.25	0.00	0.69	0.01	0.16	0.05	0	0.48
<i>S. edule var. nigrum minor</i>	0.13	0.00	0.27	0.01	0.00	0.06	0	0.44
<i>S. edule var. virens levis</i>	0.23	0.08	1.09	0.00	0.00	0.11	0	0.00
<i>S. edule var. nigrum xalapensis</i>	0.08	0.00	0.77	0.00	0.00	0.15	0	0.00
<i>S. compositum</i>	0.48	0.11	0.19	0.03	0.56	1.42	0	5.80
<i>S. compositum</i>	1.20	0.00	1.46	0.21	1.59	2.19	0	12.32
<i>S. edule silvestre</i>	0.82	0.00	1.10	0.09	0.00	0.06	0	0.51

Ru= rutina, Fz= florizidina, Mi= miricetina, Qu= quercetina, Ft= floretina, Ap= apigenina, Ga= galangina.

La Figura 8 muestra el arreglo parsimonioso de la combinación de variables fitoquímicas y bandas polimórficas de AFLP's, resultado de mil repeticiones (De luna *et al.*, 1995), el cual generó índices de consistencia y estabilidad confiables (L=87,Ci= 72, Ri 38) con valores desde 100/100, 67/55 y 94/90 para las pruebas de Bootstrap/Jackknife respectivamente (Kitching, 1998), señalando una reconstrucción de las similitudes heredables, donde los chayotes amargos de color verde oscuro con espinas, fueron los genotipos más próximos a la raíz del árbol monofilético, correspondiendo a caracteres ancestrales, tal como lo señalan Lira *et al.* (1999) y Cadena-Iñiguez (2005). El cladograma mostró la diferenciación de los tres grupos de acuerdo al

sabor de los frutos; el primero formado por genotipos amargos, ubicado a *S. edule* como taxón raíz, y las dos accesiones de *S. compositum*, un segundo grupo formado por los chayotes verdes de sabor neutro, y el último por los de fruto amarillo de sabor dulce. De acuerdo a lo anterior, y bajo la óptica cladística, se marca un escalonamiento evolutivo, sugiriendo que el sabor amargo es un carácter ancestral, y que cambia (disminuye), debido a diferencias en metabolitos secundarios y bandas polimórficas asociadas. Un primer caso de lo anterior, se observa en el grupo de amargos, donde a partir de los caracteres ancestrales (círculos oscuros) en *S. edule* y *S. compositum* (accesión 11), se registra la ausencia de la banda 16 (77 pb) y concentración media de cucurbitacina D en la accesión 751 *S. compositum*. Es difícil considerar cambios en los genotipos de una especie de forma abrupta en una misma región agroclimática de distribución, sin embargo, si es posible identificar pequeñas diferencias atribuidas al mismo ambiente, por ejemplo, aun cuando la accesión 11 y 751, son la misma especie, y provienen de la región del Soconusco, Chiapas, México, la primera es de bosque alto perennifolio, y la segunda de condiciones ruderales sin vegetación, lo cual en el tiempo puede marcar modificaciones al fenotipo. La plasticidad es una característica que permite a las plantas realizar ajustes morfológicos y bioquímicos, y para este caso en especial, la accesión 11 es de fruto piriforme y la 751 es redonda y de tamaño pequeño (Figura 3.3).

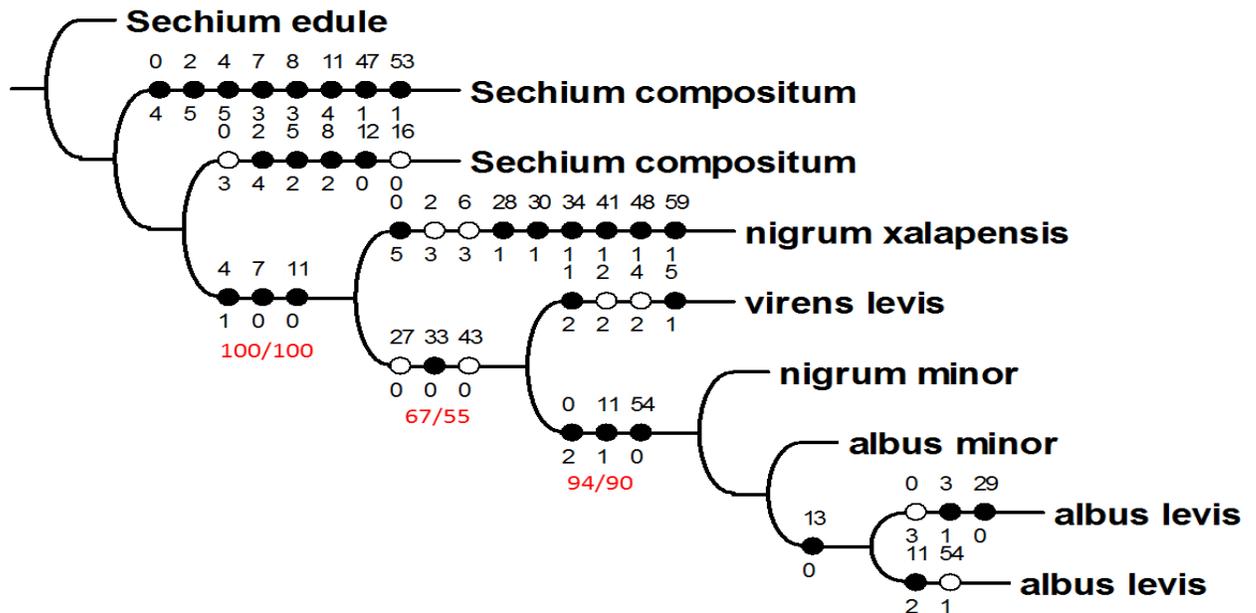


Figura 3.2. Cladograma con nueve genotipos de *Sechium*, con valores de perfil fitoquímico (cucurbitacinas y flavonoides), así como, bandas polimórficas AFLP's con la

combinación Eco RI ACC y MseI CAT. Círculo blanco corresponde a caracteres nuevos, círculo negro a caracteres ancestrales; los valores en la parte superior del círculo revelan el carácter y el valor inferior de éste, a su estado (Morrone, 2003).

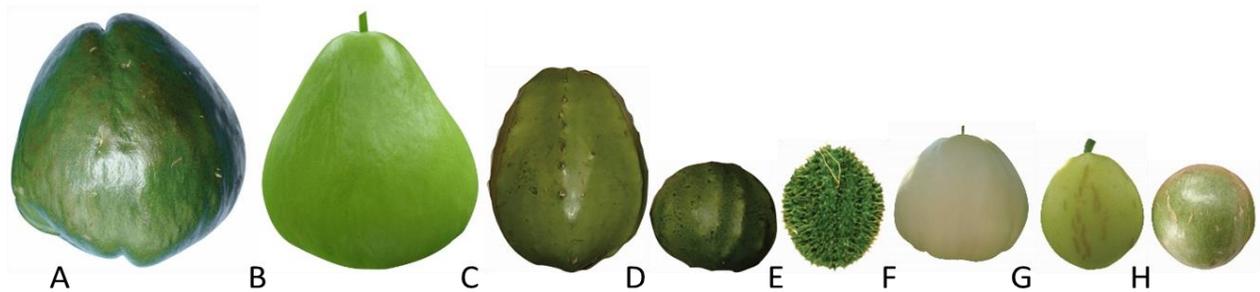


Figura 3.3. Morfotipos de *Sechium* P. Browne evaluados. A: *S. edule* var. *nigrum xalapensis*, B: *S. edule* var. *virens levis*, C: *S. compositum* (accesión 11) D: *S. compositum* (accesión 751), E: *S. edule silvestre*, F: *S. edule* var. *albus levis*, G: *S. edule* var. *albus minor*, H: *S. edule* var. *nigrum minor*. La escala métrica de referencia es un cm por cuadro.

