

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL TEJOCOTE Y ANÁLISIS DE SUS COMPONENTES VOLÁTILES

MARÍA DOLORES PÉREZ LAINEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

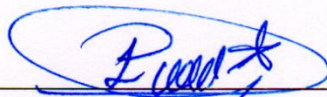
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe María Dolores Pérez Lainez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe 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 Profesor Tarsicio Corona Torres, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Caracterización molecular del tejocote y análisis de sus componentes volátiles 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 Consejero o Director 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.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 30 de abril de 2019



Firma del
Alumno (a)



Dr. Tarsicio Corona Torres
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis


La presente tesis titulada: **Caracterización molecular del tejacote y análisis de sus componentes volátiles** realizada por la alumna: María Dolores Pérez Lainez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA


CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dr. Tarsicio Corona Torres

DIRECTORA




Dra. María del Rosario García Mateos

ASESOR



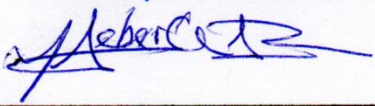
Dr. Raúl Nieto Ángel

ASESOR



Dr. Alejandro F. Barrientos Priego

ASESOR



Dr. Víctor Heber Aguilar Rincón

ASESOR



Dr. José Armando García Velázquez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2019.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL TEJOCOTE Y ANÁLISIS DE SUS COMPONENTES VOLÁTILES

María Dolores Pérez Lainez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2019.

RESUMEN

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae y subfamilia Maloideae, se distribuye principalmente en regiones templadas de Europa, Asia y Norteamérica. La amplia diversidad de este frutal se presenta principalmente en la zona Sur de México, no obstante, la complicada taxonomía de este género dificulta precisar del número de especies. El “tejocote” (*Crataegus* sp.), denominado así en México, ha sido objeto de diferentes estudios morfológicos que han contribuido en parte a la caracterización de los genotipos, sin embargo, algunos de estos no se han podido identificar con las claves taxonómicas existentes. En el presente estudio, con la finalidad de complementar la taxonomía basada en caracteres morfológicos, se utilizaron marcadores moleculares de ADN de cloroplastos, los cuales fueron secuencias cortas de ADN estandarizadas conocidas como “códigos de barras” para evaluar la variación genética de algunas accesiones de *Crataegus* presente en México; además, se analizó el perfil metabólico de los compuestos volátiles presentes en el aroma del fruto y se determinó el contenido de pigmentos (antocianinas y carotenos) para contribuir al valor agronómico, medicinal y principalmente quimitaxonómico del fruto tejocote. Los resultados muestran que la obtención de ADN de buena calidad se hizo con el protocolo de Doyle y Doly y CTAB modificado. Los códigos de barra empleados mostraron una clara separación de los *Crataegus* mexicanos de sus parientes relativos aunque dentro de las especies mexicanas no se observó separación. El estudio de compuestos volátiles en las accesiones bajo estudio permitió detectar un total de 75 compuestos de acuerdo a su abundancia y su relación masa-carga. Mediante los análisis de componentes principales los genotipos se agruparon de acuerdo a su tamaño y origen. El mayor contenido de pigmentos (carotenos y antocianinas) se encontró en el exocarpo del fruto.

Palabras clave: antocianinas, carotenos, códigos de barras, compuestos volátiles, *Crataegus* sp., tejocote, variación genética.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE TEJOCOTE AND ANALYSIS OF ITS VOLATILE COMPOUNDS

María Dolores Pérez Lainez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2019.

ABSTRACT

The genus *Crataegus* belongs to the family Rosaceae and subfamily Maloideae, it is distributed mainly in temperate regions of Europe, Asia and North America. The wide diversity of this fruit-tree occurs mainly in southern Mexico, however, the complicated taxonomy of this genus difficult to specify the number of species. The "tejocote" (*Crataegus* sp.), Named in Mexico, has been the subject of different morphological studies that have contributed in part to the characterization of the genotypes, however, some of these have not been identified with existing taxonomic keys. In the present study, in order to complement the taxonomy based on morphological characters, molecular markers of chloroplast DNA were used, which were short sequences of standardized DNA known as "barcodes" to evaluate the genetic variation of some accessions of *Crataegus* present in Mexico; In addition, the metabolomic profile of the volatile compounds present in the aroma of the fruit was analyzed and the content of pigments (anthocyanins and carotenes) was determined in order to contribute to the agronomic, medicinal and mainly chemotaxonomic value of the tejocote fruit. The results show that obtaining good quality DNA was done with the Doyle and Dolyle protocol and modified CTAB. The barcodes used showed a clear separation of the Mexican *Crataegus* from their relative relatives, although within the Mexican species no separation was observed. The study of volatile compounds in the accessions under study made it possible to detect a total of 75 compounds according to their abundance and their mass-load ratio. By using principal component analysis, the genotypes were grouped according to their size and origin. The highest content of pigments (carotenes and anthocyanins) was found in the exocarp of the fruit.

Key words: anthocyanins, carotenes, barcodes, volatile compounds, *Crataegus* sp., Mexican hawthorn, genetic variation.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico otorgado para lograr este grado académico.

Al **Colegio de Postgraduados**, en especial al **Posgrado en Recurso Genéticos y Productividad-Genética** por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación académica y así cumplir una meta más en mi vida profesional.

A la Dra. **Rosario García Mateos** por ser una vez más mi directora de tesis, por su confianza depositada en mí, por todo su apoyo, disposición y aportación para la realización del presente trabajo.

Al Dr. **Tarsicio Corona Torres** que aceptó ser mi consejero, así como su disposición y apoyo para colaborar en esta investigación.

A los Doctores **Alejandro Barrientos Priego, Raúl Nieto Ángel, Heber Aguilar Rincón y Armando García Velázquez** por todo el apoyo brindado, sus portaciones y disponibilidad para la realización del presente trabajo.

A la Dra. **Reyna Rojas Martínez** y al Dr. **Amalio Santacruz Varela** por su asesoría, así como reactivos y equipo prestado para la extracción de ADN.

Al Dr. **Robert Winkler** de Cinvestav Irapuato por permitirme ser parte de su equipo durante unos meses y su asesoría en el estudio metabólico.

A la **Dra. Obdulia** por su valiosa asesoría y apoyo en el análisis de secuencias.

A los técnicos de laboratorio **Ricardo Gaspar, Elisa, Cristina** y la maestra **Irma Sánchez** por el apoyo, consejos y facilidades otorgadas en el laboratorio.

A mis amigas **Nely, Claudia, Marcela, Maribel, Fanny, Lorena** y muchos más por sus consejos y apoyo.

Pero sobre todo a **DIOS** por darme la oportunidad de este logro....

DEDICATORIA

*A mis abuelitos **María**[†] y **Laureano**[†] que me educaron y apoyaron incondicionalmente en el inicio de mis estudios.*

*A mis padres **José** y **Hermila** que me dieron la vida y me han apoyado en todo momento.*

*A mis hermanas(os) **Manuel**, **Carmen**, **Luisa** y **Guadalupe** porque a pesar de la distancia siempre nos apoyaremos, principalmente a mis hermanas que dedicaron parte de su tiempo a cuidar a mi hijo cuando era bebe.*

*A mi hijo **Alejandro Yair** por ser mi inspiración y mi motivo para seguir adelante cada día.*

*A mi esposo **Alejandro** por todo su apoyo tanto moral, como en la colecta del fruto.*

*A mí cuñada **Blanca Olga**, por todo su apoyo y cuidados, a mí y a mi hijo en sus primeros cuatro meses de vida.*

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
BIBLIOGRAFÍA	5
CAPÍTULO 1 .COMPARACIÓN DE SEIS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN TEJOCOTE (<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé)	8
RESUMEN	9
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES	16
AGRADECIMIENTOS.....	17
BIBLIOGRAFÍA	17
CAPÍTULO 2 . CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN EN LA CARACTERIZACIÓN DE <i>Crategus</i> sp. MEXICANO Y SUS PARIENTES FORÁNEOS	20
RESUMEN	21
SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

CAPÍTULO 3 . ESTUDIO METABOLOMICO DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES EN EL FRUTO PIGMENTADO DE DIVERSOS GENOTIPOS DEL GENERO *Crataegus* DE MEXICO 45

 SUMMARY 46

 INTRODUCTION 46

 MATERIALS AND METHODS 48

 RESULTS AND DISCUSSION 53

 CONCLUSIONS 62

 REFERENCES 62

CONCLUSIONES GENERALES 68

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1. Evaluación promedio de los seis protocolos de extracción con relación a los tres tipos de material vegetal utilizado en la extracción de ADN de tejocote (<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé).....	15
Cuadro 2.1. Procedencia de las diferentes accesiones de tejocote mexicano (<i>Crataegus</i> spp).	24
Cuadro 2.2. Procedencia de las accesiones de <i>Crataegus</i> obtenidas del GenBank.	27
Cuadro 2.3. Variación genética para la región <i>matK</i> en diferentes especies del genero <i>Crataegus</i>	29
Cuadro 2.4. Variación genética para la región <i>rbcl</i> en diferentes especies del genero <i>Crataegus</i>	32
Cuadro 2.5. Variación genética para la región <i>psbA-trnH</i> en diferentes especies del genero <i>Crataegus</i>	35

LISTA DE TABLAS

Table 3.1. Geographical characteristics of 24 genotypes of the Mexican hawthorn (<i>Crataegus</i> sp.)....	49
Table 3.2. Eigenvalues and variance proportion explained by the principal component analysis of volatile compounds from the genotypes of <i>Crataegus</i>	54
Table 3.3. The five volatile compounds with increased relative intensity (%) by genotype.	57
Table 3.4. Volatile compounds identified by GC-MS in the <i>Crataegus</i> fruit.....	58
Table 3.5. Color parameters, total carotenoid content (TC) and total anthocyanins (TA) in the exocarp and mesocarp of 23 genotypes of the genus <i>Crataegus</i>	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Reconstrucción filogenética para las 54 secuencias de <i>Crataegus</i> analizadas para la región <i>matK</i> bajo el método de Máxima Verosimilitud. Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo.....	30
Figura 2.2. Reconstrucción filogenética para las 54 secuencias de <i>Crataegus</i> analizadas para la región <i>rbcL</i> bajo el método de Máxima Verosimilitud. Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo.....	33
Figura 2.3. Alineamiento de la región <i>psbA-trnH</i> para las especies de <i>Crataegus</i> analizadas en el programa MEGA 7.....	36
Figura 2.4. Reconstrucción filogenética de 53 secuencias de <i>Crataegus</i> con base en la región <i>psbA-trnH</i> , bajo el método de Máxima Verosimilitud. Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo. Barra en color amarillo=clado I, barra en color azul= clado II.	38
Figura 2.5. Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas con base en el análisis multilocus (<i>matk+rbcL+psbA-trnH</i>) bajo el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Tamura 3-parameter (Tamura, 1992). Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo.....	39
Figure 3.1. Fruit image of 24 hawthorn (<i>Crataegus</i> sp.) genotypes.....	50
Figure 3.2. Metabolomic profile of the volatile compounds obtained by LTP-MS. A) Genotype P86 (<i>C. mexicana</i>); B) genotype CH44 (<i>C. gracillior</i>).	53
Figure 3.3. Principal components of <i>Crataegus</i> sp. genotypes by volatile compounds.....	54
Figure 3.4. The heat map shows the abundance (color intensity) of each of the volatile compounds listed in the right column (m/z ratio). The dendrogram (upper part) shows the clusters of the genotypes by coloration of the hawthorn (<i>Crataegus</i> sp.) fruit.	55

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Crataegus* pertenece a la familia Rosaceae y subfamilia Maloideae, se le encuentra distribuido en Europa, Medio Oriente, el Este Asia, América del Norte, con puntos atípicos en Perú y Ecuador (Phipps, 1997; Phipps *et al.*, 2003). A nivel mundial incluye 150 especies, 95 de las cuales se encuentran en el continente americano y 15 de ellas existen en México (Núñez-Colín y Hernández-Martínez, 2011; Phipps, 1997; Phipps *et al.*, 2003).

México alberga a una amplia diversidad de frutales, incluido al tejocote (*Crataegus* sp.), el cual se localiza en climas fríos y templados, a altitudes que van desde 400 a 3000 m, en estados como: Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Durango, Chihuahua, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Puebla, Estado de México, Morelos, Jalisco y Michoacán (Nieto, 2007; Phipps, 1997). Sin embargo, el único estado donde se produce de manera comercial es en Puebla, lugar que concentra 95 % de la producción nacional (SIAP, 2017).

Actualmente, el tejocote se utiliza en la preparación de ponche, licores, mermeladas, ates, dulces, conservas, además de su consumo como fruto fresco, es utilizado en la decoración de altares en festividades como el día de muertos y navidad. También es utilizado como forraje, potainjerto y fuente de extracción de pectinas (Lozano-Grande *et al.*, 2016; Nieto y Borys, 1991; 1993). Sin embargo, a diferencia de otros frutales el tejocote no llegó a México con los españoles, este ya era utilizado, sembrado y recolectado por distintos grupos indígenas quienes utilizaban al fruto como alimento y diferentes partes de la planta tenían uso medicinal (Martínez, 1967).

La primera noticia que se tuvo sobre la existencia del tejocote en México fue dada por el Dr. Francisco Hernández, médico de Felipe II, en 1570, quien realizó una expedición para estudiar las producciones naturales de la Nueva España; sin embargo, fue hasta 1790 que Martín Sessé y José Mariano Mociño identificaron al tejocote con el nombre de *Crataegus mexicana*. Otro estudiante de *Crataegus*, fue W. W. Eggleston, quien describió algunas especies de México y América Central (Eggleston, 1909). Phipps (1983) propuso dividir el género *Crataegus* en secciones y series para facilitar su sistemática,

posteriormente (Phipps, 1997; Phipps *et al.*, 2003) modificaron parte de la taxonomía del tejojote del centro y norte de México, además describieron nuevas especies; no obstante, la clasificación de las especies de México, aún sigue sin ser clara, sobretodo tomando en cuenta que algunos genotipos no se han podido identificar con las claves existentes (Núñez-Colín *et al.*, 2008).

Núñez-Colín y Hernández-Martínez (2011) con base en los estudios de Eggleston (1909), Phipps *et al.* (1990), Phipps (1997), McVaugh (2000) y Phipps *et al.* (2003), propusieron la siguiente taxonomía para ejemplares mexicanos de *Crataegus*:

1) Serie Parvifoliae:

1. *C. uniflora*

2) Serie Mexicanae:

2. *C. mexicana*

3. *C. stipulosa*

4. *C. nelsoni*

3) Serie Crus-galli

5. *C. gracilior*

6. *C. rosei*: 6A. *C. rosei* subesp. *parryana*
6B. *C. rosei* subesp. *rosei*,
6Ba. *C. rosei* subesp. *rosei* var. *rosei*
6Bb. *C. rosei* subesp. *rosei* var. *mahindae*
6Bc. *C. rosei* subesp. *rosei* var. *amoena*

4) Serie Madrenses

7. *C. tracyi*: 7a. *C. tracyi* var. *tracyi*
7b. *C. tracyi* var. *coahuilensis*
7c. *C. tracyi* var. *madrensis*

8. *C. aurescens*

5) Serie Greggiana:

9. *C. greggiana*: 9a. *C. greggiana* var. *greggiana*

9b. *C. greggiana* var. *pepo*

10. *C. serratissima*

11. *C. sulfurea*

12. *C. grandifolia*: 12a. *C. grandifolia* var. *grandifolia*

12b. *C. grandifolia* var. *potosina*

6) Serie Baroussanae:

13. *C. baroussana*: 13a. *C. baroussana* var. *baroussana*

13b. *C. baroussana* var. *jamensis*

14. *C. cuprina*

15. *C. johnstonii*

Diferentes estudios han contribuido en parte a la caracterización de los genotipos mexicanos, principalmente aquellos basados en caracteres morfológicos (Niето, 2007; López-Santiago *et al.*, 2008; Núñez-Colín *et al.*, 2008; 2009; Betancourt-Olvera *et al.*, 2017), sin embargo, la clasificación sigue sin ser clara, sobre todo tomando en cuenta que algunos genotipos no se han podido identificar con las claves taxonómicas existentes (Núñez-Colín *et al.*, 2008).

Otras técnicas como las moleculares, donde Núñez-Colín *et al.* (2011) analizó 20 accesiones de *Crataegus* mediante la amplificación de las regiones ITS-1, ITS-2 y el gen 5.8s rDNA, encontrando muy alta similitud en las secuencias de estudio. Por otra parte, Betancourt-Olvera (2017) mediante el uso de microsatélites identificó la presencia de 3 grupos genéticos de *Crataegus* en la región Centro-sur de México con la influencia de flujo genético entre estos. Piedra-Mondragón *et al.* (2016) utilizaron datos morfológicos, microsatelites, así como las regiones intergénicas *trnH-psbA* y *trnH-rpl2* en la caracterización de *C. rosei*, quienes reportaron la presencia de dos taxas con alto flujo genético.

Por otra parte, los estudios fitoquímicos realizados en este frutal han sido direccionados al estudio de flavonoides y fenoles principalmente (García-Mateos *et al.*, 2012); la presencia de carotenos en el fruto de tejocote adquirido en un mercado local fue reportada por Méndez-Iturbide *et al.* (2013), mientras que la investigación de componentes volátiles es nula hasta el momento.