El segundo grupo incluyó a los frutos de sabor neutro, y correspondió a los genotipos de mayor consumo y manipulación comercial (Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011), presento tres (cucurbitacina B, rutina y miricetina) caracteres fitoquímicos de tipo apomórfico (nuevos). Finalmente, los genotipos *albus minor*, *albus levis*, e inclusive *nigrum minor*, considerados como semidomesticados, de bajo consumo, conservados en traspatios familiares, mostró seis caracteres (Cuadro 3.6), de los cuales, la mitad correspondió a fitoquímicos con valores medios en cuanto a concentración de las cucurbitacinas D y E, como carácter simplesiomórfico (ancestrales y compartidos con los demás genotipos), además de presencia de la banda 54 (426 pb), como un carácter autopomórfico (nuevo) (Morrone, 2003).

Cuadro 3.6. Caracteres plesiomórficos y apomórficos, del análisis de 12 variables bioquímicas y 48 bandas polimórficas de AFLP's, de genotipos de *Sechium* P. Browne.

Genotipo	Caracter/estado de caracter	Rama
S. edule	0/4, 2/5, 4/5, 7/3, 8/3, 11/4, 47/1, 53/1	
S. compositum	0/2, 2/4, 5/2, 8/2, 12/0, 16/0	
S. compositum	0/5, 2/3, 6/3, 28/1, 30/1, 31/1, 41/1, 48/1, 59/1	4/1, 7/0, 11/0,
S. edule var. nigrum xalapensis	1/2, 2/2, 4/5, 5/1	
S. edule var. virens levis	0/2, 11/1, 54/0	27/0, 33/0, 43/0
S. edule var. nigrum minor		0/2, 11/1, 54/0
S. edule var. albus minor		
S. edule var. albus levis	0/3, 3/1, 29/0	13/0
S. edule var. albus levis	11/2, 54/1	

Carácter fitoquímico 0-11; Bandas AFLP's: 12-59

Respecto a bandas polimórficas de los genotipos, y asociadas a caracteres fitoquímicos (Figura 3.2, Cuadro 3.6), se asume que son de ADN no codificante, neutrales a la selección, por lo que para saber qué tipo de información contienen dichas bandas, se requiere aislar, clonar y secuenciarlas, para posteriormente hacer un alineamiento (“blast”) e identificar la posible asociación con actividad biológica. La ventaja es su independencia del estado fisiológico del genotipo, y no son influidos por el ambiente, sugiriendo confiabilidad por su estabilidad (Barraza-Morales et al., 2006). Los cromatogramas de la Figura 3.4 A, B, C, que corresponden a las accesiones de frutos dulce, mostraron trazas de cucurbitacinas, en comparación de las accesiones de frutos con sabor neutro (Figura 3.5 D, E, F), y de sabor amargo (Figura 3.6 G, H, I), que registraron las concentraciones mayores respecto los estándares empleados. Las mismas Figuras muestran otros picos con buena definición, cuya longitud de absorción fue similar a las de las cucurbitacinas, lo cual sugiere presencia de otros metabolitos. Los flavonoides rutina y miricetina (flavonoles) mostrados en las Figura 3.7 J, K, L, y Figura 3.8 M, N, O, para genotipos de frutos dulces y neutros respectivamente, fueron los de mayor concentración, contrariamente a galangina y floretina, que registraron trazas. En los chayotes de sabor neutro el flavonoide de mayor contenido fue miricetina (flavonol), sin embargo, de todos genotipos, los de sabor amargo, registraron los mayores contenidos e todos los flavonoides (Figura 3.9 P, Q, R). El cromatogramas 3.9 P y 3.9 Q, corresponden a *S. compositum*, mostro mayor contenido de galangina y rutina (flavonoles), y la Figura 3.9 R, muestra concentraciones traza para galangina en *S. edule* silvestre, en valores inferiores a *S. compositum*, pero superiores a los registrados en

genotipos comestibles (dulces y neutros). En todas las accesiones de chayote se identificó presencia de flavonoles, los cuales, según Benavente-García (1997) y Martínez-Flores *et al.* (2002), los citan como los flavonoides con mejor actividad antioxidante, debido a sus características estructurales y capacidad de capturar radicales libres, ya que presentan actividad antioxidante, anti radicales y quelantes, por lo cual se les ha asociado con la inhibición de glucolisis en tumores (Bombardelli y Morazzoni, 1993; Manach *et al.*, 1996).

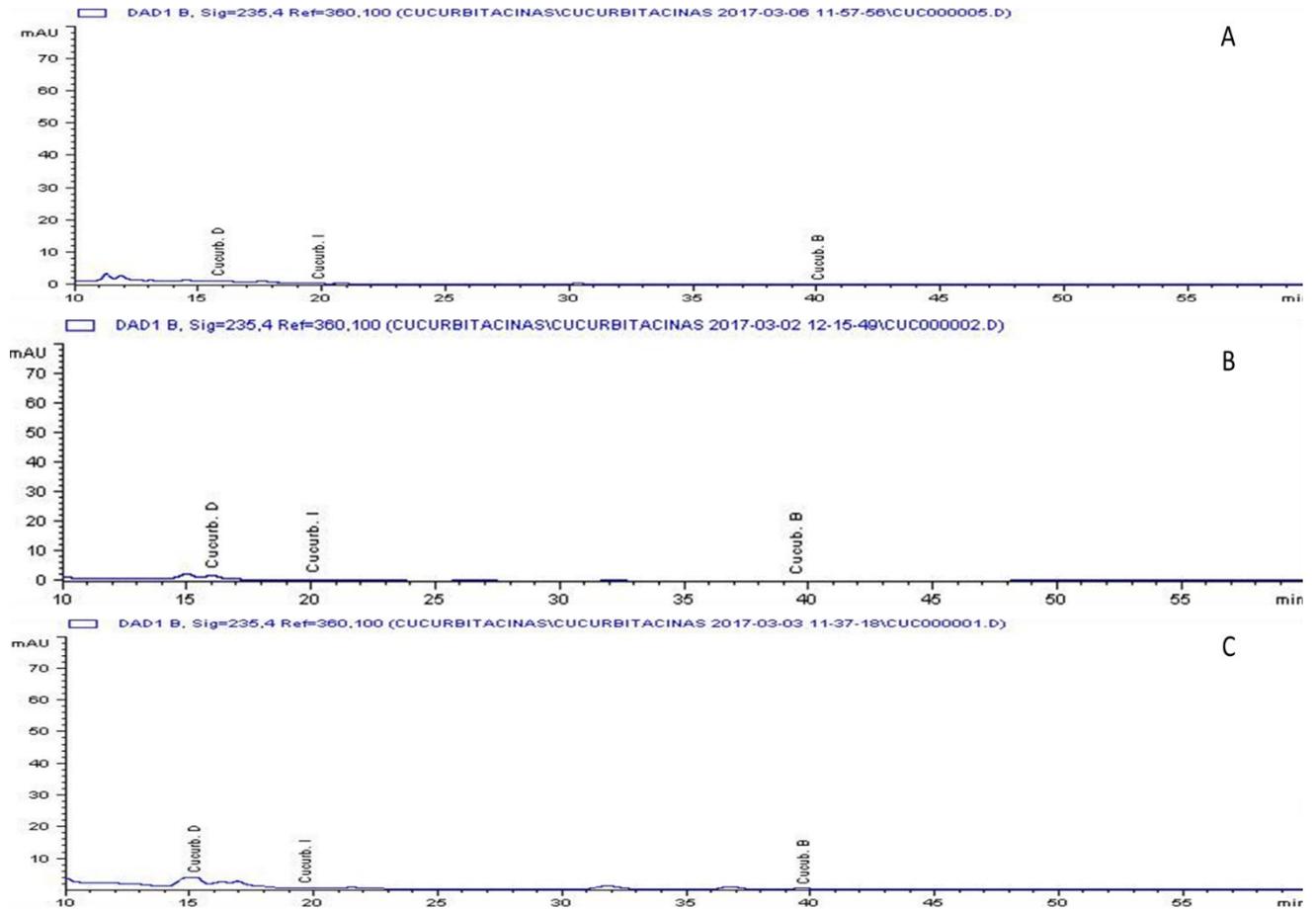


Figura 3.4. Cromatogramas de HPLC, para identificación de cucurbitacinas en frutos de *S. edule*, var. *albus levis* (A y B), y var. *albus minor* (C).