Sin embargo, a nivel mundial este género ha sido ampliamente estudiado, en la parte fitoquímica, Edwards *et al.* (2012) menciona la presencia de compuestos como fructosa, ácido cítrico, ácido málico, terpenos, flavonoides y un gran número de compuestos químicos identificados en al menos 27 diferentes especies y dos híbridos nativos de Europa, Asia, y América del Norte. En lo que respecta a la parte genética y molecular, investigadores como Lo *et al.* (2009) han trabajado en las asociaciones genéticas entre *Crataegus* del Este de Asia y Oeste de Norteamérica, indicando antiguos movimientos trans-Beringia de *Crataegus* entre Asia oriental y occidente de Norteamérica, estos investigadores proponen a Europa y el Este de América del Norte como las áreas más recientes de *Crataegus*. Autores Lo *et al.* (2007) y Zarrei *et al.* (2014; 2015) utilizaron marcadores taxonómicos para estudiar al género *Crataegus*, sin embargo, sólo incluyeron a un genotipo mexicano propagado en Estados Unidos denominado *Crataegus pubescens*, poco representativo de la diversidad fenotípica presente en México y que de acuerdo con Núñez-Colín y Hernández-Martínez (2011) corresponde a *Crataegus mexicana*.

OBJETIVO GENERAL:

- Analizar algunas accesiones del género *Crataegus* presentes en México mediante técnicas moleculares, evaluar el contenido de pigmentos e identificar el perfil metabolómico de los volátiles presentes en el fruto de tejocote.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar la variación genética de algunas especies de *Crataegus* presentes en México y su relación con especies foráneas, mediante el uso de marcadores moleculares tales como *matK*, *rbcL* y *psbA-trnH*.
- Evaluar el perfil metabolómico de compuestos volátiles presentes en el aroma del fruto de tejocote.
- Evaluar el contenido de carotenos y antocianinas en el fruto de tejocote.

BIBLIOGRAFÍA

- Eggleston W. W. (1909)** The Crataegi of Mexico and Central America. Bulletin of the Torrey Botanical Club 36(9):501-514.
- Edwards J. E., P. N. Brown, N. talent, T. A. Dickinson, P. R. Shipley (2012)** A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. Phytochemistry 79: 5-26.
- Betancourt-Olvera M., R. Nieto-Ángel, B. Urbano, F. González-Andrés (2017)** Analysis of the biodiversity of hawthorn (*Crataegus* spp.) from the morphological, molecular, and ethnobotanical approaches, and implications for genetic resource conservation in scenery of increasing cultivation: the case of Mexico. Genet. Resour. Crop. Evol. 65, 897-916. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0583-4>.
- García-Mateos R., L. Aguilar-Santelises, M. Soto-Hernández, R. Nieto-Ángel, G. Kite (2012)** Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus* spp. Agrociencia 46: 651-662. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a2.pdf>
- Lo E. Y.Y., S. Stefanovic, T. A. Dickinson (2007)** Molecular reappraisal of relationships between *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Pyreae) – Two genera or one? Systematic Botany 32(3): 596-616.
- Lo E. Y.Y., S. Stefanovic, K. I. Christensen, T. A. Dickinson (2009)** Evidence for genetic association between East Asian and western North American *Crataegus* L. (Rosaceae) and rapid divergence of the eastern North American lineages based on multiple DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 51: 157–168.
- López-Santiago J., R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, E. Rodríguez-Pérez, M. T. Colinas-León, M. W. Borys, F. González-Andrés (2008)** Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). Revista Chapingo Serie Horticultura 14(2): 97-111.
- Lozano-Grande M.A., S. Valle-Guadarrama, E. Aguirre-Mandujano, C. S. O. Lobato-Calleros, F. Huelitl-Palacios (2016)** Films based on hawthorn (*Crataegus* spp.) fruit pectin and candelilla wax emulsions: characterization and application on *Pleurotus ostreatus*. Agrociencia 50(7): 849-866.
- Martínez M. (1967)** Las Plantas Medicinales de México. 6° Ed. Editorial Botas. México. 657 p.

- McVaugh R. (2000)** Botanical results of the Sessé & Mociño expedition (1787-1803). VII. A guide to relevant scientific names of plants. Hunt Institute for Botanical Documentation and Carnegie Mellon University. Pittsburgh. 626 p.
- Méndez-Iturbide D., J. A. Banderas-Tarabay, A. Nieto-Camacho, A. Rojas-Chávez, M. G. García-Meza (2013)** Antioxidant capacity of extracts from hawthorn (*Crataegus mexicana*) skin. African Journal of Food Science 7: 50-158. <https://doi.org/10.5897/AJFS2013.1006>
- Nieto A. R. (2007)** Tejocote: *In*: Frutales Nativos, Un Recurso Fitogénético de México R. Nieto A. (Ed.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.pp: 25-118.
- Nieto Á. R., M. W. Borys (1991)** El tejocote (*Crataegus* spp.) en México, pp. 309-329. *In*: Avances en el Estudio de los Recursos Filogenéticos en México. Ortega P., R.; Palomio H., G.; Castillo G., F.; González H., V. A.; Livera M., M. (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. (SOMEFI), Chapingo, México.
- Nieto Á. R., M. W. Borys (1993)** El tejocote (*Crataegus* spp.); un potencial frutícola de zonas templadas. Revista Fruticultura Profesional. 54:63-71.
- Núñez-Colín C. A., y M. A. Hernández-Martínez (2011)** La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp.) en México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(1):141-153.
- Núñez-Colín C. A., R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, J. Sahagún-Castellanos, S. Segura and F. González-Andrés (2008)** Variability of three regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution. 55:1159-1165.
- Núñez-Colín C. A., J. Sahagún-Castellanos, F. González-Andrés, A. F. Barrientos-Priego, S. Segura and R. Nieto-Ángel (2009)** Identification of morphometrics traits for screening of tejocote (*Crataegus* spp.) germplasm for better yield potential. Fruits. 64:35-44.
- Núñez-Colín, C. A., E. Valadez-Moctezuma, A. F. Barrientos-Priego, F. González-Andrés, R. Nieto-Ángel (2011)** Variación de la región ribosómica nuclear en *Crataegus* L. del Centro y Sur de México. Agronomía Mesoamericana 22(1): 1-10.
- Phipps J. B. (1983)** Biogeographic, taxonomic, and cladistic relationships between East Asiatic and North American *Crataegus*. Annals of the Missouri Botanical Garden. 70:667-700.

- Phipps J. B. (1997)** Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, Subfam. Maloideae). SIDA Botanical Miscellany. 15:1-94.
- Phipps J. B., R. J. O’Kennon and R. W. Lance (2003)** Hawthorns and medlars. Timber Press, Portland, USA. 139 p.
- Phipps J. B., K. R. Robertson, P. G. Smith and J. R. Rohrer (1990)** A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). Canadian Journal of Botany 68:2209-2269.
- Piedra-Malagón E. M., A. L. Albarrán-Lara, J. Rull J, D. Piñero, V. Sosa (2016)** Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): the case of the *Crataegus rosei*. Systematics and Biodiversity. DOI: 10.1080/14772000.2015.1117027
- SIAP (2017)** Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Datos abiertos. http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos_a.php_consulta noviembre 2018.
- Zarrei M., S. Stefanovic, and T. A. Dickinson (2014)** Reticulate evolution in North American black-fruited hawthorns *Crataegus* section Douglasia; Rosaceae): evidence from nuclear ITS2 and plastid sequences. Annals of Botany 114: 253-269. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu116>
- Zarrei M., N. Talent, M. Kuzmina, J. Lee, J. Lund, P. R. Shipley, S. Stefanovic, and T. A. Dickinson (2015)** DNA barcodes from four loci provide poor resolution of taxonomic groups in the genus *Crataegus*. AoB Plants 7: plv045. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv045>

CAPÍTULO 1 .COMPARACIÓN DE SEIS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN EN TEJOCOTE (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé)

**COMPARISON OF SIX METHODS OF DNA EXTRACTION IN TEJOCOTE
(*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé)**

Publicado en Revista Fitotecnia Mexicana (2018)

Vol.41: 75-79.

RESUMEN

El uso de técnicas moleculares se inicia con la extracción de un ADN, íntegro y puro, por lo que es de gran importancia recurrir a protocolos que permitan obtener ADN con pureza y concentración elevada. En el presente estudio se evaluaron seis métodos de extracción de ADN: Dumolin, Doyle, Tsumura, Nuñez, CTAB modificado y Kit Wizard Genomic ADN; en brotes frescos y liofilizados; y hojas deshidratadas de tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). La mejor calidad de ADN se obtuvo con los métodos Doyle y CTAB, mientras que los mayores rendimientos fueron con el Kit y el método Doyle. Así mismo, se encontró que el material vegetal liofilizado proporcionó mayor rendimiento en todos los protocolos con respecto a los brotes frescos y hojas deshidratadas. En la verificación mediante la PCR ("Polymerase Chain Reaction") con el gen ribosomal 16S se encontró que este gen podía ser amplificado con los protocolos de Doyle, CTAB modificado y el Kit comercial.

Palabras clave: tejocote, protocolos de extracción de ADN, calidad de ADN, PCR.

SUMMARY

The use of molecular techniques begins with the extraction of DNA, it is full and pure, reason why it is of great importance to draw upon protocols that allow to reach DNA with a high purity and concentration. In the present work, six methods of DNA extraction were evaluated: Dumolin, Doyle, Tsumura, Núñez, CTAB and commercial Kit Wizard Genomic ADN; in fresh and freeze-dried shoots and leaves dried of tejocote (*Crataegus Mexicana* Moc. & Sessé). The best DNA quality was obtained with Doyle and CTAB methods, while the highest yields were obtained with the Kit and Doyle method. Likewise, lyophilized plant material provided higher yield in all protocols with respect to fresh shoots and dry leaves. In the PCR verification (Polymerase Chain Reaction) with the ribosomal 16S gene it was found that with the protocols of Doyle, modified CTAB and the commercial Kit this could be amplified.

Key words: tejocote, DNA extraction protocols, DNA quality, PCR.

INTRODUCCIÓN

El género *Crataegus* agrupa alrededor de 150 especies en el mundo; se encuentra en regiones templadas de Asia, Europa y Norte América, 95 de ellas se encuentran en el continente americano, de las cuales 13 se consideran originarias de México (Phipps, 1997). El tejocote se encuentra ampliamente distribuido a lo largo y ancho de la República Mexicana en altitudes que oscilan de los 400 hasta 3000 msnm (Nieto-Ángel y Borys, 1991). La importancia de este fruto radica en su amplia variabilidad en México y en su uso potencial como fruta fresca, portainjerto de otros frutales, forraje, fuente de pectina, ornamental, medicinal (Nieto-Ángel y Borys, 1993), su uso en la preparación de licores tradicionales y conservas.

Las investigaciones realizadas en este frutal se han enfocado a estudios principalmente morfológicos y fitoquímicos, sin embargo, las investigaciones moleculares dirigidas al conocimiento de la diversidad existente es limitada. Uno de los requisitos indispensables para la realización de estudios de filogenia molecular es la extracción de ADN de buena calidad. La calidad del ADN está determinada principalmente por la condición fisiológica o morfológica del material vegetal, así como su etapa de desarrollo (Moreira y Oliveira, 2011). La razón podría ser la gran diversidad de metabolitos secundarios como taninos, fenoles y polisacáridos, principalmente en hojas maduras (Moreira y Oliveira, 2011; Souza *et al.*, 2012). En tejocote, se ha reportado la presencia de: fenoles, taninos, flavonoides y antocianinas, así como polisacáridos (pectinas) (Cuevas-Bernardino, *et al.*, 2016; Edwards *et al.*, 2012; García-Mateos *et al.*, 2012).

Con la finalidad de obtener ADN puro e íntegro, en el presente estudio se evaluaron seis métodos de extracción de ADN de tejidos de tejocote considerando las relaciones de absorbencia 260/280 y 260/230, rendimiento, integridad y su funcionalidad en técnicas posteriores como PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares ubicado en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Para ellos se evaluaron seis métodos de extracción de ADN y tres tipos de tejido vegetal.

Material vegetal

Se utilizó tejidos de árbol tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé), accesión ATEX 02 originaria del Estado de Puebla, México, en tres presentaciones: brotes frescos, hojas jóvenes deshidratadas en sílica gel y brotes frescos liofilizados. El material vegetal que se usó en fresco y las hojas deshidratadas en sílica gel se colectaron directamente del árbol, los brotes liofilizados fueron obtenidos de varetas de árboles de tejocote brotadas bajo condiciones de invernadero; en su totalidad el material vegetal fue obtenido del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo localizado en las coordenadas 19° 29' de latitud Norte y 98° 53' de longitud oeste, a 2249 msnm. Los brotes liofilizados fueron previamente molidos en un molino TissueLyser II (QUIAGEN). Cada una de las muestras se extrajo por triplicado para cada uno de los métodos.

Extracción de ADN

Metodología de Dumolin et al. (1995). Para el caso de tejido fresco y deshidratado se molieron 100 mg de la muestra con nitrógeno líquido, el tejido se depositó en un tubo de 1.5 mL. Con respecto a tejido liofilizado, se colocaron 15 mg. Se añadieron 850 µl de amortiguador de extracción (EDTA 20 Mm, Tris-HCl pH 8.0 0.1 M, NaCl 1.4 M, CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) 2%, β-mercaptoetanol 1 % y PVP (polivinilpirrolidona) 1%), posteriormente se continuó con el protocolo como lo señalaron los autores.

Metodología de Doyle y Doyle (1990). Para este método 50 mg de brotes frescos y 50 mg de hojas deshidratadas se molieron con nitrógeno líquido, de tejido liofilizado se utilizaron 15 mg, las tres muestras se procesaron por triplicado.

Metodología de Tsumura et al. (1995). Se utilizaron 15 mg de brotes liofilizados y para tejido fresco o deshidratado se molieron 50 mg de material con nitrógeno líquido, las muestras fueron colocadas en tubos de 1.5 mL. Posterior a ello se continuó con la metodología como lo señalaron los autores. Cabe señalar que se adaptó esta metodología a una mini preparación en proporción 1:10 con respecto a la metodología original y con respecto a la cantidad de material fresco. Después de lo indicado por los autores se procedió de la siguiente manera. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionó 300 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se procedió a mezclar y centrifugar a 16000 xg durante 6 min. La fase acuosa fue nuevamente transferida a un nuevo tubo y se adicionó 0.1 volumen (25 µL)

de acetato de sodio 3 M y 250 μ L de etanol absoluto frío, se mezcló suavemente e incubó 12 h a 4°C. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados durante 14 min a 16000 x *g*, se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 400 μ L de etanol al 70 % para precipitar el ADN. Se centrifugó a 16000 x *g* por 8 min y se eliminó el etanol, se dejó secar por 2 h y finalmente se añadieron 100 μ L de TE (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, EDTA 0.1 mM). Esta solución de ADN se almacenó a -20°C.

Metodología de Weising et al. (2005) modificado por Núñez-Colín et al. (2011). Muestras de 15 mg de tejido liofilizado o 100 mg de tejido fresco o deshidratado (previamente molido con nitrógeno líquido), se colocó en tubos de 5 mL que contenía 3 ml de búfer de extracción [CTAB 2 %, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM] precalentado a 60 °C, las muestras se incubaron por 15 min a 55 °C, en baño María. Se mezcló por inversión durante 10 min. El contenido fue transferido a 3 tubos de 2.0 mL, se agregó 1 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) frío, se centrifugó a 6000 x *g* a temperatura ambiente por 10 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo con 600 μ L de isopropanol frío, se almacenó a 4 °C durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 6000 x *g* durante 10 min formándose una pastilla de ADN, se decantó el sobrenadante, se adicionaron 2 mL de solución de lavado (etanol 76 %, acetato de amonio 10 mM), se agitó y centrifugó a 6000 x *g* durante 10 min. Se decantó y se secó por 30 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 μ L de TE, la pastilla se dejó reposar por 12 h a 4 °C. Se agregaron 0.5 volúmenes (100 μ L) de solución de acetato de amonio 7.5 M, se mezcló y fue incubado a 4 °C durante 15 min. Se centrifugó a 12000 x *g* durante 30 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se agregó dos volúmenes (400 μ L) de etanol absoluto, y se almacenó a 4 °C durante una hora. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 6000 x *g* durante 10 min, el sobrenadante se eliminó; se adicionó 400 μ L de etanol al 70 %, nuevamente se centrifugó 6000 x *g* por 10 min. Se agregó un volumen de 100 μ L de TE, y reposó 12 h a 4 °C. Los contenidos de los tres tubos se unieron, se adicionaron 2 μ L de ARNasa (10 mg mL⁻¹) por cada 100 μ L de solución, la mezcla se incubó durante 60 min a 37 °C en un “termoblock”, posteriormente se adicionó un volumen de 300 μ L de fenol equilibrado con Tris-HCl pH 8.0, se mezcló y centrifugó a 16000 x *g* durante 16 min. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se agregó un volumen de 300 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y centrifugó a 16000 x *g* durante 6 min. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se adicionó 0.1 volumen (30 μ L) de acetato de sodio 3 M y un volumen de 300 μ L de etanol absoluto frío, se mezcló suavemente e incubó a 4 °C durante 12 h. Se centrifugó a 1000 x *g* durante 14 min, se eliminó

el etanol del tubo y se agregaron 400 μL de etanol al 70 % para lavar la pastilla de ADN. Se centrifugó a 10000 x g durante 8 min, se decantó y se dejó evaporar el etanol. Se agregó un volumen de 100 μL de TE y almacenó en el refrigerador a una temperatura de 4 °C

Protocolo de extracción CTAB modificado. Se pesaron 100 mg de hojas deshidratadas o brotes frescos, así como 15 mg de tejido liofilizado (previamente molidos), el material se colocó en tubos de 1.5 mL, se agregó 600 μL de amortiguador salino (Tris-HCL 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0, NaCl 2 M, albumina sérica 0.05 %), se mezcló en un vórtex, se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 5000 x g por 5 min y el sobrenadante se decantó y se agregaron 600 μL de amortiguador de extracción (Tris-HCL 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, CTAB 2.0 %) y 3 μL de β -mercaptoethanol, se mezcló con vórtex e incubó a 55°C por 60 min. Posteriormente, se agregaron 400 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 12000 x g por 10 min. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se agregaron 600 μL de isopropanol (-20 °C), se homogenizó por inversión; se dejó reposar 30 min a -20 °C. Se centrifugó a 5000 x g por 5 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 600 μL de etanol al 75 % (-20°C) se agitó en vórtex y se centrifugó a 5000 x g por 4 min. El sobrenadante se decantó y se evaporó el etanol. Se resuspendió la pastilla de ADN en 100 μL de agua grado biología molecular. Se homogenizó en un vórtex e incubó a 4 °C durante 12 h. Se agregaron 5 μL de ARNasa (10 mM·mL⁻¹), se incubó a 35 °C por 30 min y a 65 °C por 5 min para inactivar la ARNasa. Se agregaron 70 μL de acetato de sodio 3M y 700 μL de isopropanol frío, se agitó hasta obtener el precipitado de ADN y se colocó a -20°C durante 30 min. Se centrifugó a 8000 x g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de etanol al 70 %, se agitó y se centrifugó nuevamente a 8000 x g durante 10 min, se decantó, se dejó secar y se disolvió en 100 μL de TE.