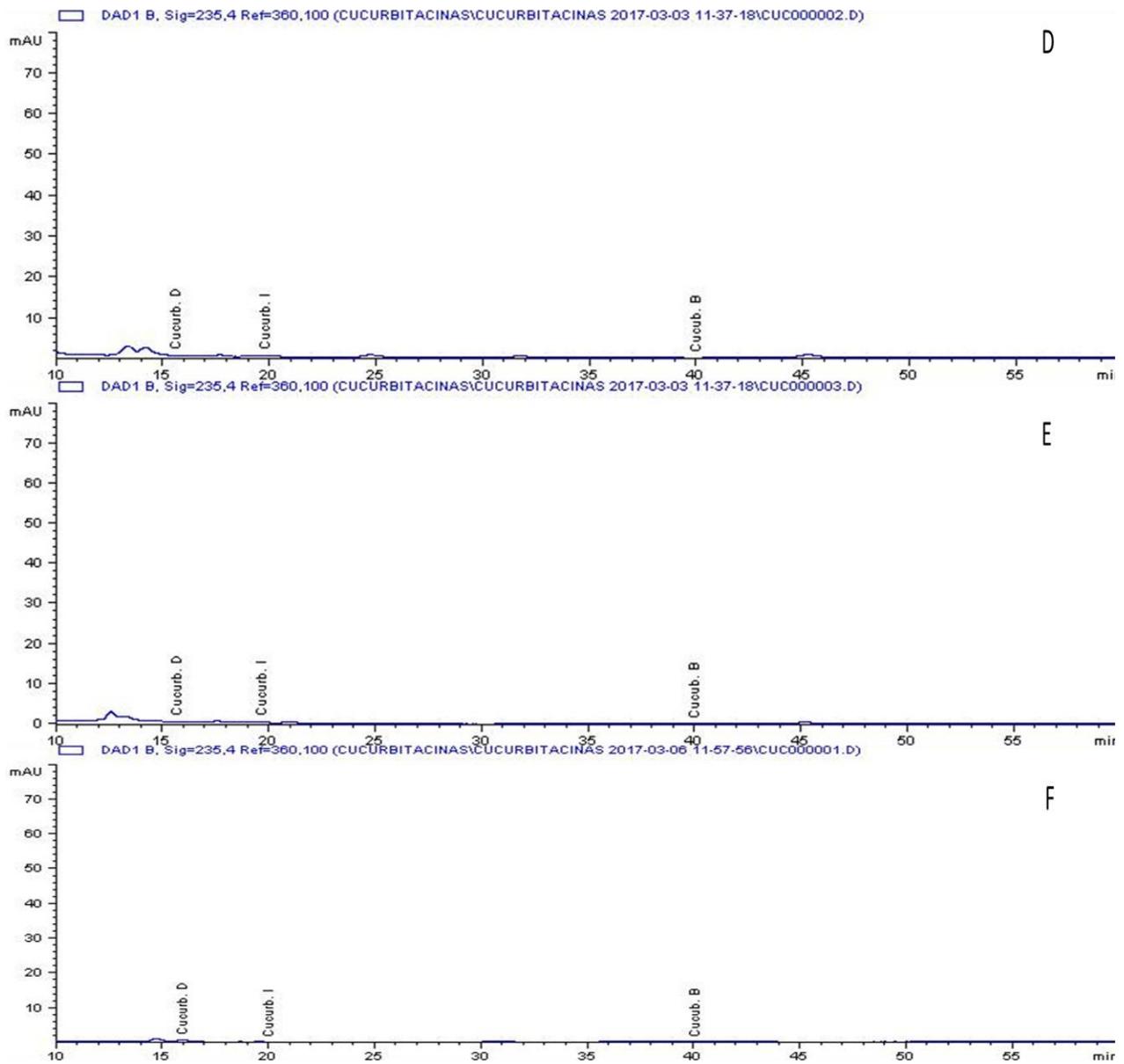


Figura 3.5. Cromatogramas de HPLC, para identificación de cucurbitacinas en frutos de *S. edule*, *var. nigrum minor* (D), *var. virens levis* (E) y *var. nigrum xalapensis* (F).

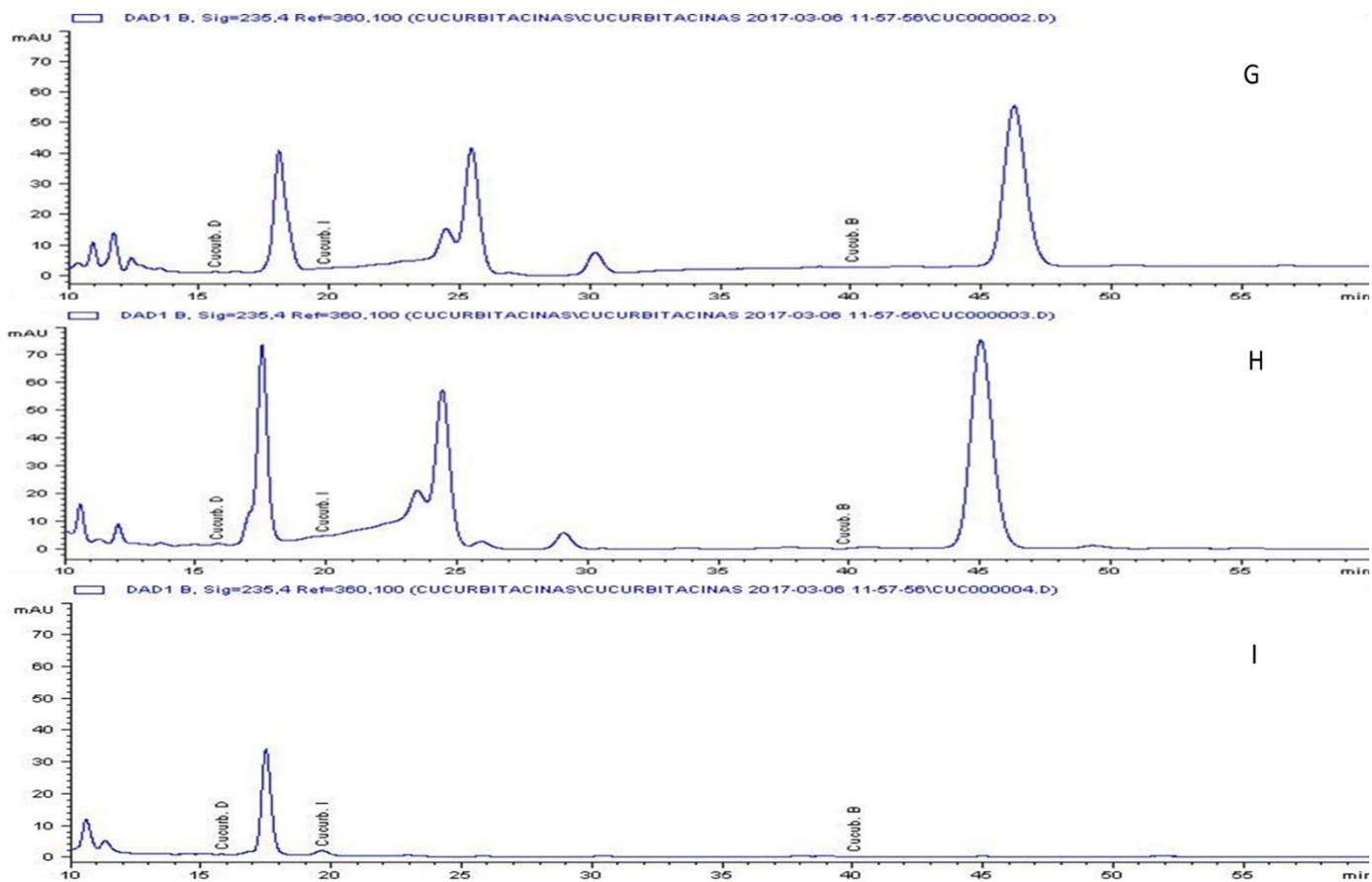


Figura 3.6. Cromatogramas de HPLC, para identificación de cucurbitacinas en frutos de *S. compositum* (G, H), y *Sechium edule* (I).