Metodología Kit de Purificación Wizard Genomic ADN (Promega Corporation). Para este protocolo se utilizaron 40 mg de tejido fresco o seco (previamente molido con nitrógeno líquido) ó 15 mg de tejido liofilizado. En este caso se siguieron las indicaciones de acuerdo con el proveedor.

Determinación de la concentración y calidad del ADN

Para determinar la concentración y pureza de ADN se tomaron lecturas a 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop8000®) (Falcón y Varela, 2007; Valadez y Kahl, 2005).

La verificación de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Por cada pozo se depositaron 8 μL de ADN a una concentración de 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y 2 μL de amortiguador de carga (azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo durante 1.5 h a 100 V, el gel fue teñido con bromuro de etidio ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y fotodocumentado en un transiluminador (High Performance UV Transilluminator).

Para comprobar la utilidad del ADN obtenido en técnicas moleculares como la PCR, se amplificó el gen de referencia 16S, presente en todos los tipos de células de la muestra, que genera un producto de 315pb, la mezcla de reacción y el programa de PCR se corrió de acuerdo con Trejo-Saavedra, 2015.

El rendimiento de ADN se calculó a partir de la cantidad de material utilizado en cada protocolo y concentración total de ADN obtenida en $\text{ng} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño de tratamientos factorial, donde el primer factor fue los protocolos de estudio y el segundo factor los tipos de muestra. El diseño experimental fue un completamente al azar. Se utilizó el sistema de análisis estadístico SAS (Statistical Analysis System), se realizó un análisis de varianza para cada una de las variables con procedimiento ANOVA y GML, con una prueba de comparación de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de ácidos nucleicos en frutales puede ser técnicamente complicada debido a la gran cantidad de polisacáridos y compuestos polifenólicos que se acumulan durante la maduración y / o en respuesta a estímulos ambientales. En el presente estudio el material vegetal liofilizado proporcionó mayor rendimiento de ADN independientemente de los protocolos evaluados con respecto a brotes frescos y hojas deshidratadas (Cuadro 1). El sistema de secado por vacío, llamado liofilización, resultó más eficiente para preservar las características del material vegetal inicial (Brennan *et al*, 2011; Moreira *et al.*, 1994). En contraparte, en las hojas frescas, las enzimas se encuentran activas promoviendo la degradación de los compuestos fenólicos. En el caso de la deshidratación (secado con sílica gel), la temperatura y actividad acuosa tienen marcada influencia en la degradación y/o volatilización de algunos compuestos termosensibles (Dorta *et al.*, 2012).

En cuanto a pureza, Valadez y Kahl (2005) y Falcón y Varela (2007) mencionan que un ADN puro y de calidad debe estar en un rango de 1.8 a 2.0 para la relación A260/280 y 2.0 a 2.2 en la relación A260/230. Se observó que, a pesar del mayor rendimiento de ADN obtenido con el Kit comercial y para tejido liofilizado (Cuadro 1), éste no presenta los coeficientes mencionados para la relación A260/230, lo que indicó presencia de carbohidratos y fenoles.

Cuadro 1.1. Evaluación promedio de los seis protocolos de extracción con relación a los tres tipos de material vegetal utilizado en la extracción de ADN de tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé).

Protocolo	Muestra	Concentración (ng·µl ⁻¹)	Absorbencia A260/280	Absorbencia 260/230	Rendimiento de ADN (ng·mg ⁻¹)
	F	63.56 efg	1.68abcd	2.04 ab	0.63 d
Dumolin	D	101.08 efg	1.63 abcde	1.02 bcd	1.01 d
	L	913.67 abc	2.15 a	2.15 a	60.91 ab
	F	220.57 efg	1.80 abcd	0.69cd	4.41 d
Doyle	D	443.03 de	1.70 abcd	0.92 cd	8.86 cd
	L	1095.33 ab	2.05 ab	1.67 abc	73.02 a
	F	69.72 efg	1.11 e	0.44 d	1.39 d
Tsamura	D	41.25 fg	1.37 de	1.14 abcd	0.82 d
	L	418.93 def	1.48 cde	0.77 cd	27.92 c
	F	23.80 g	1.52 bcde	0.40d	0.24 d
Nuñez	D	40.05 fg	1.51 bcde	0.49 d	0.40 d
	L	85.20 efg	1.82 abcd	1.20 abcd	5.67 d
	F	136.39 efg	1.48 cde	0.43 d	2.72 d
CTAB	D	113.50 efg	1.36 de	0.49 d	2.27 d
	L	749.37 bcd	1.79 abc	2.02 ab	49.95 b
	F	189.87 efg	1.67 abcd	0.86 cd	4.74 d
Kit	D	695.20 cd	1.70 abcd	0.86 cd	17.38 cd
	L	1183.77 a	1.91 abc	0.96 bcd	78.92 a
DMSH		380.58	0.536	1.09	18.35
CV (%)		25.15036	9.080622	16.92	23.12450

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$). DMSH: diferencia mínima significativa honesta; CV: coeficiente de variación.

Los protocolos de Tsumura *et al.* (1995) y Nuñez-Colín *et al.* (2011) presentaron muy bajos rendimientos, esto último se relaciona al uso de fenol equilibrado que propicia un mayor número de lavados, lo que incurre en pérdida de ADN en los diferentes pasos. Estos mismos exhibieron muy baja pureza de acuerdo con las relaciones de absorbencia registradas (Cuadro 1), lo cual se pudo apreciar durante el proceso de extracción debido a la rápida oxidación del tejido fresco y a la presencia de un compuesto de consistencia gelatinosa en algunas muestras de ADN altamente contaminadas, esto es posible ya que el tejocote se caracteriza por su alto contenido de pectinas (polisacaridos) (Cuevas-Bernardino *et al.*, 2016) y fenoles (García-Mateos *et al.*, 2013) en fruto; y aun cuando en México no se ha estudiado la presencia de pectinas y fenoles en hoja, de manera general sí han sido indicados (Kirakosyan *et al.*, 2003; Salazar y Gamboa de Buen, 2013; Willats *et al.*, 2006;). Esto último coincide con lo encontrado por Meisel *et al.* (2005) quienes mencionan que polisacáridos y compuestos polifenólicos frecuentemente precipitan y contaminan los ácidos nucleicos durante la extracción, afectando así tanto la calidad como la cantidad de ácidos nucleicos aislados.

Los protocolos de Doyle y Doyle (1990) y CTAB modificado presentaron mejor calidad con respecto a las variables evaluadas y rendimientos altos.

De acuerdo con la PCR realizada con el ADN obtenido de las diferentes metodologías, se obtuvieron bandas alrededor de las 300 pb, indicando la amplificación del gen de referencia (16S) para los protocolos de CTAB, Doyle y Doyle (1990) y Kit, con lo cual se puede determinar que ellos pueden ser utilizados en técnicas moleculares para obtención de ADN de hojas de tejocote.

CONCLUSIONES

El material vegetal liofilizado proporcionó mayor rendimiento y calidad en todos los protocolos con respecto a brotes frescos y hojas deshidratadas.

Los protocolos de Doyle y Doyle (1990) y CTAB modificado, representan una alternativa para obtener ADN de buena calidad y rendimiento sin procedimientos tan largos y laboriosos evitando el uso de compuestos tóxicos y contaminantes (fenol), lo cual se verificó en cuanto calidad y ausencia de

inhibidores mediante la amplificación del gen ribosomal 16S, que mostró el ADN puede ser amplificado por PCR exitosamente.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México, por la beca doctoral otorgada al primer autor y segundo autor. Al Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández por el soporte técnico en marcadores moleculares de ADN.

BIBLIOGRAFÍA

Brennan J. G. (2006) Food Processing Handbook. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
<http://www.kelm.ftn.uns.ac.rs/literatura/pdms/FoodProcessingHandbook.pdf>

Cuevas-Bernardino J. C., C. Lobato-Calleros, A. Román-Guerrero, J. Alvarez-Ramirez, E.J. Vernon-Carter (2016) Physicochemical characterisation of hawthorn pectins and their performing in stabilising oil-in-water emulsions. *Reactive and Functional Polymers* 103:63–71.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.024>

Dorta E., M. G. Lobo, and M. González (2012) Using drying treatments to stabilize mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 45:261-268.
DOI:10.1016/j.lwt.2011.08.016

Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) A rapid total ADN preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.

Dumolin S., B. Demesure and R. J. Petit (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1253-1256. <https://doi.org/10.1007/BF00220937>

Edwards J. E., P. N Brown, N. Talent, T. A. Dickinson, P. R. Shipley (2012) A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 79:5-26. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.04.006

- Falcón L. I. y A. Varela (2007)** Extracción de ácidos nucleicos. *In: Ecología Molecular*. Eguiarte L. E. y V. Souza (eds). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. México, D.F. pp: 499-515. <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/530.pdf>.
- García-Mateos R., E. Ibarra Estrada, R. Nieto-Angel (2013)** Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:1298-1304. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.35675>.
- García-Mateos R., L. Aguilar Santelises, M. Soto-Hernández, R. Nieto-Angel y G. Kite (2012)** Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus* spp. de México. *Agrociencia* 46:651-662. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a2.pdf>
- Kirakosyan A., E. Seymour, P. B. Kaufman, S. Warber, S. Bolling and S. C. Chang (2003)** Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:3973-3976. DOI: 10.1021/jf030096r
- Meisel L., B. Fonseca, S. Gonzalez, R. B. Yates, V. Cambiazo, R. Campos, et al. (2005)** A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomic analyses. *Biology Research* 38:83-88. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602005000100010>
- Moreira T., A. Gutiérrez y H. Delgado (1994)** Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. *Bioteología Aplicada* 11:113-117. <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/ContenidoIssue.asp?ID=42>.
- Moreira P.A. and D.A. Oliveira (2011)** Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brasil. *Genetics and Molecular Research* 10: 353-358. doi 10.4238/vol10-1gmr1030
- Nieto-Ángel R. y M. W. Borys (1991)** El tejocote (*Crataegus* spp.) en México. *En: Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos en México*. Ortega P. R., H. G. Palomio, G. F. Castillo, V. A. González H., M. Livera M. (eds.). Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. (SOMEFI), Chapingo, México. pp. 309-329.
- Nieto-Ángel R. y M. W. Borys (1993)** El tejocote (*Crataegus* spp.), un potencial frutícola de zonas templadas. *Fruticultura Profesional* 54:64-71.

- Núñez-Colín C. A., E. Valadez-Moctezuma, A. F. Barrientos-Priego, F. González-Andrés y R. Nieto-Ángel (2011)** Variación de la región ribosómica nuclear en *Crataegus* L. del centro y sur de México. *Agronomía Mesoamericana* 22:1-10. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v22i1.8660>.
- Phipps J. B. (1997)** Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, Subfam. Maloideae). Botanical Research Institute of Texas, Inc. Sida, Botanical Miscellany No. 15. 94 pp
- Promega Corporation.** Wizard® Genomic ADN Purification Kit. Technical Manual. Promega Corporation. 2800 Woods Hollow Road. Madison, WI 53711-5399 USA. TM050. Revised 12/14. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol/>
- Salazar I. A. y A. Gamboa de Buen (2013)** Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Revista de Educación Bioquímica* 32: 67-75. <http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n2/v32n2a3.pdf>
- Souza H. A., Muller L. A., Brandão R. L., & Lovato, M. B. (2012)** Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research* 11:756-764. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.March.22.6>
- Trejo-Saavedra D. L., E. A. Rodríguez-Negrete y R. F. Rivera-Bustamante (2015)** Detección de transgenes en Organismos Genéticamente Modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Universitaria* 25:24-39. doi:10.15174/au.2015.906
- Tsumura Y., K. Yoshimura, N. Tomaru and K. Ohba (1995)** Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. *Theoretical and Applied Genetics* 91:1222-1236.
- Valadez M. E. y G. Kahl (2005)** Huellas de ADN en genomas de plantas. Mundi-Prensa México, S. A. de C. V. D. F., México. 147 p.
- Weising K., H. Nybon, K. Wolf and G. Kahl (2005)** ADN fingerprinting in plants. Principles, methods and applications. 2th Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 472 p. http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/Pdfs/DNA_Fingerprinting.pdf.
- Willats W. G., J. P. Knox and J. D. Mikkelsen (2006)** Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology* 17:97-104. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.008>

**CAPÍTULO 2 . CÓDIGOS DE BARRAS DE ADN EN LA CARACTERIZACIÓN DE *Cratogeomys* sp. MEXICANO Y
SUS PARIENTES FORÁNEOS**

**DNA BARCODES IN THE CHARACTERIZATION OF *Cratogeomys* sp. MEXICAN AND THEIR FOREIGN
PARENTS**

RESUMEN

El género *Crataegus* ampliamente distribuido en el hemisferio norte y con gran diversidad, representa un gran problema taxonómico a nivel mundial. En México se reporta la presencia de 15 especies con base en estudios morfológicos; sin embargo, su taxonomía aún es incierta ya que algunas especies no se han podido identificar con base en las claves existentes. El uso de herramientas moleculares, como los códigos de barras de ADN, provee utilidad para la rápida caracterización de especies y complementan la caracterización basada en la morfología. El objetivo del presente estudio fue analizar la variación genética de algunas especies de *Crataegus* presentes en México y su relación con especies foráneas, mediante el uso de los códigos moleculares *matK*, *rbcL* y *psbA-trnH*. Como resultado del análisis de las secuencias bajo el método de máxima verosimilitud se obtuvo la separación de las especies de *Crataegus* mexicano de sus parientes relativos; pero no se observó separación dentro de especies mexicanas probablemente debido a eventos recientes de divergencia e hibridación o que no sean especies si no variantes de una sola. La región de mayor variabilidad fue *psbA-trnH* seguida de *matK*, mientras que el locus *rbcL* fue el que mostró menor evolución y menor divergencia. Los resultados de este trabajo confirman una vez más el problema taxonómico de género *Crataegus*, principalmente en las especies mexicanas.

Palabras clave: *Crataegus*, filogenia, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcL*, tejocote, variación genética.

SUMMARY

The genus *Crataegus* widely distributed in the northern hemisphere and with great diversity, represents a major taxonomic problem worldwide. In Mexico, the presence of 15 species is reported based on morphological studies, however its taxonomy is still uncertain as some species have not been identified with the existing keys. The use of molecular tools, such as DNA barcodes, provide utility for the rapid characterization of species and complement characterization based on morphology. The objective of the present study was to analyze the genetic variation of some species of *Crataegus* present in Mexico and its relationship with foreign species through the use of the molecular codes *matK*, *rbcL* and *psbA - trnH*. As a result of the analysis of the sequences under the maximum likelihood method,

the separation of the Mexican *Crataegus* species from its relative relatives was obtained; however, null resolution was observed in Mexican species probably due to recent divergence and hybridization events or that are not species if not variants of a single. The region of greatest variability was *psbA-trnH* followed by *matK*, while the locus *rbcl* was the one that showed the lowest evolution and the least divergence. The results of this work confirm once again the taxonomic problem of the genus *Crataegus*, mainly in Mexican species.

Key words: *Crataegus*, phylogeny, hawthorn, *matK*, *psbA-trnH*, *rbcl*, genetic variation.

INTRODUCCIÓN

México es un país con amplia diversidad vegetal, a nivel mundial ocupa el quinto lugar después de Brasil, Colombia, China e Indonesia. En el área frutícola se reconocen alrededor de 762 especies, de las cuales 554 se consideran nativas de México, en este último grupo se incluye al tejocote (Segura *et al.*, 2018). El “tejocote”, denominado así en México, es un árbol frutal perteneciente a la familia de las rosáceas y al género *Crataegus*, se desarrolla principalmente en regiones templadas de Europa, Asia y Norteamérica. De acuerdo con Phipps, 1997; Phipps *et al.*, 2003 a nivel mundial éste incluye 150 especies ubicadas en 40 series. La amplia diversidad morfológica de este género se relaciona con eventos de hibridación, apomixis y poliploidía (Phipps, 2003; Talent y Dickinson, 2005; 2007; Lo *et al.*, 2009), sucesos que representan una dificultad para su identificación taxonómica. Para México, Núñez-Colín y Hernández-Martínez (2011) reportaron la existencia de seis series y 15 especies con base en los estudios taxonómicos de Eggleston (1909), Phipps (1997), Phipps *et al.* (1990; 2003) y McVaugh (2000). Sin embargo, la taxonomía del género *Crataegus* es aún incierta debido a la carencia de una clave taxonómica que incluya las especies del Sureste Mexicano, región donde existe amplia diversidad. Algunos estudios morfológicos de *Crataegus* en México (Nieto, 2007; López-Santiago *et al.*, 2008; Núñez-Colín *et al.*, 2008; 2009; Betancourt-Olvera *et al.*, 2017) han contribuido en parte a la caracterización de los genotipos; no obstante, la clasificación de las especies estudiadas aún sigue sin ser clara, sobre todo tomando en cuenta que algunos genotipos no se han podido identificar con las claves existentes (Núñez-Colín *et al.*, 2008).

Una herramienta que complementa a la taxonomía basada en caracteres morfológicos y permite la identificación rápida de especies, son los “códigos de barra”, secuencias cortas de ADN estandarizadas que permiten distinguir variación interespecífica (i.e., entre especies cercanamente relacionadas) y variación intraespecífica (i.e., dentro de la misma especie) (Paz *et al.*, 2011). El Consorcio de Código de Barras para la Vida (CBOL, por sus siglas en inglés) propuso algunas regiones del ADN de cloroplasto como marcadores taxonómicos, entre ellos los genes codificantes de proteínas *matK* y *rbcl*, los cuales en combinación han resuelto la discriminación entre especies en 72% (CBOL, 2009). Otra región propuesta también por este mismo equipo de trabajo y evaluada por Ferri *et al.* (2015) es el espaciador intergénico *psbA-trnH*, no codificante pero altamente variable, que en combinación con el locus conservado *rbcl*, proporciona información filogenética útil a un nivel intraespecífico. Por lo tanto, puede decirse que el valioso uso del ADN de cloroplasto en estudios filogenéticos se debe a su modo de evolución conservada y herencia uniparental (Raspé, 2001).

Algunos investigadores como Lo *et al.* (2007) y Zarrei *et al.* (2014) han intentado resolver la complicada taxonomía del género *Crataegus* mediante el uso de diferentes marcadores taxonómicos, sin embargo, sólo incluyeron a un genotipo mexicano propagado en Estados Unidos, poco representativo de la diversidad fenotípica presente en México. Actualmente, el único estudio en México donde se utilizó la región intergénica *trnH-psbA* fue el realizado por Piedra-Malagón *et al.* (2016) quienes se enfocaron en la caracterización de *C. rosei*. Por lo que el objetivo del presente estudio fue analizar la variación genética de algunas especies de *Crataegus* presente en México y su relación con especies foráneas, mediante el uso de los marcadores moleculares *matK*, *rbcl* y *psbA-trnH* presentes en el ADN de cloroplastos

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material de estudio provino del Banco de Germoplasma de Tejocote *ex situ* e *in vivo* de la Universidad Autónoma Chapingo (BGT-UACH), Estado de México, México, ubicado a 19° 29'N y 98° 53'

O y a 2249 msnm, cuenta con una superficie de 2.5 ha y alberga a 140 accesiones colectadas en el Centro y Sur del País (Nieto, 2007). El Clima del lugar está clasificado como C (Wo) (W) b (i') g, corresponde a templado subhúmedo, con precipitación media anual de 645 mm y una temperatura promedio anual de $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (García, 1988).

Se utilizaron 35 accesiones de tejocote de nueve especies cuyo origen se remonta a tres estados de la República Mexicana (Cuadro 1). Como genotipos de comparación se utilizó manzana "Royal Gala" (*Malus domestica* Borkh), pera "Conference" (*Pyrus communis* L.), una accesión de origen chino, catalogada como *Crataegus pinnatifida* Bunge, donada por el Dr. Leszek S. Jankiewicz (Instituto de investigación de Pomología Skiemiewiow, Polonia) y una accesión de origen español, *Crataegus monogyna* Jacq. , donada por el Dr. Michael W. Borys.

Cuadro 2.1. Procedencia de las diferentes accesiones de tejocote mexicano (*Crataegus* spp).

ACC	Lugar	Estado	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Especie
			N	W		
04	San Cristóbal de las Casas	Chiapas	16.75	92.67	2300	<i>Crataegus sulfurea</i> J.B. Phipps
05	Rancho Nuevo	Chiapas	16.67	92.57	2400	<i>Crataegus aurescens</i> J.B. Phipp
06	Rancho Nuevo	Chiapas	16.67	92.57	2400	<i>Crataegus cuprina</i> J.B. Phipps
08	San Cristóbal de las Casas	Chiapas	16.75	92.67	2300	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
10	San Cristóbal de las Casas	Chiapas	16.75	92.67	2300	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
13	Rancho Nuevo	Chiapas	16.67	92.57	2400	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
15	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus aurescens</i> J.B. Phipps
16	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
18	Rancho Robelo	Chiapas	16.67	92.45	2250	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
19	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus baroussana</i> Eggl.
20	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
22	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus rosei</i> subsp. <i>parryana</i> J.B. Phipps
25	Calpan	Puebla	19.10	98.47	2420	<i>Crataegus cuprina</i> J.B. Phipps
26	Calpan	Puebla	19.10	98.47	2420	<i>Crataegus gracilior</i> J.B. Phipps
27	Rancho Robelo	Chiapas	16.67	92.45	2250	<i>Crataegus gracilior</i> J.B. Phipps
38	San Nicolas Tlaminas	México	19.52	98.75	2520	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé

43	Rancho Robelo	Chiapas	16.67	92.45	2250	<i>Crataegus greggiana</i> Eggl.
44	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus gracilior</i> J.B. Phipps
50	San Nicolas Tlaminacas	México	19.52	98.75	2520	<i>Crataegus greggiana</i> Eggl.
51	Mitzitan	Chiapas	16.65	92.55	2380	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
52	Candelaria	Chiapas	16.70	92.53	2320	<i>Crataegus rosei</i> subsp. <i>rosei</i> J.B. Phipps
55	Huejotzingo	Puebla	19.17	98.40	2280	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
56	Huejotzingo	Puebla	19.17	98.40	2280	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
63	Tequexquinahuac	México	19.48	98.82	2460	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
64	Xamimilulco	Puebla	19.22	98.38	2220	<i>Crataegus rosei</i> subsp. <i>parryana</i> J.B. Phipps
65	Tequexquinahuac	México	19.48	98.82	2460	<i>Crataegus gracilior</i> J.B. Phipps
66	Santa Catarina del Monte	México	19.48	98.77	2700	<i>Crataegus gracilior</i> J.B. Phipps
69	Candelaria	Chiapas	16.70	92.53	2320	<i>Crataegus cuprina</i> J.B. Phipps
72	San José Yashitinin	Chiapas	16.65	92.45	2350	<i>Crataegus baroussana</i> Eggl.
83	San Cristóbal de las Casas	Chiapas	16.75	92.67	2300	<i>Crataegus tracyi</i> Ashe ex Eggl.
86	Huejotzingo	Puebla	19.17	98.40	2280	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
100	Huejotzingo	Puebla	19.17	98.40	2280	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
A02	Atexcac	Puebla	19.14	98.57	2620	<i>Crataegus mexicana</i> Moc. & Sessé
A05	Atexcac	Puebla	19.14	98.50	2628	<i>Crataegus rosei</i> subsp. <i>parryana</i> J.B. Phipps
A06	Atexcac	Puebla	19.14	98.50	2625	<i>Crataegus rosei</i> subsp. <i>parryana</i> J.B. Phipps

Nota: La clave en los dendrogramas está en función del número de accesión y el nombre de la especie, los organismos de comparación se señalan de acuerdo con su nombre científico.

Extracción de ADN genómico y Secuenciación

Se utilizaron brotes jóvenes liofilizados para la extracción de ADN genómico, los brotes se obtuvieron a partir de varetas sometidas a brotación en florero bajo invernadero en el Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el protocolo de Doyle y Doyle (1990) modificado por Betancourt-Olvera *et al.* (2018). Para determinar la concentración y pureza del ADN se tomaron lecturas en un espectrofotómetro NanoDrop8000® (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) que registró la concentración del extracto en $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, así como las relaciones A260/A280 y A260/A230. La verificación de la integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Por cada pozo se depositaron 8 μl de ADN a una concentración de $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 2 μl de amortiguador de carga (azul de bromofenol). La electroforesis se llevó a cabo durante 1.5 h a 100 V, posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 15 min y fotodocumentado en un transiluminador (High Performance UV Transilluminator, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Los iniciadores utilizados para la amplificación fueron: *matk foward* ACCCCATTCATCTGGAAATCTTGTTTC, *matk reverse* CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG (Zarrei *et al.*, 2015); *rbcl foward* ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC, *rbcl reverse* GTAAAATCAAGTCCACCRCG (Kress *et al.*, 2009); *psbA-trnH foward* GTTATGCATGAACGTAATGCTC (Sang *et al.*, 1997), *psbA-trnH reverse* CGCGCATGGTGGATTCACAAATC (Tate y Simpson, 2003). Las amplificaciones por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizaron en un termociclador Mastercycler® Eppendorf, en un volumen de 25 mL que contuvo 20 ng de ADN genómico, 200 mM de cada dNTP, 1X de amortiguador, 1.5 mM de MgCl_2 , 1 U de polimerasa Taq recombinante de Invitrogen TM y 0.5 μM de cada uno de los iniciadores de Sigma-Aldrich. Para verificar la amplificación de los fragmentos los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se corrieron en geles de agarosa a 1.5 % (p/v) con amortiguador TE (10 mM Tris-acetato pH 8, 1mM EDTA), por 60 min a 150 V. Los productos de la PCR fueron teñidos con bromuro de etidio ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y registrados en un fotodocumentador (High Performance UV Transilluminator). Posteriormente, se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y posteriormente fueron enviados a Macrogen Inc. (Seoul, Korea) para su secuenciación.

Edición, alineamiento y análisis de secuencias

Las secuencias forward y reverse de cada accesión fueron revisadas y ensambladas con el programa Sequencher, versión 3.0 (Gene Code, Ann Arbor, Michigan, USA) con refinamiento manual. El alineamiento se realizó con el programa Clustal W implementado en el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias ya alineadas se compararon con las registradas en el Banco de Genes (NCBI) mediante el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). Con la finalidad de comparar el germoplasma mexicano de *Crataegus* con germoplasma foráneo se obtuvieron 46 secuencias de nucleótidos del Genbank (15 para la región *matK*, 16 para *rbcl* y 15 para la región *psbA-trnH*); el origen, especie y número de resguardo se presentan en el Cuadro 2.

De cada una de las regiones se obtuvo información básica sobre niveles de variación nucleotídica: sitios conservados, sitios variables y singletons, implementados en el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias de nucleótidos codificantes (regiones *matK* y *rbcl*) se transformaron a aminoácidos con el código genético de plastidios para analizar la sustitución sinónima y/o no sinónimas de aminoácidos.

Cuadro 2.2. Procedencia de las accesiones de *Crataegus* obtenidas del GenBank.

Especie	País de colecta	<i>matK</i>	<i>rbcl</i>	<i>psbA-trnH</i>
<i>C. macracantha</i>	Estados Unidos	KC251078	KC251321	KC251594
	Estados Unidos	KC251080	KC252323	KC251596
	Estados Unidos	KC251084	KC251326	KC251600
<i>C. pinnatifida</i>	Rusia	KC251117	KC251368	
	Rusia	KC251118	KC251369	
	Rusia	KC251119	KC251370	
	China	KP089033		EU500276
	China	KP089034		EU500292
<i>C. brachyacantha</i>	Estados Unidos	KC251000	KC251218	KC251491
	Estados Unidos	KC251001	KC251219	KC251492
	Estados Unidos	KC251003	KC251226	KC251498
<i>C. laevigata</i>	Estados Unidos	KC251073	KC251317	KC251590
	Estados Unidos	KC251074	KC251318	KC251591
	Estados Unidos	KC251075	KC251319	KC251592
<i>C. azarolus</i>	Italia		HG765047	HG764978

	Italia	HG765048	HG764979
	Italia	HG765049	HG764981
<i>C. pubescens</i>	México	KC251371	KC251646
<i>C. monogyna</i>	España	KC251092	

Nota: La clave en el dendrograma corresponde a su número de resguardo en el GenBank y el nombre de la especie.

Análisis filogenético

La reconstrucción filogenética de las especies de *Crataegus* se realizó de manera independiente para cada región analizada (*matK*, *rbcL* y *psbA-trnH*), en ellos se incluyó a las secuencias obtenidas en el presente estudio y aquellas obtenidas del GenBank. Cada región se analizó con base en la matriz de distancias Distancia-P (proporción de diferencias de nucleótidos detectadas entre dos secuencias alineadas), que incluye los espacios como sitios informativos. Se usó el método de Máxima Verosimilitud con remuestreo (“bootstrap”) y 1000 repeticiones, los modelos de sustitución empleados fueron Tamura 3-parameter (Tamura, 1992) para la región *matK* y el espaciador *psbA-trnH*, para la región *rbcL* se utilizó el modelo Jukes Cantor (Jukes y Cantor, 1969); ambos modelos implementados con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016). También se incluyó un análisis multilocus a partir de la combinación de las tres regiones estudiadas (*matK* + *rbcL* + *psbA-trnH*), éste se obtuvo mediante el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Tamura 3-parameter (Tamura, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 208 secuencias fueron editadas, ensambladas y analizadas. La amplificación fue exitosa para la región *matK* en las 35 accesiones estudiadas en el presente trabajo, la región *rbcL* y *psbA-trnH* amplificaron sólo en 34 accesiones.

La región *matK* presentó buena calidad en la lectura y alineamiento de las secuencias, con una longitud de fragmento de 747 pb, similar a la longitud de secuencia presentada por Zarrei *et al.* (2015) de 783 pb. De manera general, se apreciaron 6 cambios dentro de especies (Cuadro 3), de ellos 5 son considerados como mutaciones no sinónimas. *C. brachyacantha* presentó una transición de C a T en la

posición 663, que dio origen al cambio del aminoácido Serina por Leucina. Las especies *C. macrocantha* y *C. pinnatifida* presentaron una transversión de T a G en la posición 58, lo cual generó la síntesis de Isoleucina en lugar de metionina. Otros cambios para *C. pinnatifida* en el ejemplar KP089034 fueron en las posiciones 110 y 260 de G a A y de C a A, estos modificaron la síntesis de valina y prolina a isoleucina y treonina, respectivamente. Para las nueve especies de *Crataegus* mexicano no se encontró variación a nivel interespecifico ni intraespecifico, las cuales se agruparon en un solo nodo junto con ejemplares de *C. laevigata*, *C. brachyacantha*, y *C. macracantha*, las primeras dos especies presentes en Estados Unidos y la última proveniente de España (Figura 1); en la misma figura se pudo observar la separación de *C. pinnatifida* y las especies mencionadas anteriormente con base en los cambios citados.

Cuadro 2.3. Variación genética para la región *matK* en diferentes especies del género *Crataegus*.

Especie	A nivel de nucleótidos							A nivel de aminoácidos					
	NS	LSN	SC	SV	SS	T	C	A	G	LSA	CC	CV	CS
<i>C. greggiana</i>	2	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. mexicana</i>	8	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. gracillior</i>	5	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. rosei</i>	5	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. baroussana</i>	2	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. tracyi</i>	7	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. cuprina</i>	3	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. aurescens</i>	2	747	741	0	0	36.8	17.1	29.8	16.2	248	245	0	0
<i>C. monogyne</i>	2	677	607	0	0	36.9	17.4	29.0	16.6	248	202	0	0
<i>C. macracantha</i>	3	747	740	1	1	36.8	17.1	29.8	16.3	248	244	1	1
<i>C. laevigata</i>	3	747	747	0	0	36.9	17.2	29.7	16.2	248	248	0	0
<i>C. brachyacantha</i>	3	747	740	1	1	36.8	17.1	29.8	16.5	248	244	1	1
<i>C. pinnatifida</i>	6	747	737	4	4	36.9	17.1	29.8	16.2	248	242	3	3
<i>C. sulfurea</i>	1	734	-	-	-	36.9	17.0	29.8	16.2	248	-	-	-
Grupo externo	2	747	723	8	0	36.7	17.1	30.0	16.3	248			
TOTAL	54	747	732	15	12					248	237	11	1

NL=número de secuencias por especie, LSN= longitud de secuencia alineada en pb, SC=, número sitios constantes, SV= número de sitios variables, SS= sitios singletones, LSA= longitud de secuencia en aminoácidos, CC= codones constantes, CV=codones variables, CS=codones singletones.