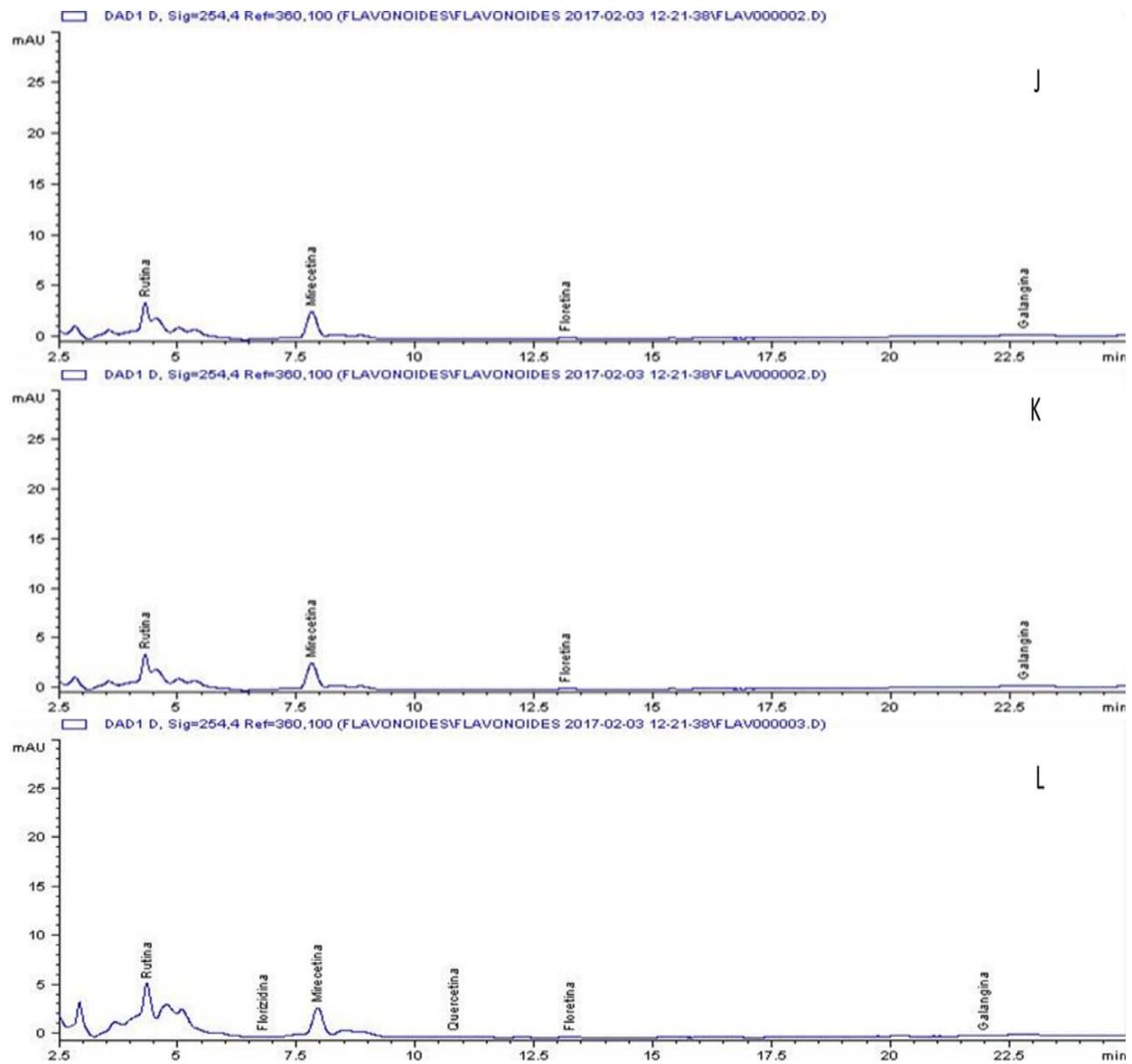


Figura 3.7. Cromatogramas de HPLC, para identificación de flavonoides en frutos de *S. edule* var. *albus levis* (J, K), y var. *albus minor* (L).

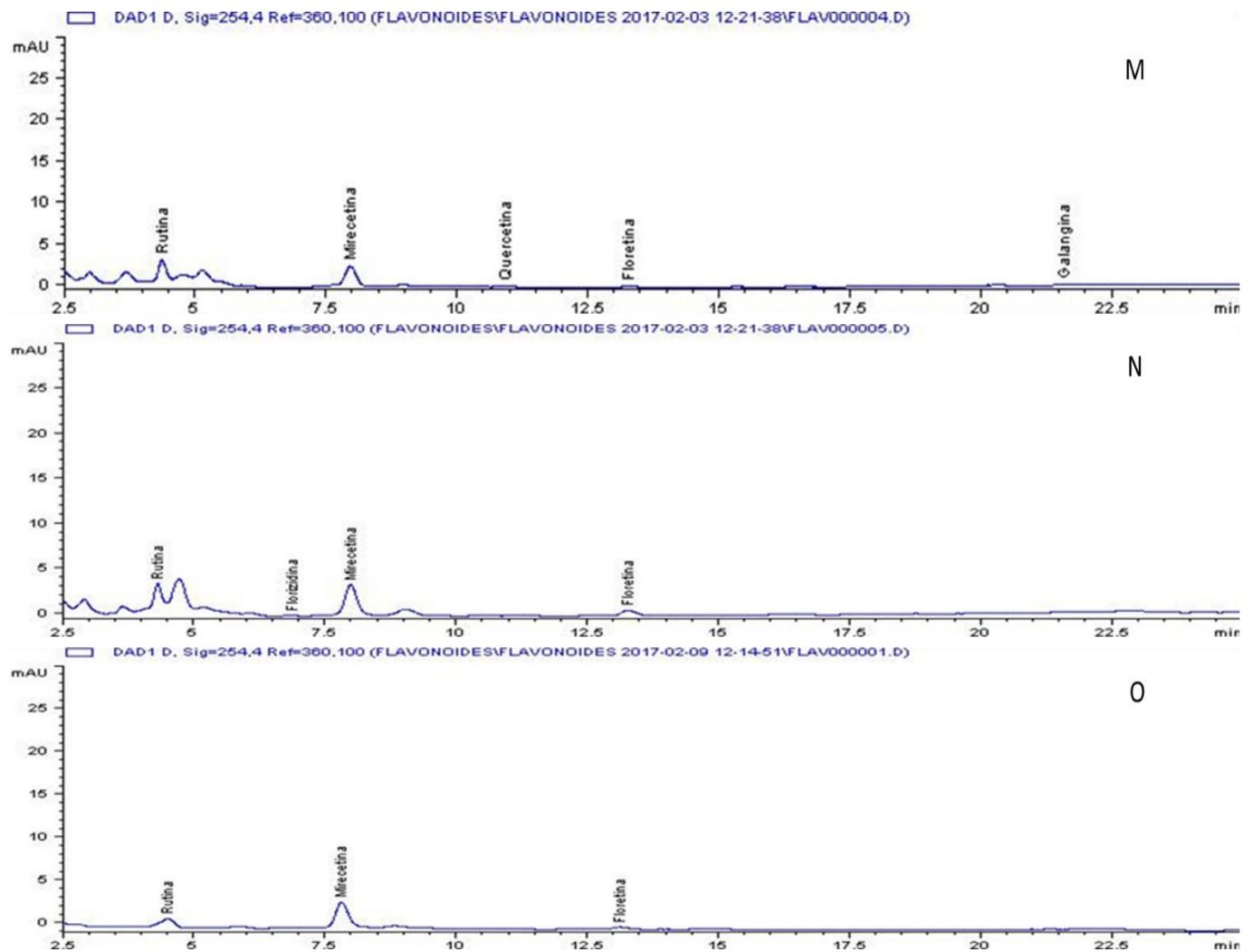


Figura 3.8. Cromatogramas de HPLC, para identificación de flavonoides en frutos de *S. edule*, *var. nigrum minor* (M), *var. virens levis* (L) y *var. nigrum xalapensis* (O).