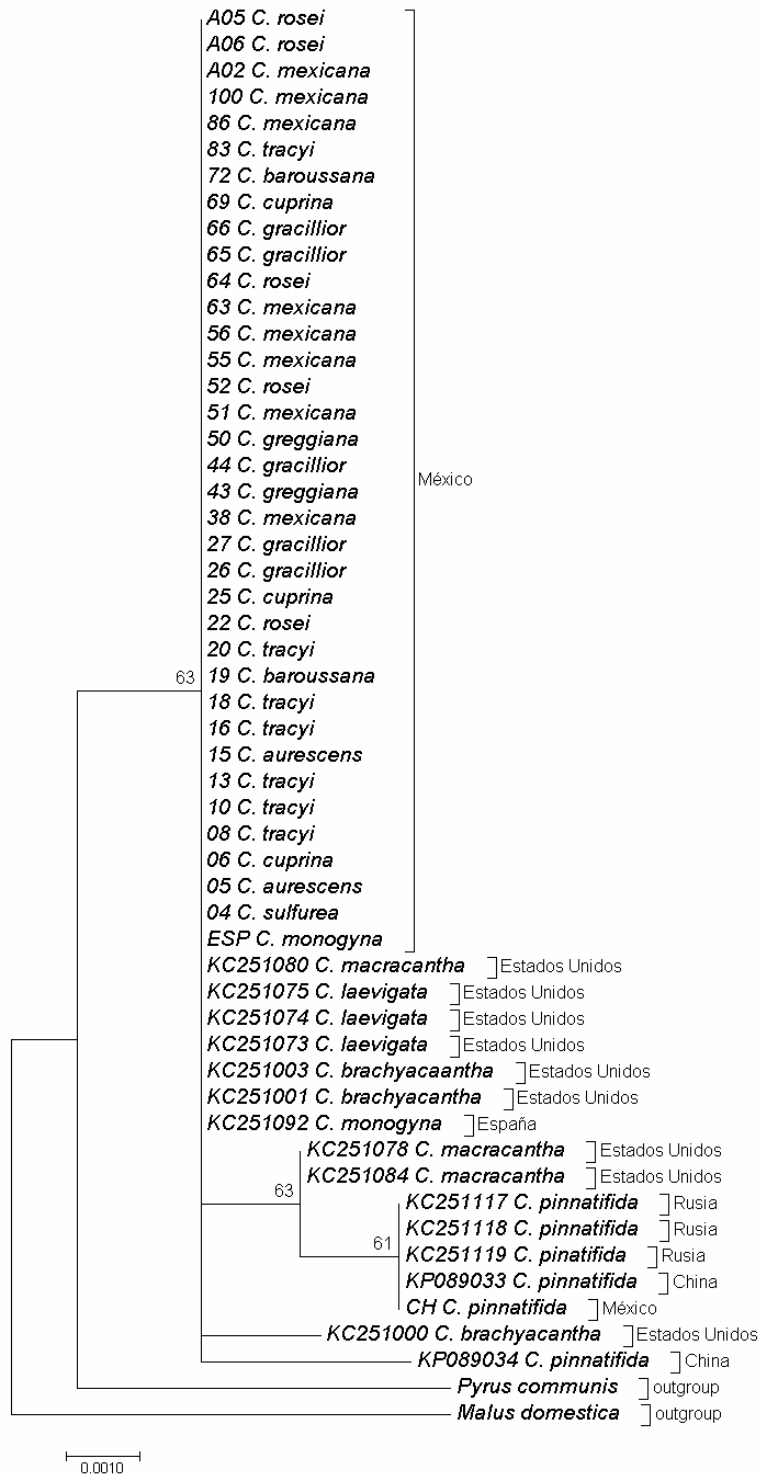


Figura 2.1. Reconstrucción filogenética para las 54 secuencias de *Crataegus* analizadas para la región *matK* bajo el método de Máxima Verosimilitud. Los números sobre los nodos indicaron la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo.

Los cambios en las posiciones 58 y 110 para *C. pinnatifida* que propician la síntesis de isoleucina sugirieron que *C. pinnatifida* se desarrolla en un ambiente estresante que favorece la síntesis de este aminoácido. Isoleucina es un metabolito característico de desarrollo en condiciones de estrés osmótico (sequía, inundación y salinidad), el cual se sintetiza a partir de treonina o metionina (Hidebrant *et al.*, 2015). En particular, para *Arabidopsis* en estrés por sequía el incremento en la síntesis de isoleucina puede ser de hasta 80 veces superior al incremento de la síntesis de prolina (Joshi *et al.*, 2010). Las observaciones previas no son sorprendentes, todo tomando en cuenta que el género *Crataegus*, se adapta fácilmente a condiciones de desarrollo desfavorables, es decir, en zonas montañosas con escasez de agua, suelo someros y pobres nutrimentalmente, en condiciones de temperaturas bajas y altas tasas de radiación (Christensen, 1992; Nieto y Borys, 1993; Pérez *et al.*, 2004).

Las secuencias correspondientes al gen *rbcl* también presentaron buena calidad de lectura, las cuales después de ser editadas y ensambladas dieron origen a un consenso de 490 pb o 163 aminoácidos, 62 pb menor al fragmento reportado por Zarrei *et al.* (2015). De acuerdo con el análisis, a nivel interespecífico se presentaron siete sitios variables que dieron lugar a cuatro aminoácidos diferentes (Cuadro 3). De los cambios mencionados, cuatro fueron evidentes en *C. brachyacantha* con dos mutaciones sinónimas y dos no sinónimas. Las mutaciones no sinónimas se presentaron en la primera posición del codón, en las posiciones 230 y 377, los cuales dieron lugar al cambio de los aminoácidos alanina e isoleucina por prolina y valina, respectivamente. Metabolitos como la prolina, isoleucina y valina son importantes desde el punto de vista energético en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, los cuales se sintetizan en respuesta a diferentes tipos de estrés (sequía, salinidad, frío, altas temperaturas e inundación); el hecho de que *C. brachyacantha* sintetice prolina en lugar de isoleucina sugirió un ambiente menos estresante en su desarrollo en comparación con las demás especies; de acuerdo con reportes en *Arabidopsis* y tomate, Isoleucina se encontró en cantidades superiores a prolina en condiciones de estrés por sequía (Hidebrant *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2010). El uso de diferentes codones puede afectar a la expresión de proteínas entre las diferentes especies debido a sesgo del uso de codón.

Cuadro 2.4. Variación genética para la región *rbcl* en diferentes especies del genero *Crataegus*.

Especie	A nivel de nucleótidos								A nivel de aminoácidos				
	NS	LSN	SC	SV	SS	T	C	A	G	LSA	CC	CV	CS
<i>C. greggiana</i>	2	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. mexicana</i>	8	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. gracillior</i>	5	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. rosei</i>	5	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. baroussana</i>	2	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. tracyi</i>	7	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. cuprina</i>	3	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. aurescens</i>	2	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. azarolus</i>	3	490	490	0	0	29.8	21.0	26.7	22.4	163	163	0	0
<i>C. macracantha</i>	3	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. laevigata</i>	3	490	490	0	0	29.8	21.0	26.7	22.4	163	163	0	0
<i>C. brachyacantha</i>	3	490	490	0	0	29.8	21.0	26.7	22.4	163	163	0	0
<i>C. pinnatifida</i>	4	490	490	0	0	29.8	20.8	26.9	22.4	163	163	0	0
<i>C. monogyna</i>	1	490	-	-	-	-	-	-	-	163	-	-	-
<i>C. sulfurea</i>	1	490	-	-	-	-	-	-	-	163	-	-	-
<i>C. pubescens</i>	1	490	-	-	-	-	-	-	-	163	-	-	-
Grupo externo	2	490	486	3	0	29.8	20.9	26.6	22.7	163	162	1	0
TOTAL	53	490	483	7	3	29.8	20.9	26.9	22.5	163	159	4	1

NL=número de secuencias por especie, LSN= longitud de secuencia alineada en pb, SC=, número sitios constantes, SV= número de sitios variables, SS= sitios singletones, LSA= longitud de secuencia en aminoácidos, CC= codones constantes, CV=codones variables, CS=codones singletones.

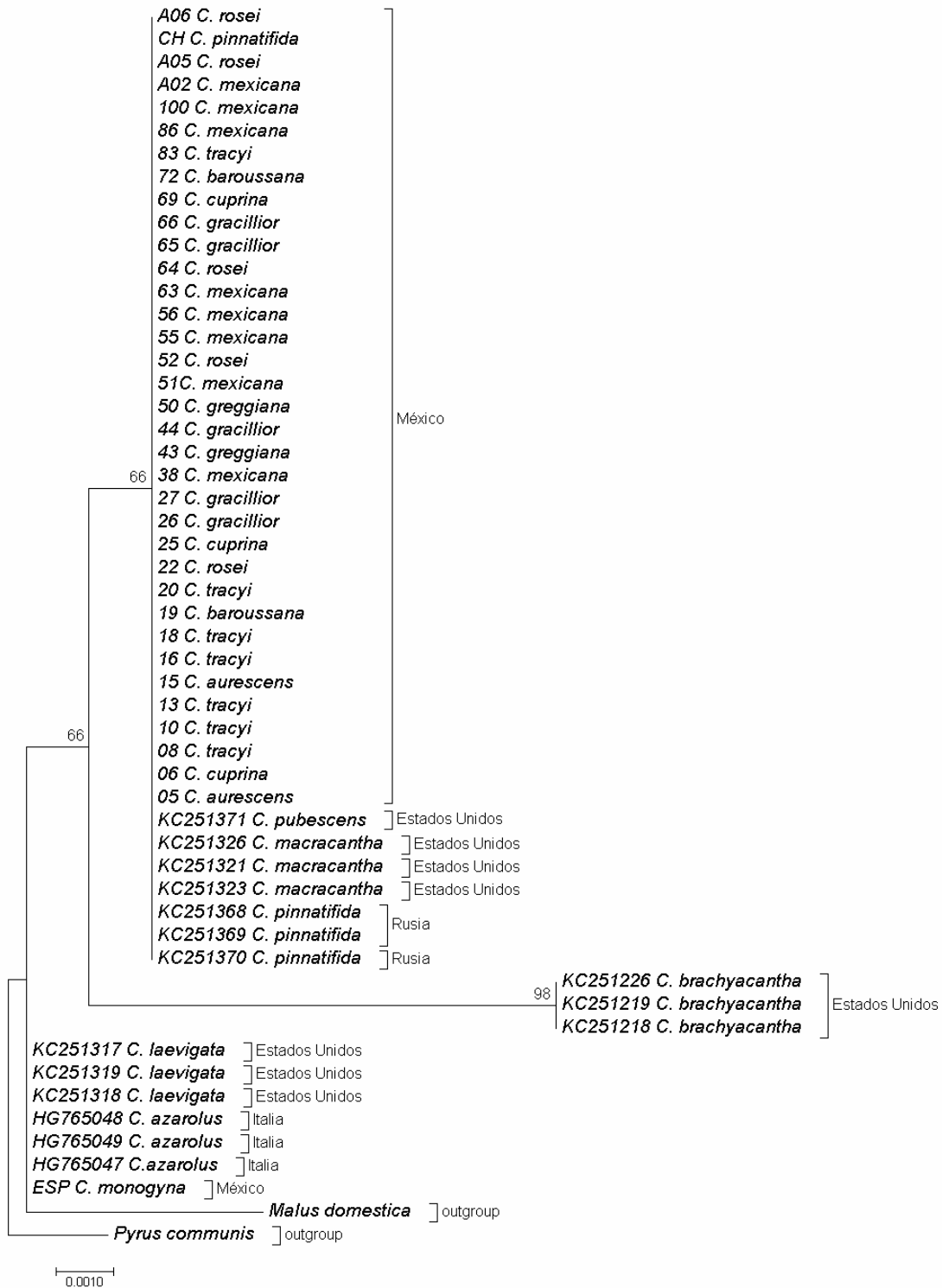


Figura 2.2. Reconstrucción filogenética para las 54 secuencias de *Crataegus* analizadas para la región *rbcL* bajo el método de Máxima Verosimilitud. Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo.

Para *C. azarolus* y *C. laevigata* una mutación en común fue una transversión del nucleótido A a C, en la posición 43, que origino el cambio de ácido glutámico a ácido aspártico. La separación de las especies *brachyacantha*, *azarolus* y *laevigata* originada por estos cambios se pueden observar en la Figura 2, en la cual también se aprecia la nula variación de las especies mexicanas y su alto parentesco con las especies *C. pubescens*, *C. macracantha* y *C. pinnatifida* agrupadas en el mismo nodo. Cabe mencionar que *C. pubescens* es de origen mexicano, propagada en el Jardín Botánico de California, Estados Unidos y de acuerdo con Núñez-Colín y Hernández-Martínez (2011), corresponde a *C. mexicana*, la cual mostró 100 % de similitud con las especies mexicanas.

La separación de las accesiones mediante el gen *rbcL* coincidió con las limitantes reportadas para éste, al cual se le ha conferido la capacidad de inferir relaciones filogenéticas a nivel de género y especies, no muy emparentados; está limitante se debe a que es un gen altamente conservado que codifica para la subunidad grande de la Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa / oxigenasa), una proteína altamente definida y de lenta evolución (Krapralov y Filatov, 2007; Kusmina *et al.* 2012).

La región intergénica *psbA-trnH* presentó mayor dificultad en la limpieza y alineamiento de las secuencias, por lo que requirió mayor ajuste manual. Las secuencias Fasta editadas y ensambladas arrojaron un fragmento de 268 pb de longitud, menor a la longitud de fragmento obtenida por Piedra Malagón *et al.* (2016) en *C. rosei* (352 pb) y por Zarrei *et al.* (2014) de 429 pb, pero similar a la reportada por Keréngi-Nagy *et al.* (2014) de 298 pb. Cabe mencionar que tiene una longitud promedio de 465 pb (Shaw *et al.*, 2005). Varios investigadores han utilizado esta región para estudiar géneros y especies estrechamente relacionados (Li *et al.*, 2015) debido a que es altamente variable y presente para todos los linajes (Ferri *et al.* 2015; Shaw *et al.*, 2005). Algunos investigadores (Albarouki y Peterson, 2007; Lo *et al.*, 2009; Kerényi-Nagy *et al.*, 2014) han reportado variabilidad en especies de *Crataegus* de Siria, Norteamérica y Hungría analizadas con esta región intergénica. En el presente estudio las especies provenientes del GeneBank como *C. azarolus*, *C. macracantha* y *C. pinnatifida* presentaron 1, 4 y 6 sitios variables (Cuadro 4), también se observó la presencia de inserciones y/o deleciones durante el alineamiento (Figura 3) en las especies *C. pinnatifida*, *C. laevigata*, *C. macracantha*, *C. monogyna* y *C. azarolus*.

Cuadro 2.5. Variación genética para la región *psbA-trnH* en diferentes especies del género *Crataegus*.

Especie	NS	LS	SC	SV	SS	T	C	A	G
<i>C. greggiana</i>	2	283	255	0	0	46.2	6.6	33.7	13.5
<i>C. mexicana</i>	8	283	264	0	0	46.3	6.4	34.0	13.3
<i>C. gracillior</i>	5	283	264	0	0	46.2	6.5	34.0	13.3
<i>C. rosei</i>	4	283	264	0	0	46.3	6.4	34.0	13.3
<i>C. baroussana</i>	2	283	263	0	0	46.3	6.5	34.0	13.3
<i>C. tracyi</i>	7	283	264	0	0	46.2	6.4	34.0	13.3
<i>C. cuprina</i>	3	283	264	0	0	46.2	6.5	34.1	13.3
<i>C. aurescens</i>	2	283	264	0	0	46.2	6.4	34.1	13.3
<i>C. azarolus</i>	3	283	264	1	1	46.7	6.4	33.4	13.5
<i>C. macracantha</i>	3	283	265	4	4	47.2	6.3	33.5	13.1
<i>C. laevigata</i>	3	283	263	0	0	46.8	6.5	33.5	13.3
<i>C. brachyacantha</i>	3	283	259	0	0	46.0	6.6	33.9	13.5
<i>C. pinnatifida</i>	3	283	259	6	6	46.5	6.3	33.8	13.3
<i>C. monogyna</i>	1	283	-	-	-	46.6	6.4	33.3	13.6
<i>C. sulfurea</i>	1	283	-	-	-	46.2	6.4	34.1	13.3
<i>C. pubescens</i>	1	283	-	-	-	46.0	6.4	34.3	13.2
Grupo externo	2	283	246	3	0	46.3	6.3	33.9	13.5
TOTAL	53	283	260	14	6	46.4	6.4	33.9	13.3

NL=número de secuencias por especie, LS= longitud de secuencia alineada en pb, SC=, número sitios constantes, SV= número de sitios variables, SS= sitios singletones.

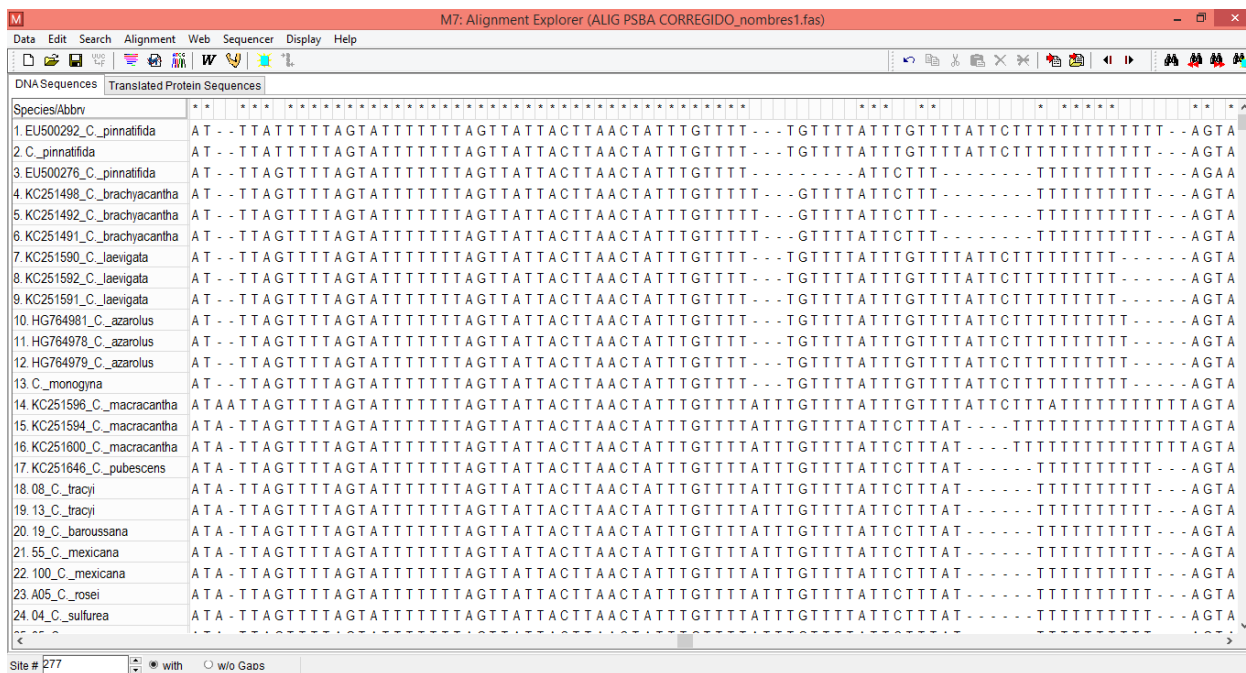


Figura 2.3. Alineamiento de la región *psbA-trnH* para las especies de *Crataegus* analizadas en el programa MEGA 7.

La reconstrucción filogenética de la Figura 4 muestra la separación de las accesiones en dos clados, el clado I se conforma por las 34 accesiones mexicanas y algunas accesiones norteamericanas, ubicadas geográficamente en el nuevo mundo; el clado II se puede decir que está conformado en su mayoría por accesiones originarias del viejo mundo (*C. laevigata*, *C. azarolus* y *C. pinnatifida*), es decir, aunque *C. laevigata* fue colectado en Estados Unidos, esta especie es altamente común en Europa (Byatt, 1975; Fineschi *et al.*, 2005).

A pesar de que la región *psbA-trnH* fue la más variable, en comparación a *matK* y *rbcl*, no se detectó variación en las especies de *Crataegus* mexicanas, las cuales se agruparon en el mismo nodo, con excepción de las accesiones A02 y 43, esto probablemente como resultado de una menor longitud de secuencia en 6 pb en relación al resto de las secuencias.

La agrupación de las accesiones obtenida con las regiones *rbcl* y *psbA-trnH* (Figura 3 y 4) coincidió con la filogenia obtenida por Lo y Donoghue, (2012) con base en la combinación de 11 regiones de ADN

de cloroplasto e ITS, donde se señala que *C. brachiacantha* se separó de las demás accesiones con una edad aproximada de 32 MA, *C. macracantha* y *C. pubescens* coinciden en un edad de 20 MA y *C. pinnatifida* con 17 MA; *C. laevigata* y *azarous* se representa como especies de menor divergencia con apenas 10 MA.

La nula variación de las accesiones de *Crataegus* mexicano se pudo constatar en la reconstrucción filogenética de la Figura 5, la cual se obtuvo en el análisis multilocus basado en la combinación de las regiones estudiadas (*matK*, *rbcL* y *psbA-trnH*) y realizado sólo para las secuencias obtenidas en el presente estudio. En la figura señalada se aprecia a todas las accesiones mexicanas agrupadas en un solo nodo con un soporte bootstrap de 85, donde las especies de comparación *C. pinnatifida* y *C. monogyna* se separaron de estas y de los genotipos utilizados como grupo externo (*Malus domestica* y *Pyrus commnunis*). Lo anterior coincide con lo encontrado con secuencias ITS de tejocote mexicano (Núñez Colín *et al.*, 2011), dando a pensar que tal vez no sea especies separadas, sino variantes de una sola especie. La baja resolución inferida en este análisis filogenético para las accesiones mexicanas puede deberse a eventos de divergencia reciente como lo señalaron Nikiforova *et al.*, (2013) en manzano; lo cual coincide con lo mencionado por Lo *et al.* (2009), quienes proponen a Europa y Este de América del Norte como una de las áreas más recientes para *Crataegus*, y aunque en su estudio no contemplan la diversidad de *Crataegus* mexicano, dada la cercanía de México con Estados Unidos puede incluirse a nuestro país en esa inferencia.

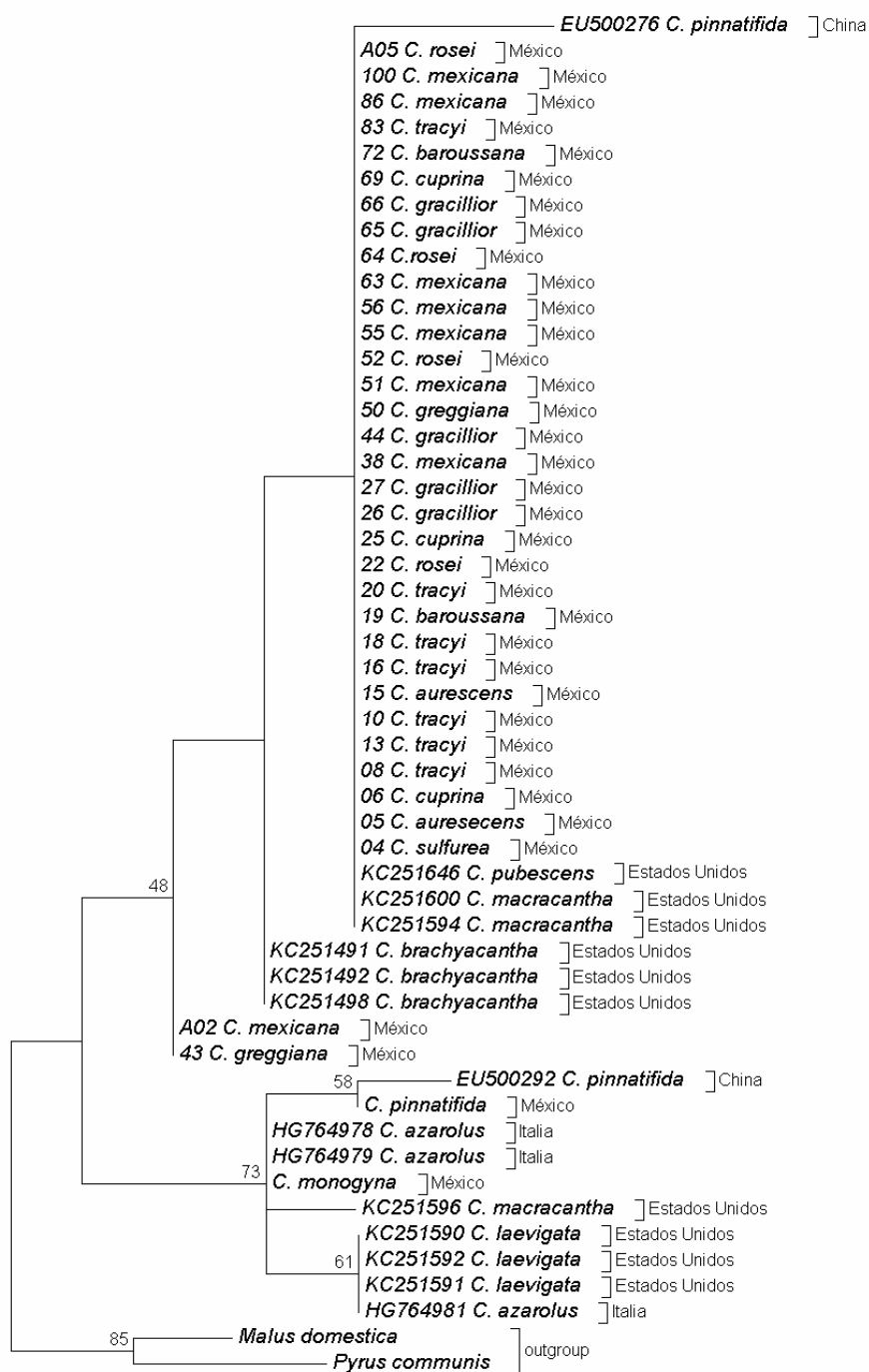


Figura 2.4. Reconstrucción filogenética de 53 secuencias de *Crataegus* con base en la región *psbA-trnH*, bajo el método de Máxima Verosimilitud. Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo. Barra en color amarillo=clado I, barra en color azul=clado II.

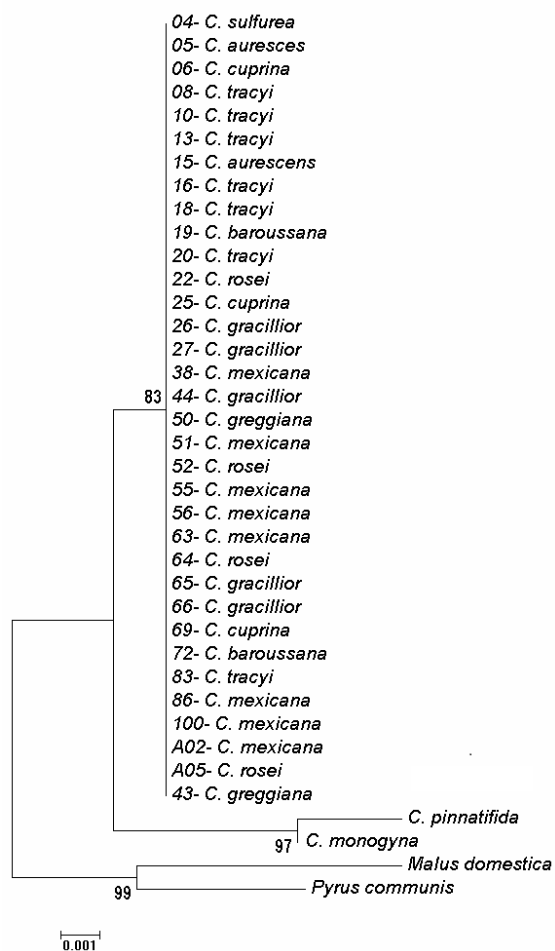


Figura 2.5. Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas con base en el análisis multilocus (*matk+rbcl+psbA-trnH*) bajo el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Tamura 3-parameter (Tamura, 1992). Los números sobre los nodos indican la proporción (%) de 1000 réplicas bootstrap soportando cada nodo.

CONCLUSIONES

Las regiones de ADN de cloroplasto analizadas arrojaron información útil en la separación de las especies de *Crataegus* mexicano de sus parientes relativos, la nula separación entre especies mexicanas pudo ser indicativo de eventos recientes de divergencia, así como hibridación o que no se tratan de especies. La región de mayor variabilidad fue *psbA-trnH* seguida de *matK*, el locus *rbcl* fue el que mostró menor evolución y por lo tanto menor divergencia.

Nuestros resultados confirmaron una vez más el problema taxonómico de género *Crataegus*, principalmente es las especies mexicanas. Este estudio también nos permitió conocer la edad aproximada de los materiales de *Crataegus* mexicano al encontrar 100% de similitud de estos con la especie reportada como *C. pubescens* en estudios previos.

BIBLIOGRAFÍA

- Albarouki E. and A. Peterson (2007)** Molecular and morphological characterization of *Crataegus* L. species (Rosaceae) in southern Syria. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 255–263. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00607.x>
- Altschul S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. Lipman (1997)** Gapped BLAST And PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:389-402.
- Betancourt-Olvera M., R. Nieto-Ángel, B. Urbano, F. González-Andrés (2017)** Analysis of the biodiversity of hawthorn (*Crataegus* spp.) from the morphological, molecular, and ethnobotanical approaches, and implications for genetic resource conservation in scenery of increasing cultivation: the case of Mexico. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 65, 897-916. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0583-4>.
- Betancourt-Olvera M., M. D. Pérez-Lainez, R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos- Priego, M. R. García-Mateos, T. Corona-Torres (2018)** Comparación de seis métodos de extracción de ADN en tejocote (*Crataegus mexicana* Moc. & Sessé). *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(1):75-79. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-1/9a.pdf>
- Byatt J. I. (1975)** Hybridization between *Crataegus monogyna* Jacq. and *C. laevigata* (Poiret) DC. in south-eastern England. *Watsonia* 10:253-264.
- CBOL Plant Working Group (2009)** A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106(31):12794–12797. doi: 10.1073/pnas.0905845106
- Christensen K. I. (1992)** Revisión of *Crataegus* section *Crataegus* and Nothosect. *Crataeguineae* (Rosaceae-Maloideae) in the Old World. *Syst. Bot. Mono.* 35:1-199.

- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990)** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Eggleston W. W. (1909)** The Crataegi of Mexico and Central America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 36(9):501-514.
- Ferri G., B. Corradini, F. Ferrari, A. L. Santunione, F. Palazzoli, M. Alú (2015)** Forensic botany II, DNA barcode for land plants: Which markers after the international agreement?. *Forensic Science International: Genetics* 15:131-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.005>
- Fineschi S., D. Salvini, D. Turchini, R. Pastorelli and G. G. Vendramin (2005)** *Crataegus monogyna* Jacq. and *C. laevigata* (Poir.) DC. (Rosaceae, Maloideae) display low level of genetic diversity assessed by chloroplast markers. *Plant Systematic and Evolution* 250:187-196. DOI 10.1007/s00606-004-0228-x
- García E. (1988)** Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Edit. UNAM. D. F., México. 246 p.
- Hildebrandt T. M., A. Nunes N., W. L. Araújo, H. P. Braun (2015)** Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* 8(11): P1563-1579. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Joshi V., J. G. , Joung, Z. Fei, G. Jander (2010)** Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids* 39: 933-947. DOI 10.1007/s00726-010-0505-7
- Jukes T. H. and C. R. Cantor (1969)** Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.
- Kérenyi-Nagy V., T. Deák, G. Kósa, D. Bartha (2014)** Genetic Studies of Selected “Black-Fruit” Hawthorns: *Crataegus nigra* waldst. et kit., *C. pentagyna* waldst. et kit. and *C. chlorosarca* maxim. *Acta Silvatica Lignaria Hungarica* 10:23-30. doi: 10.2478/aslh-2014-0002
- Krapalov M. V. and D. A. Filatov (2007)** Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. *BMC Evolutionary Biology* 7: 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-73>
- Kress W.J. , D. L. Erickson, F. A. Jones, N. G. Swenson, R. Perez (2009)** Plant barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106:18627-18632. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909820106>

- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura (2016)** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kuzmina M. L., K. L. Johnson, H. R. Barron, P. D. N. Hebert (2012)** Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library. *BMC Ecology*. 12:25. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-12-25>
- Li X., Y. Yang, R. J. Henry, M. Rossetto, Y. Wang and S. Chen (2015)** Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews* 90: 157-166. <https://doi.org/10.1111/brv.12104>
- Lo E. Y.Y., M. J. Donoghue (2012)** Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:230-243. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.10.005>
- Lo E. Y.Y., S. Stefanovic, T. A. Dickinson (2007)** Molecular reappraisal of relationships between *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Pyreae) – Two genera or one? *Systematic Botany* 32(3): 596-616.
- Lo E. Y.Y., S. Stefanovic, K. I. Christensen, T. A. Dickinson (2009)** Evidence for genetic association between East Asian and western North American *Crataegus* L. (Rosaceae) and rapid divergence of the eastern North American lineages based on multiple DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.01.018>
- López-Santiago J., R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, E. Rodríguez-Pérez, M. T. Colinas-León, M. W. Borys, F. González-Andrés (2008)** Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(2): 97-111.
- McVaugh R. (2000)** Botanical results of the Sessé & Mociño expedition (1787-1803). VII. A guide to relevant scientific names of plants. Hunt Institute for Botanical Documentation and Carnegie Mellon University. Pittsburgh. 626 p.
- Nieto A. R. (2007)** Tejocote: *In*: Frutales Nativos, Un Recurso Fitogénético de México R. Nieto A. (Ed.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.pp: 25-118.
- Nieto Á. R.,**
- M. W. Borys (1993)** El tejocote (*Crataegus* spp.); un potencial frutícola de zonas templadas. *Revista Fruticultura Profesional*. 54:63-71.