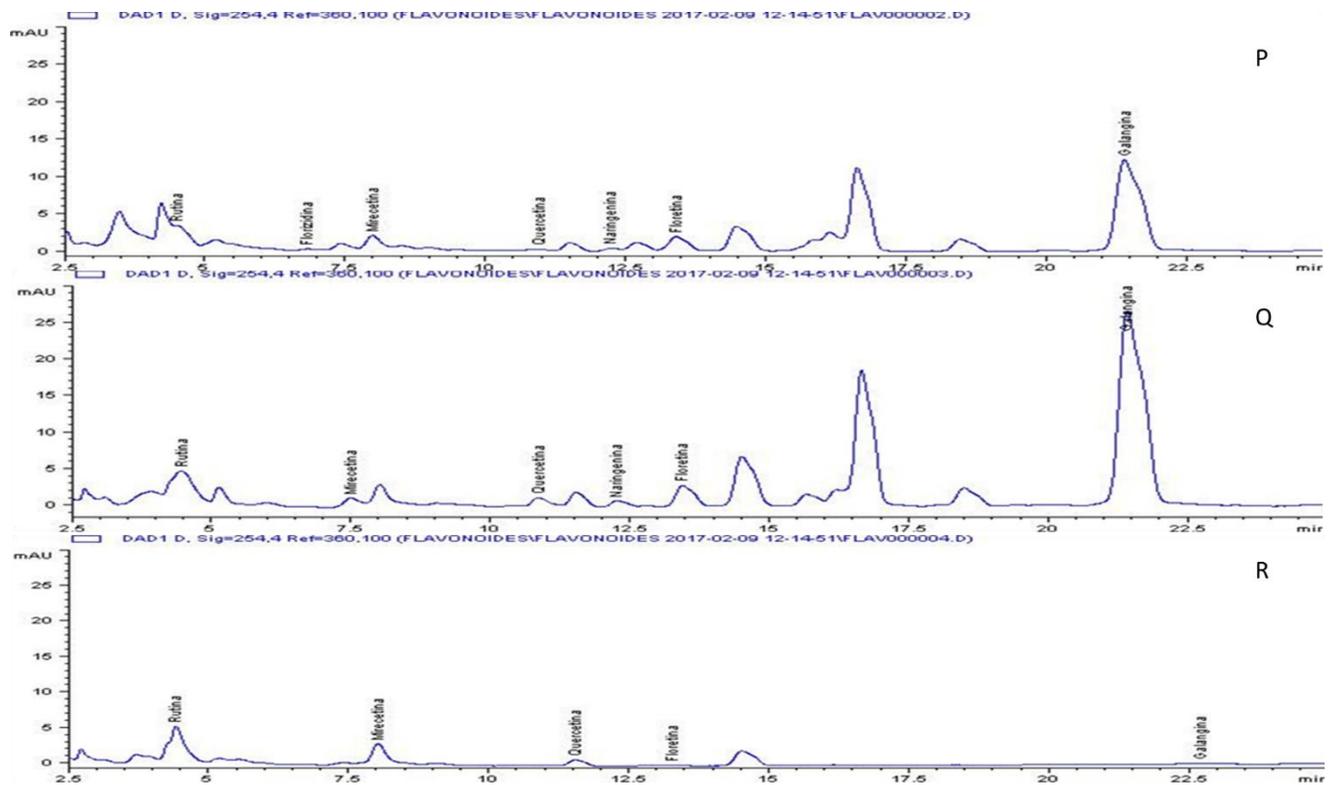


Figura 3.9. Cromatogramas de HPLC, para identificación de flavonoides en frutos de *S. compositum* (P, Q), y *Secchium edule* (R).

Con base en la identificación de cucurbitacinas y flavonoides, se evidencia la necesidad de realizar un análisis metabolómico que permita obtener una visión óptima de los contenidos químicos con empleo de herramientas espectroscópicas, tales como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS) e infrarojo (IR), las cuales ayudarían a generar una huella metabolómica de las plantas con interés terapéutico y farmacológico, que permita acreditar los compuestos bioquímicos activos (Michl, 2013). Los Cuadros 3.7 y 3.8, muestran la concentración media de cucurbitacinas y flavonoides, respectivamente por grupo de genotipos, los frutos dulces registraron una suma de 12.59 mg g^{-1} , los neutros 12.00 mg g^{-1} , y los amargos 24.78 mg g^{-1} . El tipo de metabolito presente imprime el sabor característico a cada uno de los frutos, por ejemplo, Tallamy *et al.* (1989) mencionan que la composición cualitativa de las cucurbitacinas entre especies de *Cucurbita* sp., fue mutuamente excluyente, es decir, que las especies producen cucurbitacinas B y D, o bien, cucurbitacinas E e I, con variación cualitativa adicional en la producción de glicósidos amargos; donde las B y D, se sintetizan en gran parte como agliconas (sin azúcar), mientras que la E, e I, regularmente se producen en cantidades

considerables de glucósidos (con azúcar). Al parecer en el caso de *Sechium*, no existió una síntesis excluyente de cucurbitacinas por genotipo, ya que registró la D, I, y B en todos los genotipos (intra e interespecíficos), y únicamente la E, se identificó en una accesión dulce. Lo anterior sugiere que no existe exclusión de síntesis, pero sí diferencias en cuanto a concentración. Cadena-Iñiguez (2005) y Cadena-Iñiguez *et al.* (2011) reportaron para ocho genotipos de *S. edule*, incluyendo el ancestro silvestre, menor diversidad de cucurbitacinas para este último (5 compuestos), y mayor para los domesticados de sabor neutro (24 compuestos), y de 15 a 21 para genotipos de frutos dulces. También reportan para dichos genotipos, que la suma de triterpenos asociados a algún tipo de azúcar fue de 59% y 41% correspondió a alguna forma libre de esta (agliconas). Aung *et al.* (1992) menciona que la glucosa y fructosa constituyen más del 90% de azúcares solubles del mesocarpo de *S. edule* (sin precisar el grupo varietal). Rios *et al.* (2012), señalan a la cucurbitacina I (también llamada JSI-124) como inhibidor selectivo de la tirosina fosforilada JAK3/STAT3, y que puede ser considerado como potencial agente anticancerígeno, así como, a cucurbitacina E y B, y Takahashi *et al.* (2009) reportaron la actividad de la cucurbitacina D, como inductor de la apoptosis en carcinoma hepático.

Cuadro 3.7. Concentración media de cucurbitacinas relacionada con el sabor del fruto de genotipos de *Sechium* P. Browne. Valores obtenidos de n= 36 ± error estándar.

Grupo	CuD	CuI	CuB	CuE	Σ Ms
Dulce	6.22±3.4	3.24±0.69	1.08±0.32	0.58±0.58	11.12
Neutro	5.15±4.14	5.16±0.57	0.54±0.14	0.00	10.85
Amargo	4.13±2.18	8.43±4.55	2.17±1.21	0.00	14.73

CuD= cucurbitacina D; CuI= cucurbitacina I; CuB= cucurbitacina B; CuE= cucurbitacina E

Cuadro 3.8. Concentración media de flavonoides relacionados con el sabor del fruto de genotipos de *Sechium* P. Browne. Valores obtenidos de n= 54 ± error estándar.

Grupo	Ru	Fz	Mi	Qu	Na	Ft	Ga	Σ Ms
Dulce	0.21±0.04	0.00	0.67±0.07	0.00	0.05±0.05	0.08±0.02	0.46±0.02	1.47
Neutro	0.15±0.05	0.03±0.03	0.71±0.24	0.0037	0.00	0.11±0.03	0.15±0.15	1.15
Amargo	0.83±0.21	0.36±0.04	0.92±0.37	0.11±0.05	0.72±0.46	1.23±0.62	6.21±3.42	10.05

Ru= rutina, Fz= florizidina, Mi= miricetina, Qu= quercetina, Ft= floretina, Ga= galangina.