- Nikiforova S. V., D. Cavalieri, R. Velasco, V. Goremykin (2013)** Phylogenetic analysis of 47 chloroplast genomes clarifies the contribution of wild species to the domesticated apple maternal line. *Molecular Biology and Evolution* 30:1751–1760. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst092>
- Núñez-Colín C. A., M. A. Hernández-Martínez (2011)** La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp.) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(1):141-153.
- Núñez-Colín, C. A., E. Valadez-Moctezuma, A. F. Barrientos-Priego, F. González-Andrés, R. Nieto-Ángel (2011)** Variación de la región ribosómica nuclear en *Crataegus* L. del Centro y Sur de México. *Agronomía Mesoamericana* 22(1): 1-10.
- Núñez-Colín C. A., R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego, J. Sahagún-Castellanos, S. Segura and F. González-Andrés (2008)** Variability of three regional sources of germplasm of tejocote (*Crataegus* spp.) from central and southern Mexico. *Genet. Res. Crop Evol.* 55:1159-1165.
- Núñez-Colín C. A., J. Sahagún-Castellanos, F. González-Andrés, A. F. Barrientos-Priego, S. Segura and R. Nieto-Ángel (2009)** Identification of morphometrics traits for screening of tejocote (*Crataegus* spp.) germplasm for better yield potential. *Fruits.* 64:35-44.
- Paz A., M. González, A. J. Crawford (2011)** Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta biológica Colombiana* 16(3): 161 - 176.
- Pérez-Ortega S. A., C. A. Núñez-Colín, R. Nieto-Ángel, A. F. Barrientos-Priego y S. Segura (2004)** Los recursos genéticos de tejocote (*Crataegus* spp.) en México. *Variación eco-climática. Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 48:149-151.
- Phipps J. B. (1997)** Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae, Subfam. Maloideae). *SIDA Botanical Miscellany.* 15:1-94.
- Phipps J. B., R. J. O’Kennon and R. W. Lance (2003)** Hawthorns and medlars. Timber Press, Portland, USA. 139 p.
- Phipps J. B., J. R. Robertson, P. G. Smith, J. R. Rohrer (1990)** A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany* 68:2209–2269. <https://doi.org/10.1139/b90-288>
- Piedra-Malagón E. M., A. L. Albarrán-Lara, J. Rull J, D. Piñero, V. Sosa (2016)** Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): the case of the *Crataegus rosei*. *Systematics and Biodiversity.* <https://doi.org/10.1080/14772000.2015.1117027>

- Raspé O. (2001)** Inheritance of the chloroplast genome in *Sorbus aucuparia* L. (Rosaceae). *Journal of Heredity* 92: 507–509.
- Sang T., D. Crawford, T. Stuessy (1997)** Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84:1120-1136. <https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2307/2446155>
- Segura S., J. Fresnedo, C. Mathuriau, J. López, J. Andrés, A. Muratalla (2018)** The edible fruit species in México. *Genetic Resources and Crop Evolution* 65(2):1767–1793. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0652-3>
- Shaw J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K.C. Sipun, C. T. Winder, E. S. Shilling and R. L. Small (2005)** The tortoise and the hare ii: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142–166.
- Talent N. and T. A. Dickinson (2005)** Polyploidy in *Crataegus* and *Mespilus* (Rosaceae, Maloideae): evolutionary inference from flow cytometry of nuclear DNA amounts. *Can. J. Bot.* 83:1268-1304. <https://doi.org/10.1139/b05-088>
- Talent N., E. Lo and T. A. Dickinson (2007)** Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant Systematics and Evolution* 266: 59–78. <https://dx.doi.org/10.1007/s00606-007-0541>
- Tamura K. (1992)** Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.
- Tate J. A., B. B. Simpson (2003)** Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28:723–737. doi:10.1043/02-64.1.short
- Zarrei M., N. Talent, M. Kuzmina, J. Lee, J. Lund P. R. Shipley, S. Stefanovic S, T. A. Dickinson (2015)** DNA barcodes from four loci provide poor resolution of taxonomic groups in the genus *Crataegus*. *AoB plants* 7: plv045. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv045>
- Zarrei M., S. Stefanovic, T. A. Dickinson (2014)** Reticulate evolution in North American black-fruited hawthorns (*Crataegus* section *Douglasia*; Rosaceae): evidence from nuclear ITS2 and plastid sequences. *Annals of Botany* 114:253 –269. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu116>

**CAPÍTULO 3 . ESTUDIO METABOLOMICO DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES EN EL FRUTO
PIGMENTADO DE DIVERSOS GENOTIPOS DEL GENERO *Crataegus* DE MEXICO**

**METABOLOMIC STUDY OF VOLATILE COMPOUNDS IN THE PIGMENTED FRUIT FROM MEXICO
Crataegus GENOTYPES**

Publicado en Journal of Applied Botany and Food Quality (2019)

Vol. 92: 15 – 23.

SUMMARY

Crataegus is distributed worldwide and presents a phenotypic diversity in size, shape, color and aroma of the fruit. The objective of this study was to identify genotypes of *Crataegus* with a similar profile of volatile compounds by means of a metabolomic study. In addition, the content of pigment was evaluated to contribute to the agronomic, medicinal and chemotaxonomic value. Color determination, total carotenoids (TC) and total anthocyanins (TA) were determined in the exocarp and mesocarp of fresh fruits by means of spectrophotometry. The volatile compounds were determined by Low Temperature Plasma coupled to Mass Spectrometry (LTP-MS). A total of 75 volatile compounds were detected, according to abundance and mass-to-charge ratio, which by means of Principal Component Analysis (PCA) and selection of variables; genotypes were grouped according to size and origin. The pigment content was related to the physical color of the fruit. The highest concentration of carotenoids was $42.35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW. in the genotype PO5, and $992.34 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW for anthocyanins in the genotype CH18, concentrations of both compounds found in the exocarp of the fruit.

Keywords. Aroma, anthocyanins, carotenoids, *Crataegus* sp.

INTRODUCTION

The genus *Crataegus* (Family Rosaceae) displays wide phenotypic and genetic diversity grouping approximately 150 species; of which 55 are located in the Euro-Asian continent (Europe, the Middle East, East Asia), and 95 in the American continent (PHIPPS, 1997, PHIPPS et al., 2003). In Mexico there are 15 species reported (NÚÑEZ-COLÍN et al., 2011, EGGLESTON, 1909, PHIPPS, 1997), which are called "tejocote" (Mexican hawthorn), a word that derives from Nahuatl "te-xocotl" in reference to the hardness and acidity of the fruit (Cabrera, 1992). The phenotypic diversity of this genus is appreciated in the different organs of the tree, among them the fruit, which vary in shape, size and color of the exocarp (skin) (yellow, orange, red and black), with different tonality and intensity. The mesocarp (pulp) goes from yellow, orange, greenish white, reddish white to non-homogeneous diffuse red (NIETO-ANGEL and BORYS, 1992, PHIPPS et al., 2003). The fruit is also characterized by its flavor (flavor and taste) particular property of this species; in China, it has an intense and unique aroma that influences the

acceptability and taste of food products, such as juices and jams due to the presence of some volatile compounds (ZHAO et al., 2015).

Attributes such as color, aroma, taste, texture, appearance, food safety and the nutritional value of fresh fruit are factors critical to consumer (BARRET et al., 2010). In tejocote, specifically the color and aroma influence the quality of the fruit and importance of its agro-industrial use (preparation of beverages with and without liquor, fruit paste and syrups); as well as, its consumption as fresh fruit. In Mexico, since prehispanic times, different parts of the Mexican hawthorn tree have been used in traditional medicine (EDWARDS et al., 2012), currently, this fruit is used preferably in traditional offerings, religious ceremonies and Christmas (BORYS and LESZCZYŃSKA-BORYS, 1994). Morphological and molecular studies (NIETO, 2007; BETANCOURT-OLVERA et al., 2017) of some genotypes and species of the genus *Crataegus* have contributed to the taxonomic characterization and conservation of this under-utilized resource.

Many studies of some species located in China, Turkey, Europe and the United States report the presence of bioactive compounds (simple phenols, polyphenols, carotenoids, anthocyanins and flavonoids, among others) (CALISKAN et al., 2012; KOSTIĆ et al., 2012 ; LIU et al., 2016; VEBERIC et al., 2015); which justify its medicinal properties (hypertension, angina pectoris, atherosclerosis, indigestion and abdominal distension) (CHANG et al., 2002) and pharmacological properties of the cardiovascular system, as well as its antioxidant activity (CUI et al., 2006).

Despite the great genetic and phenotypic diversity, few metabolites are identified in Mexican species (BANDERAS-TARABAY et al., 2015, GARCÍA et al., 2012). The variation of volatile compounds and pigment content (anthocyanins and carotenoids) among these species is hitherto unknown; the profile of these elements could be considered the chemical fingerprint of each species, keys for the understanding of their genetic variation. On the other hand, metabolomic studies of bioactive compounds have been used to describe the phenotypic variation of a wide range of phytochemicals or changes in plant chemical composition. Therefore, the objective of this study was to identify genotypes of *Crataegus* that presented a similar profile of volatile compounds by means of a metabolomic study, and to evaluate the pigment content to contribute to the agronomic, medicinal and mainly chemotaxonomic value.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Hawthorn fruit was randomly collected at a commercial maturity stage in September-October 2016 and 2017 from the *ex situ* germplasm bank at the University of Chapingo (UACH), Estado de Mexico, Mexico; located at 19° 29'N and 98° 53' W, at 2249 m height. The climate is classified as C (Wo) (w)b (i') g, corresponds to temperate sub-humid, with a mean annual precipitation of 645 mm and an average annual temperature of 15 ± 2 °C (GARCÍA, 1988).

The material was placed in paper bags previously labeled, in a cooler at 4 °C. The samples harvested in 2016 were stored at -4°C until analysis. The material harvested in 2017 was stored at -20 ± 2 °C until study. Table 1 shows the site of origin of the genotypes studied, identified and grouped according to their morphological characteristics (NIETO, 2007, BETANCOURT-OLVERA et al., 2017). Before the analysis of metabolites, the equatorial diameter of 10 fruits was measured using a vernier, an interval was obtained from the measurements; based on that fruits were grouped by size as follows: small (12.60-18.40 mm), medium (18.50- 28.00 mm) and large (29.00-34.00 mm). Figure 1 shows the size and color of each of the genotypes studied.

Preparation of the sample

Three fruits fruit of each genotype were analyzed separately, without pre-treatment, each fruit was cut longitudinally, immediately the surface of the cut was exposed directly to the mass spectrometry team for analysis.

For this study we used the methodology proposed by MARTÍNEZ-JARQUÍN and WINKLER (2013), with a Low-Temperature Plasma ionization source coupled to Mass Spectrometer (LTP-MS) LCQ Fleet (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The advantage of this technique allows to analyze the volatile compounds of a sample without the previous extraction of the essential oil, avoiding low yields and losses of some compounds during the extraction, as well as the detection of compounds present in low concentrations (MARTÍNEZ-JARQUÍN and WINKLER, 2017). Recently, the method has been applied for

the analysis of volatile compounds in coffee, tequila and mezcal (GAMBOA-BECERRA et al., 2017; MARTÍNEZ-JARQUÍN et al., 2017).

Table 3.1. Geographical characteristics of 24 genotypes of the Mexican hawthorn (*Crataegus* sp.).

Genotype	Species*	State ^a	Origin ^b	Lat	Long	H (m)	MD ^c
CH04	<i>sulfurea</i>	Chiapas	S C de las Casas	16.75	92.67	2300	Oct-Dic
CH08	<i>tracyi</i>	Chiapas	S C de las Casas	16.75	92.67	2300	Oct-Nov
CH10	<i>tracyi</i>	Chiapas	S C de las Casas	16.75	92.67	2300	Sept-Nov
CH13	<i>tracyi</i>	Chiapas	Rancho Nuevo	16.67	92.57	2400	Dic-Ene
CH15	<i>aurescens</i>	Chiapas	Mitzitan	16.65	92.55	2380	Ene-Feb
CH16	<i>tracyi</i>	Chiapas	Mitzitan	16.65	92.55	2380	Nov-Ene
CH18	<i>tracyi</i>	Chiapas	Rancho Robelo	16.67	92.45	2250	Nov-Feb
CH19	<i>baroussana</i>	Chiapas	Mitzitan	16.65	92.55	2380	Dic-Ene
CH22	<i>rosei</i>	Chiapas	Mitzitan	16.65	92.55	2380	Oct-Nov
CH27	<i>gracillior</i>	Chiapas	Rancho Robelo	16.67	92.45	2250	Jan-Feb
CH43	<i>greggiana</i>	Chiapas	Rancho Robelo	16.67	92.45	2250	Jan-Feb
CH44	<i>gracillior</i>	Chiapas	Mitzitan	16.65	92.55	2380	Oct-Nov
CH51	<i>mexicana</i>	Chiapas	Mitzitan	16.65	92.55	2380	Nov-Feb
CH69	<i>cuprina</i>	Chiapas	Candelaria	16.70	92.53	2320	Oct-Nov
CH72	<i>baroussana</i>	Chiapas	S J Yashitinin	16.65	92.45	2350	Nov-Dec
CH83	<i>tracyi</i>	Chiapas	S C de las Casas	16.75	92.67	2300	Sept-Nov
P02	<i>tracyi</i>	Puebla	Rancho Nuevo	19.14	98.57	2620	Sept-Oct
P05	<i>aurescens</i>	Puebla	Mitzitan	19.14	98.50	2628	Sept-Oct
P06	<i>tracyi</i>	Puebla	Mitzitan	19.14	98.50	2625	Sept-Oct
P25	<i>cuprina</i>	Puebla	Origen	19.10	98.47	2420	Dec-Feb
P55	<i>sulfurea</i>	Puebla	S C de las Casas	19.17	98.40	2280	Dec-Feb
P86	<i>mexicana</i>	Puebla	Huejotzingo	19.17	98.40	2280	Nov-Dec
P100	<i>mexicana</i>	Puebla	Huejotzingo	19.17	98.40	2280	Oct-Dec
EM66	<i>tracyi</i>	Edo. Mex.	S C de las Casas	19.48	98.77	2700	Sept-Oct

^a S C de las Casas=San Cristóbal de las Casas; S J Yashitinin=San José Yashitinin; S C del Monte=Santa Catarina del Monte. ^b Edo. Mex. = Estado de México. ^c MD=Commercial maturity date (NIETO, 2007).

Detection of volatile compounds

The fresh fruit cut was exposed directly to the plasma beam coupled to the mass spectrometer until obtaining 20 mass spectra in a range of 50 to 500 m/z per cut in a fruit. Three fruits were analyzed separately, finally 60 spectra were obtained by genotype. Helium was used as discharge gas, the capillary temperature was 80 ± 2 °C, voltage of 10 Kv and a frequency of 10 Khz. The equipment's previous calibration was previously performed as reported by MARTÍNEZ-JARQUÍN and WINKLER, 2013.

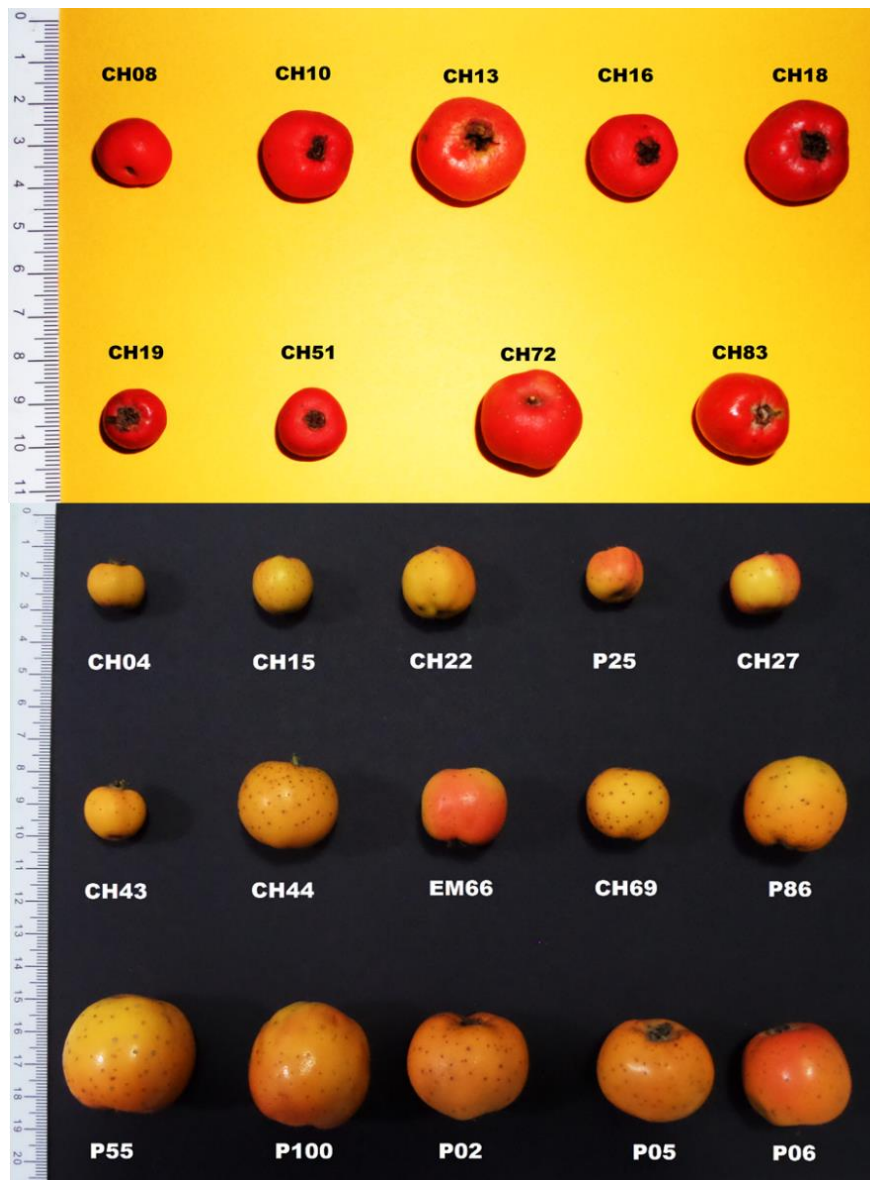


Figure 3.1. Fruit image of 24 hawthorn (*Crataegus* sp.) genotypes.