El Cuadro 3.8, muestra que los genotipos amargos (silvestres) registraron mayor concentración de flavonoides, de los cuales cuatro correspondieron a flavonoles, dos a dihidrochalconas, y una flavona. Existen compuestos que no son de uso directo para la supervivencia de las plantas, pero ayudan a los organismos a funcionar mejor en su entorno (Piasecka *et al.*, 2015), denominados metabolitos secundarios (Ms), y se definen como “compuestos con presencia restringida en grupos taxonómicos, que no son necesarios para que una célula (organismo) viva, sino que juegan un papel en la interacción de la célula (organismo) con su entorno, que permite la supervivencia y una ventaja evolutiva en su ecosistema” (O’Connor, 2015). La producción de Ms, está frecuentemente asociada a condiciones de estrés biótico (bacterias, hongos, virus, insectos y herbívoros) y abiótico (sequía, salinidad, luz, CO₂, nutrientes y temperatura), siendo los más dañinos la alta incidencia de luz y deficiencia de nutrientes (Schlaepfer-Lorraine *et al.*, 2010; Bourgaud *et al.* 2001), lo que conlleva a la biosíntesis de metabolitos secundarios basados en carbón (fenólicos). De acuerdo con lo anterior, el exceso de carbohidratos acumulados en plantas con nutrientes limitados donde la fotosíntesis supera al crecimiento, se desvía a la producción de compuestos secundarios basados en carbono, y que al ser eliminada la restricción de nutrientes, se reinicia el crecimiento y equilibrio de actividad fotosintética. De acuerdo a la hipótesis de Balance de nutrientes de carbono (CNB; por sus siglas en inglés carbon nutrient balance), para el caso de limitación de nitrógeno, el metabolismo secundario se inclina hacia metabolitos ricos en carbono (fenólicos y terpenos), y cuando hay limitación, se incrementan los metabolitos ricos en nitrógeno (alcaloides) (Bryant *et al.*, 1983; Hamilton *et al.*, 2001; Palumbo *et al.*, 2007). A este respecto es prudente anotar que los genotipos domesticados y semidosmeticados de *Sechium*, cuentan en su evolución o historia de vida, con suministros, conscientes o no, de nutrimentos, preferentemente nitrogenados, sugiriendo influencia en la menor concentración de flavonoides y triterpenos, a diferencia de los tipos amargos, quienes en su estado silvestre, es posible que muestren deficiencias, y ello coadyuve a aumentar la cantidad de triterpenos y flavonoides. Estos últimos y otros metabolitos secundarios son compuestos considerados defensivos a características de estrés bióticas y abióticas de los entornos locales. Estos compuestos secundarios absorben la irradiación UV-B perjudicial en longitudes entre 280 nm y 320 nm y brindan función de pantallas biológicas (Tallamy *et al.*, 1989), sin embargo y de manera indirecta, se aprovechan en la tecnología alimentaria, por su capacidad para proporcionar un sabor amargo o dulce (Benavente-García *et al.*, 1997). Una diferencia estructural importante

para determinar el sabor en flavonoides, es el tipo de cadena glucosídica: rutinosida (rhamnopiranososa-R-1,6-glucopiranososa) y neohesperidosido (rhamnopiranososa-R-1,2 glucopiranososa). El primero produce sabor insípido, y los segundos, compuestos amargos, de modo que el neohesperidosido flavanones naringina, poncirina y neohesperidina son amargos, mientras que el rutinosido flavanones isonaringina, neoponcirina, y hesperidina son insípidos (Frydman *et al.*, 2004). En respuesta al objetivo planteado, se considera que existen evidencias fitoquímicas relevantes, que facilitan la selección de genotipos dulces, neutros y amargos, para diseñar cruzamientos genéticos en *Sechium*, partiendo de la relación de presencia, concentración y diversidad del(os) metabolito(s) de interés terapéutico y farmacológico presentes en un genotipo. Las cucurbitacinas y flavonoides registrados en el presente estudio, han demostrado actividad antiproliferativa, antioxidante, quelante, fragmentación de ADN e inducción de apoptosis (Cadena-Zamudio, 2013; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015, 2017; Salazar-Aguilar *et al.*, 2017). El sabor amargo es en al menos dos especies de *Sechium*, y variantes infraespecificas de una de estas, un carácter ancestral, que ha cambiado por modificaciones en cuanto a tipo y concentración de triterpenos y flavonoides, sobre todo en genotipos con rasgos de domesticación. La síntesis de MS, es activada en momentos particulares de estrés y fenológicos de la planta, por ello su biosíntesis y reacciones enzimáticas involucradas para su producción, pueden activarse o inhibirse genéticamente de acuerdo a condiciones de desarrollo del genotipo (Nugroho y Verporte 2002; O'Connor, 2015). La generación de datos transcripcionales y la identificación de genes candidatos involucrados en las rutas de síntesis de moléculas de interés, puede considerarse como el primer paso en una serie de proyectos futuros con creciente potencial biotecnológico, como por ejemplo, llevar a cabo la sobre-expresión de dichos genes, la expresión de los mismos en sistemas heterólogos, o bien, generando sistemas genéticos para su posible utilización en biorreactores.

3.7 Conclusiones

El análisis cladístico permitió identificar y contrastar la diversidad de cucurbitacinas y flavonoides, sugiriendo su relación con bandas genéticas polimórficas en nueve genotipos de *Sechium*, donde los materiales amargos (silvestres) mostraron mayor número de caracteres ancestrales, que los hacen genética y fitoquímicamente más complejos. Las diferencias entre chayotes de frutos dulces y neutros, respecto a los amargos, son atribuibles a domesticación y adaptación ambiental. Los flavonoides presentaron concentraciones más elevadas en las nueve

accesiones comparadas con las de cucurbitacinas, sin embargo, ambos grupos de metabolitos, están relacionados con actividad terapéutica, lo cual, resalta a los genotipos como fuente importante de biomasa y metabolitos de interés.

3.8 Literatura citada

- Aguñiga-Sánchez I., L.M. Ruiz-Posadas, A. Rivera-Martínez, E. Santiago-Osorio. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties *Sechium edule* (Jacq.) Sw. on tumour cell lines. *Journal of medicinal plants research*, 7(8): 455-460.
- Aguñiga-Sánchez I., M. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, L. Ruíz, J.D. Cadena-Zamudio, A. González, E. Santiago. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and cancer*, 67(2):250-257. 10.1080/01635581.2015.989370
- Aguñiga-Sánchez, I. 2017. Efecto antitumoral in vivo de *Sechium P. Browne* (Cucurbitaceae), Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 262 p.
- Aung, L. H., R. E. Rij, D. C. Fouse, J. E. Lindegren. 1992. Postharvest fruit respiration and soluble sugars changes of *Sechium edule* Swartz. *Phyton*, 53(2), 125-134.
- Avendaño-Arrazate C. H., J. Cadena-Iñiguez, M.L. Arévalo-Galarza, V.M. Cisneros-Solano, J.F. Aguirre-Medina, E.D.C. Moreno-Pérez, P. Ramírez-Vallejo. 2012. Genetic variation of an infraspecific chayote complex evaluated by isoenzymatic systems. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(2), 244-252.
- Barraza-Morales, A., F. L. Sánchez-Teyer, M. Robert, M. Esqueda, A. Gardea. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1).
- Benavente-García, O., J. Castillo, F. R. Marin, A. Ortuño, J. A. Del Río. 1997. Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 45(12), 4505-4515.
- Bishayeen A., S. Ahmed, N. Brankov, M. Perloff. 2011. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 16, 980.
- Bombardelli, E., P.Morazzoni. 1993 The flavonoids: New perspectives in biological activities and therapeutics. *Chim. Oggi*, July-August, 25-28.

- Bourgaud F., A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.
- Bracke, M. E., B. Vyncke, N. Van Larebeke, E. A. A. Bruyneel, G. K. De Bruyne, G. H. De Pestel, W. J. De Coster, M. F. Espeel, M. Mareel. 1989. The flavonoid tangeretin inhibits invasion of MO4 mouse cells into embryonic chick heart in vitro. *Clin. Exp. Metastasis*, 7, 283-300.
- Bryant J.P., F.S. Chapin, D.R. Klein. 1983. Carbon nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*. 40:357-368.
- Cadena-Iñiguez J. 2005. Caracterización Morfoestructural, Fisiológica, Química y Genética de Diferentes Tipos de Chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Tesis Doctorado en Ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 137 p.
- Cadena-Iñiguez, J., L. Arévalo-Galarza, L. M., Ruiz-Posadas, J.F. Aguirre-Medina, M. Soto-Hernández., M. Luna-Cavazos, H.A. Zavaleta-Mancera. 2006. Quality evaluation and influence of 1-MCP on *Sechium edule* (Jacq.) Sw. fruit during postharvest. *Postharvest biology and technology*, 40(2), 170-176.
- Cadena-Iñiguez J., C.H. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L.M. Ruíz-Posadas, J.F. Aguirre-Medina, L. Arévalo-Galarza. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 835-847.
- Cadena-Iñiguez J., R.M. Soto-Hernández, M. Arévalo-Galarza, C.H. Avendaño-Arrazate, J.F. Aguirre, L. M. Ruíz-Posadas. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(SPE. 2), 45-55.
- Cadena-Iñiguez, J., M.R. Soto-Hernández, A. Torres, I. Aguiñiga-Sánchez, L.M. Ruíz-Posadas, A. Rivera, E. Santiago-Osorio. 2013. The antiproliferative effect of chayote varieties (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) on tumour cell lines. *Journal of medicinal plants research*, 7(8): 455-460.
- Cadena-Zamudio J.D. 2013. Inducción de la fragmentación del ADN en líneas leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. (Tesis Licenciatura de Biología).

- Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores. México, D.F., 95 p.
- Cook, O. F. 1901. The chayote: A tropical vegetable. Bulletin No. 28. Division of Botany, U.S. Department of Agriculture, USA. pp. 7-31
- Cortés L. 1989. Distribución de 10 especies vegetales de uso medicinal en la República Mexicana en relación con factores físicos, bióticos y culturales. Tesis profesional, Biólogo, enero en Zaragoza, UNAM. México 69p.
- Croteau R, T.M. Kutchan, N.G. Lewis. 2000. Natural products (Secondary metabolites). In Buchanan B, Grussem W.Jones R (Eds), Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 1250-1318.
- De Luna E. 1995. Bases filosóficas de los análisis cladísticos para la investigación taxonómica. Acta Botánica Mexicana, (33), 63-79.
- Deschner, E. E., J. Ruperto, G. Wong, H. L. Newmark. 1993. The effect of dietary quercetin and rutin on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. Nutr. Cancer, 20, 199-204.
- Estrada L. E., T. B. Reyes, C. Navarro. 1995. Medicina tradicional y herbolaria a 500. México: Universidad Autónoma Chapingo; 1995. 439 p.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using thebootstrap. Evolution 39: 783-791
- Frydman, A., O. Weisshaus, M. Bar-Peled, D. V. Huhman, L. W. Sumner, F. R. Marin, Y. Eyal. 2004. Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene Cm1, 2RhaT encoding a 1, 2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. The Plant Journal, 40(1), 88-100.
- Gonzaga Gutiérrez, L. U. I. S. 2004. Marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de aliso *Alnus acuminata* HBK. Scientia et technica, 10(25).
- González-Stuart A, J.O. Rivera. 2009. Comparison of herbal products use in two largest border communities between the US and Mexico. Herbalgram; 81: 58-66.

- Hamilton J.G., A.R. Zangerl, E.H. DeLucia, M.R. Berenbaum. 2001. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology letters*, 4: 86-95.
- Jacobo-Herrera, N. J., F. E. Jacobo-Herrera, A. Zentella-Dehesa, A. Andrade-Cetto, M. Heinrich, C. Pérez-Plasencia. 2016. Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 179, 391-402.
- Lanyon S. M. 1985. Detecting internal inconsistencies in distances data. *Systematic Zoology* 34: 397-403
- Lira R., J. Castrejon, S. Zamudio, C. Rojas-Zenteno. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, (49):47-61.
- Manach, C., F. Regeat, O. Texier, G. Agullo, C. Demigne, C. Remesy. 1996. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res.*, 16, 517-544
- Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras, M. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.
- McKey, D., P. G. Waterman, C. N. Mbi, J. S. Gartlan, T. T. Struhsaker. 1978. Phenolic content of vegetation in two African rain forests: ecological implications. *Science (Wash., D.C.)* 202: 61-64
- Michl, J., H.M. Jennings, G.C. Kite, M.J. Ingrouille, M.S. Simmonds, M. Heinrich. 2013. Is aristolochic acid nephropathy a widespread problem in developing countries A case study of *Aristolochia indica* L. in Bangladesh using an ethnobotanical–phytochemical approach. *J. Ethnopharmacology*. 149(1):235-234. DOI: 10.1016/jep.2013.06.028.
- Molina-Mendoza, J. L., R. Galván-Villanueva, A. Patiño-Siciliano, R. Fernández-Nava. 2012. Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica*, (34), 259-291.
- Morrone, J. J. 2003. El lenguaje de la cladística. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 110 p
- Nugroho L.H., R. Verporte 2002. Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell Tissue Organ*. 68:105-125.

- O'Connor S.E. 2015. Engineering of secondary metabolism. *Annual Review Genetic*. 49: 71–94.
- Ocegueda S., E. Moreno, P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina Tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas* 62: 12-15.
- Ortega-paczka, R. 1999. Genetic erosion in Mexico. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección de Centros Regionales. 16 p.
- Palma-Tenango, R. San Miguel-Chávez, R.M. Soto-Hernández. 2017. Aromatic and Medicinal Plants in Mexico, *Aromatic and Medicinal Plants Back to Nature*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/66507. Available from: <https://www.intechopen.com/books/aromatic-and-medicinal-plants-back-to-nature/aromatic-and-medicinal-plants-in-mexico>.
- Palumbo M.J., F.E. Putz, S.T. Talcott. 2007. Nitrogen and gender effects on the secondary metabolism of yaupon, a caffeine-containing North American holly. *Oecologia*. 151:1-9.
- Perona, J. S., V. Ruiz-Gutiérrez, L. J. Barrón. 1999. La cromatografía líquida de alta eficacia en la separación de triglicéridos de grasas animales complejas. *Grasas y aceites*, 50(4), 298-311.
- Petronelli A., G. Pannitteri, U. Testa. 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anti-cancer drugs*, 20(10), 880-892.
- Piasecka, A., N. Jedrzejczak-Rey, Bednarek. P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, 206(3), 948-964.
- Rios, L. J., I. Andújar, M Escandell, J., M Giner, R., C Recio, M. 2012. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. *Current pharmaceutical design*, 18(12), 1663-1676.
- Riviello-Flores L.M. 2015. Evaluación de compuestos de importancia funcional en jugo de dos genotipos *Sechium edule* (Jacq.) Sw. (Tesis Maestría en ciencias). Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba. Amatlán de los reyes, Veracruz, 93 p.
- Robbins, R. J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.

- Rubiano, J. A., C. M. Z. Domínguez. 2012. Determinación y estandarización de un método para cafeína en el proceso de torrefacción por cromatografía líquida de alta eficiencia (Hplc). *Publicaciones e Investigación*, 6, 37-46.
- Salazar-Aguilar S. 2016. Microencapsulación de extractos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz) con fines terapéuticos (Tesis Doctorado en ciencias). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 101 p.
- Schlaepfer, L., J. A. Mendoza-Espinoza. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 41: 18-27.
- Shagai-marroof, M.A., K. M. Soliman, R.A. Jorgensen, R.W. Allard. 1984. Ribosomal spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:8014-8019.
- Takahashi, N., Y. Yoshida, T. Sugiura, K. Matsuno, A. Fujino, U. Yamashita. 2009. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. *International immunopharmacology*, 9(4), 508-513.
- Tallamy, D. W., V. A. Krischik. 1989. Variation and function of cucurbitacins in *Cucurbita*: an examination of current hypotheses. *The american naturalist*, 133(6), 766-786.
- Vega Á.E., R. Velasco-Lezama, M. Jiménez-Estrada. 2006. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. *Revisión. Bioquímica*, 31(3), 97-111.
- Villaseñor J L. 2016. Checklist of native vascular plants of México. *Revista mexicana de Biodiversidad*; 87b:559–902. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. D. Lee, M. Hornes, Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Yazaki K. 2005. Transporters of secondary metabolites. *Curr.Opin.PlantBiol.* 8:301–7

CONCLUSIONES Y DISCUSIONES GENERALES

1. Discusión general

La familia de Cucurbitaceae es considerada dentro de las más amplias y diversas cuentan con un total de 130 géneros y unas 800 especies (Jeffrey, 2005), dentro de esta se ubica a diferentes especies de *Sechium* P. Browne. De las especies más estudiadas, se encuentra *S. compositum*, *S. chinantlense* y *S. edule*, conocidos como chayotes. *S. edule* registra amplia diversidad infraespecífica (Cadena-Iñiguez, 2005), de la cual se ha reportado una compleja composición fitoquímica con amplia diversidad de metabolitos secundarios (MS) en concentraciones distintas (Aguñiga-Sánchez, 2017; Cadena-Iñiguez et al., 2011), atribuido a su plasticidad según las condiciones climáticas en las que se encuentren (Cadena-Iñiguez et al., 2008). Los metabolitos secundarios poseen propiedades medicinales, y algunos son aislados como principios activos (Molina-Mendoza et al., 2012), sin embargo, la síntesis de MS ocurre bajo condiciones de estrés de la planta, donde la biosíntesis y reacciones enzimáticas involucradas en la producción de éstos, pueden activarse o inhibirse genéticamente de acuerdo a condiciones de desarrollo del genotipo (Nugroho y Verporte 2002; O'Connor, 2015). Lo anterior ha sido aprovechado en investigaciones relacionadas con actividad biológica funcional contra líneas cancerígenas con acción selectiva (Aguñiga-Sánchez et al., 2015; Cadena-Iñiguez et al., 2013; Cadena-Zamudio, 2013), resaltando que los extractos de frutos de chayote color amarillo, tienen hasta cien veces menos contenido de metabolitos de interés funcional que las variedades de frutos verdes comestibles, y hasta mil veces menos contenido que los híbridos de frutos verdes y de sabor amargo (Cadena-Iñiguez et al., 2011). Este trabajo contribuye a mejorar las evidencias de la correcta identificación de los genotipos evaluados en estudios independientes, donde las diferencias fitoquímicas, genéticas y morfológicas, permitan identificar con precisión el genotipo empleado, facilitando su reproducibilidad y asegurando los efectos en la salud o alimentación humana. Lo anterior sugiere la posibilidad de diseñar con las mejores variables el uso bioprospectivo de los genotipos (Melgarejo, 2013).

2. Conclusiones generales

El meta análisis realizado con resultados de investigaciones independientes, facilitó identificar dentro de cada genotipo de *Sechium*, las variables relevantes y su estado en particular, creando

una excelente aproximación para diseñar futuras investigaciones, como por ejemplo, de mejoramiento genético. Como principales caracteres asociados a actividad biológica funcional, específicamente, actividad antineoplásica, fueron los de tipo ancestral, tales como el color verde oscuro de los frutos, sabor amargo, presencia de espinas, forma oblonga, forma piriforme, presencia de ocho cucurbitacinas (ICbE, DHCbE, CbE, ICbD, CbB, DHCbB, DHCbD y CbQI), los valores más altos de clorofila a y b, así como entre 62 y 100 bandas polimórficas obtenidas a partir de AFLP's según el enfoque de análisis cladístico y multivariado respectivamente; mismas que mostraron mayor relevancia estadística y cladística, considerándose como variables bioprospectivas, que actúan sobre la IC50, Porcentaje de proliferación y dosis efectiva de extractos de frutos de *Sechium*, sobre cinco líneas cancerígenas. Queda evidencia de que los genotipos de *Sechium* tienen fuertes diferencias morfológicas, bioquímicas y genéticas, de tal forma que no es posible tratarlos en una clasificación general, y que la distinción del genotipo es importante para la reproducibilidad de cualquier investigación.

La caracterización por AFLP's de los genotipos de tres especies de *Sechium*, reveló bajos niveles de diversidad genética; sin embargo, los tipos silvestres de chayote de sabor amargo, fueron los que registraron valores más altos en cuanto a heterocigocidad esperada, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo, seguido de los de color verde y sabor neutro, y los menos diversos fueron los de frutos amarillos de sabor dulce. Por la distribución observada en el cladograma, como un árbol monofilético, pareciera que *S. edule* es el taxón raíz, y que no existen barreras reproductivas aparentes para el entrecruzamiento genético intra e interespecífico, sugiriendo que la diferenciación en *S. compositum* y *S. chinantlense* no ha sido suficiente para ser tratadas como especies, facilitando la selección de genotipos.

Los perfiles fitoquímicos revelaron diferencias entre chayotes (dulces y neutros), respecto a los amargos asociándose a domesticación y plasticidad de la especie. La concentración de flavonoides y cucurbitacinas, identificó a los genotipos de frutos amarillos con mayor rendimiento en biomasa, y a los de frutos amargos con mayor número de metabolitos secundarios de interés terapéutico y farmacológico. Todos los genotipos registraron algún metabolito de interés, sin embargo, fueron los tipos silvestres los de mayor contenido en general, seguidos de los verdes de sabor neutro, mientras que los amarillos, registraron los valores inferiores de toda la muestra. El sabor amargo de los frutos de *Sechium*, es un carácter ancestral

que está dado por la mayor concentración de MS, y su disminución puede ser debido a efectos de su domesticación y adaptación al ambiente.

Mediante la caracterización genética por AFLP's, asociando la distribución observada de los genotipos, e índices determinados, se evidenció que existe un intercambio genético dinámico, ubica a las accesiones (genotipos de *Sechium*) como un pool genético entre tipos silvestres y domesticados con posibilidades de potenciación en diferentes usos. Los resultados en general, sugieren abordar al complejo de *Sechium*, partiendo de este trabajo, con herramientas de mayor precisión e incursionar en estudios metabolómicos.

3. Literatura citada

- Aguñiga-Sánchez I., M. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, L. Ruíz, J.D. Cadena-Zamudio, A. González, E. Santiago. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and cancer*, 67(2):250-257. 10.1080/01635581.2015.989370
- Aguñiga-Sánchez, I. 2017. Efecto antitumoral in vivo de *Sechium P. Browne* (Cucurbitaceae), Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Estado de México, 262 p.
- Cadena-Iniguez J., C.H. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L.M. Ruíz-Posadas, J.F. Aguirre-Medina, L. Arévalo-Galarza. 2008. Intraspecific variation of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. in the state of Veracruz, México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 835-847.
- Cadena-Iñiguez J., R.M. Soto-Hernández, M. Arévalo-Galarza, C.H. Avendaño-Arrazate, J.F. Aguirre, L. M. Ruíz-Posadas. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticadas de chayote *Sechium edule* (Jacq.) Sw. comparadas con parientes silvestres. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(SPE. 2), 45-55.
- Cadena-Zamudio J.D. 2013. Inducción de la fragmentación del ADN en líneas leucémicas y normales de ratón por extractos de *Sechium* spp. (Tesis Licenciatura de Biología). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores. México, D.F., 95 p.
- Jeffrey, C. (2005). A new system of Cucurbitaceae. *Ботанический журнал*, 90(3), 332-335.
- MA, J.; Yan, G. J.; Liu, C. J. 2012. Development of near-isogenic lines for a major QTL on 3BL conferring *Fusarium* crown rot resistance in hexaploid wheat. *Euphytica*, vol. 183, no 2, p. 147-152.
- Melgarejo L. 2013. Bioprospecting as a possible development mechanism for Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 19-30. Retrieved February 28, 2017

- Molina-Mendoza, J. L., R. Galván-Villanueva, A. Patiño-Siciliano, R. Fernández-Nava. 2012. Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica*, (34), 259-291.
- Nugroho L.H., R. Verporte 2002. Secondary metabolism in tobacco. *Plant Cell Tissue Organ.* 68:105-125.
- O'Connor S.E. 2015. Engineering of secondary metabolism. *Annual Review Genetic.* 49: 71–94.
- Palma-Tenango, R. San Miguel-Chávez, R.M. Soto-Hernández. 2017. Aromatic and Medicinal Plants in Mexico, *Aromatic and Medicinal Plants Back to Nature*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/66507. Available from: <https://www.intechopen.com/books/aromatic-and-medicinal-plants-back-to-nature/aromatic-and-medicinal-plants-in-mexico>.
- Rubiano, J. A., C. M. Z. Domínguez. 2012. Determinación y estandarización de un método para cafeína en el proceso de torrefacción por cromatografía líquida de alta eficiencia (Hplc). *Publicaciones e Investigación*, 6, 37-46.
- Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K. A., Brown, G. A., Horning, S., Korsmeyer, S. J. 2000. Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. *Nature genetics*, 24(3), 287.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.