Measurement of color parameters

For the color analysis (physical color measurement), 23 genotypes were used because the genotype CH69 was not fruitful in the year of collection (2017). The color of the exocarp and mesocarp of fresh fruit was determined by means of the evaluation of L^* (luminosity), *Hue angle (Hue)* and color purity or chromaticity index (*Chroma*) with a Miniscan® EZ 4500L spectrophotometer (Hunterlab, Virginia, USA). The readings of a^* and b^* were obtained to identify the color differences between tissue and genotypes in numerical form. Variables were estimated with the following equations: $Hue = \tan^{-1}(a/b)$; $Chroma = (a^2 + b^2)^{1/2}$ (MC. GUIRE, 1992).

Three fruits of each genotype with similar commercial maturity stage were selected; for each fruit three different points of the exocarp were studied. Subsequently, for the measurement of pulp color, the fruit was cut into three portions longitudinally, each measurement was made in triplicate.

Measurement of total carotenoids

The total quantification of carotenoids (TC) was carried out separately in the exocarp and mesocarp of the fresh fruit as indicated by MÉNDEZ-ITURBIDE *et al.* (2013) with minor modifications. To obtain the sample, between three and twenty fruits were used per genotype, depending on the size of the fruit. The tissue (2 g) was ground in a mortar with 20 mL of hexane, acetone and ethanol (50:25:25 v/v), the solution was kept at 4 °C in the dark for 30 min, then it was filtered. Each extraction was made in triplicate. The absorbance of the organic phase was measured at 450 nm in a Multiscan® GO spectrophotometer. La referencia es MÉNDEZ-ITURBIDE *et al.*, 2013. (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Hexane was used as a blank solution. To calculate the concentration (μg) of total carotenoids the following equation was used: $\mu\text{g} = A \times V \text{ (mL)} \times 10^6 / \epsilon \times 100$; where ϵ = extinction coefficient of β -carotenoid (2505); V = volume of sample; A = Absorbance obtained. Results are expressed in $\mu\text{g/g}$ of fresh weight (FW): $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} = \mu\text{g} / \text{weight of sample (g)}$.

Measurement of total anthocyanins

The concentration of total anthocyanins (TA) was determined by the differential pH method (GIUSTI and WROLSTAD, 2001). The extraction of anthocyanins was carried out in the exocarp and mesocarp of the fresh fruit, in triplicate. For each replication, 2.0 g of fresh tissue was ground in a mortar with 20 mL of

methanol acidified with HCL at 0.01 (v/v %) in a 10: 1 ratio. Then the extract was allowed to rest for 24 h in the dark at 4 °C. Two test tubes were prepared with 0.5 mL of the extract, for each sample; then 25 mL of KCL and 25 mL of CH₃COONa·3H₂O solution were added to one tube. The tubes were allowed to rest for 15 min in the dark to stabilize the reactions.

The absorbance of each sample was measured at 520 and 700 nm in a Multiscan® GO spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The blank solution used was acidified methanol. The concentration of anthocyanins was expressed as cyanidin-3-glucoside with the equation: TA (mg·L⁻¹) = A x MW x DF x 1000 ε⁻¹; where, TA (mg·L⁻¹) is the concentration of total anthocyanins, MW= molecular weight of cyanidin-3-glucoside (445.2), DF = dilution factor, ε = extinction coefficient (26 900) and A = absorbance obtained with the following equation: Abs = (A₅₂₀-A₇₀₀)_{pH1}-(A₅₂₀-A₇₀₀)_{pH4.5} (WROLSTAD et al., 2005)

Statistic analysis

The R Program Version 3.4.3 (<http://www.rproject.org>) with the Rstudio interface (<http://www.rstudio.com>) was used for the data analysis (volatile compounds and physical-chemical color variables). The mass spectra obtained in the analysis of volatile compounds in a range of 50 to 500 *m/z* in format .raw were changed to the numerical format .mzML using the Program MSConver. The package *MALDIquant* was used to process the mass data of the 60 spectra obtained by genotype, to obtain the final mass spectrum. Subsequently, the package *phatmap* generated the heat map with the abundance of the volatile compounds and the principal components analysis (PCA) was obtained by means of the *prcomp*, to integrate the metabolomic analysis (GRACE and HUDSON, 2016).

The color variables (*L*, *hue*, *chroma*, TA and TC) studied in the exocarp and mesocarp of the fruit were subjected to a one-way ANOVA and to the analysis of the ANOVA assumptions and a comparison of means. Due to the fact that not all the variables fulfilled the data normality test, for the variable *hue* in the exocarp, and TA and TC in the mesocarp, a data transformation was carried out using the logarithm method. The TC variables in the exocarp and *hue* in the mesocarp were analyzed by means of the Kruskal-Wallis test. The packages used in this study were: *agricolae*, to obtain Tukey's mean

comparison; *car*, to perform the Levene test in the analysis of assumptions and *pgirmes* to carry out the Kruskal-Wallis test.

RESULTS AND DISCUSSION

Volatile compounds

The analysis of volatile compounds by Ionization with Low-Temperature Plasma coupled to Mass Spectrometry (LTP-MS) allowed to detect 75 compounds with increased relative intensity (%). Their low molecular weight, 50 to 500 *m/z*, suggests that those volatile compounds are associated with the aroma of the fruit. Figure 2 shows only the mass spectra of two genotypes (P86, spectrum **A** and CH44, spectrum **B**) due to reasons of space.

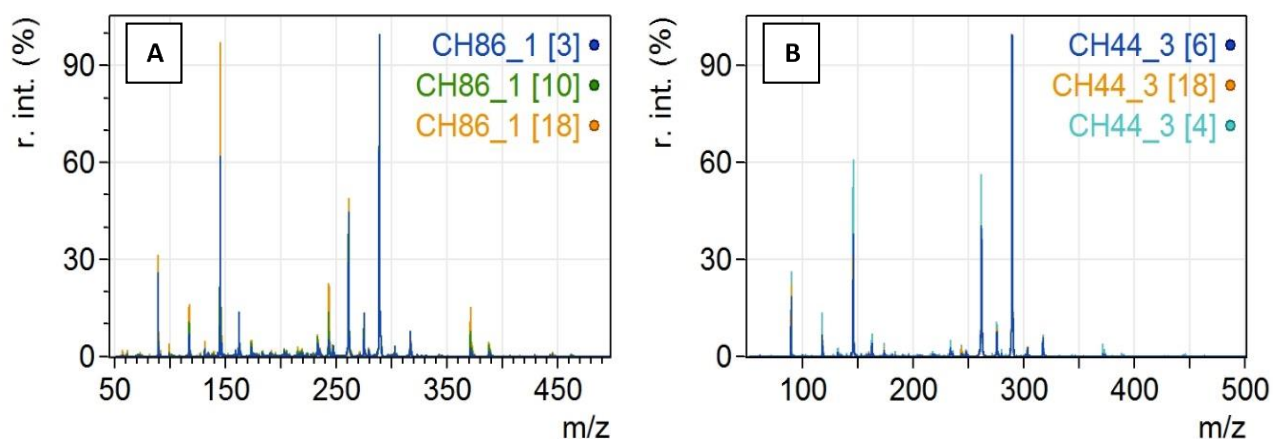


Figure 3.2. Metabolomic profile of the volatile compounds obtained by LTP-MS. **A**) Genotype P86 (*C. mexicana*); **B**) genotype CH44 (*C. gracillior*).

A Principal Components Analysis (PCA) was carried out with the 75 metabolites detected (compounds of the fruit aroma). The results were interpreted based on their eigenvalues and eigenvectors. The eigenvalues and the variance explained for each of the compounds are shown in Table 2, where it is observed that five compounds justify 81.96% of the total variance. It was also found that the volatile compounds that provided 34.89% of the total variance in the first component (PC1) were those with *m/z* ratio: 144.98, 173.01, 270.8, 344.74, 117.03, 187.01, 200.99, 284.8, 159.0, 298.77, 256.79, 278.97, 358.74, 330.73, 235.1, 218.48, 103.06, 345.67, 204.12, 223.04 and 400.76. The volatile compounds of

m/z: 288.74, 260.78, 98.99, 274.77, 117.03, 232.86, 302.68, 56.95, 81.01, 246.76, 153.12, 92.92, 127.06 and 250.91 provided 23.61% of the total variance of the second component (PC2). In the third component (PC3) the volatile compounds 228.87, 214.90, 219.0, 262.87, 258.86 and 230.79 provided 22.18 % of the total variance.

Table 3.2. Eigenvalues and variance proportion explained by the principal component analysis of volatile compounds from the genotypes of *Crataegus*.

Compound	Eigenvalues	VPC (%)	CV (%)
1	26.170	34.89	34.89
2	17.707	23.61	58.50
3	8.385	22.18	69.68
4	5.930	7.91	77.59
5	3.279	4.37	81.96

VPC: Variance per compound. CV: Cumulative variance.

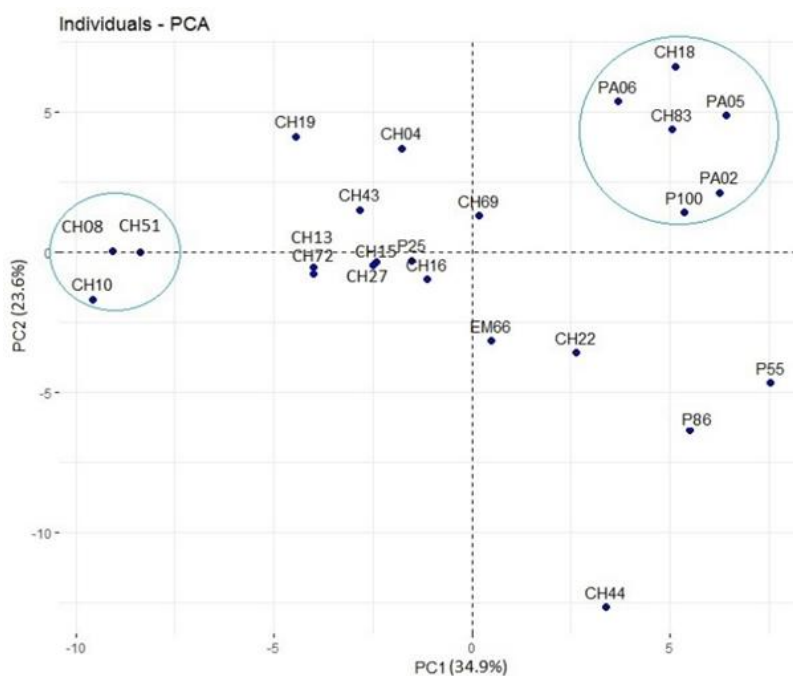


Figure 3.3. Principal components of *Crataegus* sp. genotypes by volatile compounds.

From the PCA, the dispersion of the study genotypes in the first two principal components was obtained graphically (Figure 3), where a cluster was observed with the genotypes CH08, CH10 and CH51, from the state of Chiapas. The second group corresponded to the genotypes PA06, PA05, PA02 and P100 from Atexcac and Huejotzingo, Puebla. In this same group, we found the genotypes CH83 and CH18 from two different regions of the state of Chiapas (Figure 3).

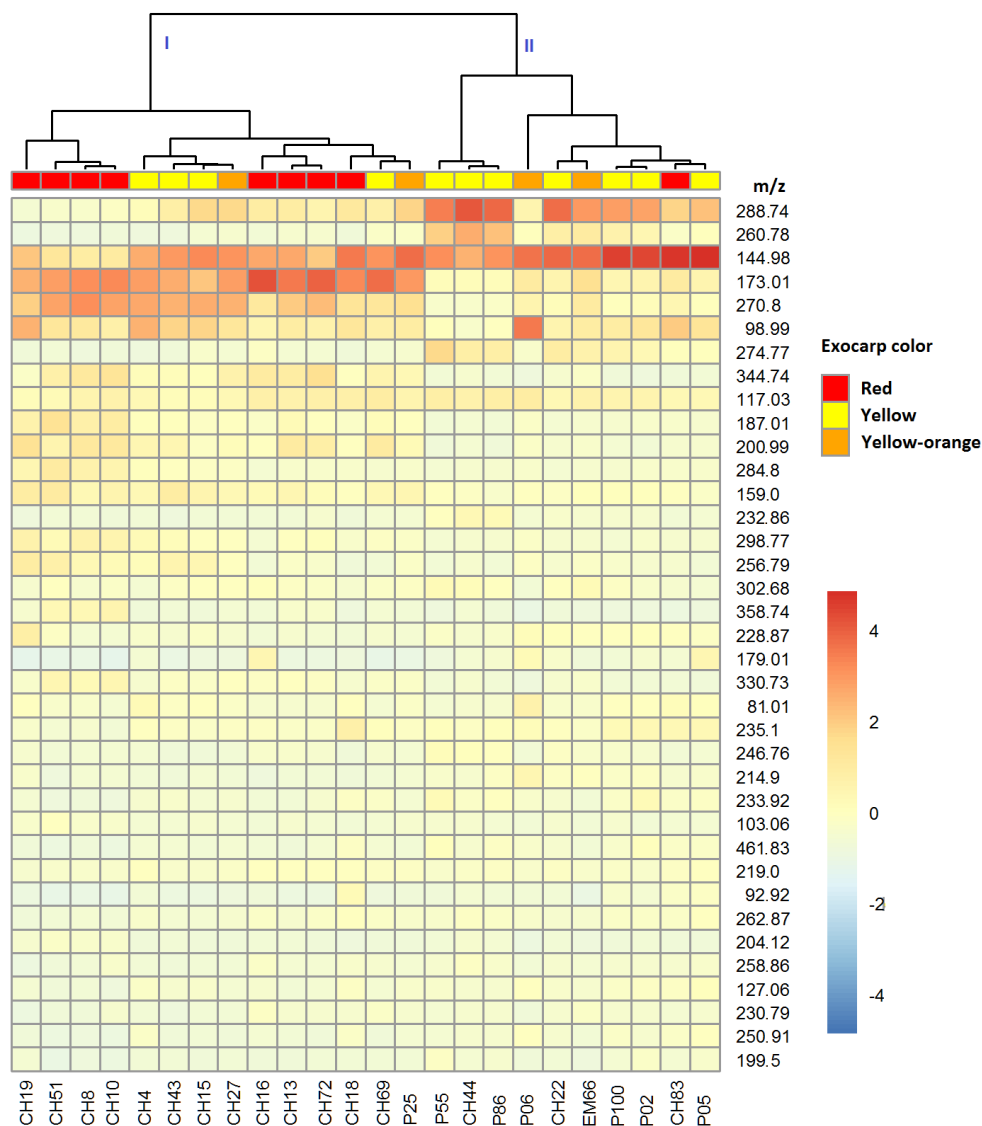


Figure 3.4. The heat map shows the abundance (color intensity) of each of the volatile compounds listed in the right column (m/z ratio). The dendrogram (upper part) shows the clusters of the genotypes by coloration of the hawthorn (*Crataegus* sp.) fruit.

In the dendrogram located in the upper part of Figure 4 there are two groups (I and II) with the 24 genotypes evaluated; in the lower part, the heat map is shown containing the abundance (relative intensity %) and the presence of the 37 volatile compounds (m/z ratio) selected by the principal component analysis.

The color row of the dendrogram represents the color of each genotype, e.g. the red boxes are associated with the red coloration of the exocarp of some genotypes. Group I grouped the genotypes of small size (12.60-18.40 mm), more than 50% with red exocarp and 92% are from Chiapas, with the exception of the genotype P25 (yellow exocarp from Puebla). Group II has genotypes from three states (Chiapas, Puebla and Estado de Mexico) that were characterized by medium to large fruits (18.50-34.00 mm), with yellow, yellow-orange and red exocarp. The variation in the size and in some cases the origin explain the differences between groups, the coloration of the exocarp of the fruit, as the species were not determining factors. The clusters showing high similarity (P100-P02, CH08-CH10, CH44-P86, CH13-CH72, CH15-CH27) in their volatile profile had in common the origin, species and/or color of the fruit, the exception was the cluster with the genotypes CH83 and P05.

On the other hand, the volatile compounds of greater abundance are shown on the heat map (Fig. 4), this is represented by the color scale where yellow corresponds to the lowest abundance up to red which corresponds to greater abundance. The five most abundant volatiles were only present in some genotypes (Tab. 3) of the two groups of the dendrogram, e. g. the compound 260.78 m/z was found only in the genotypes of Group II, with different abundance. In contrast, the compound 144.98 m/z with different abundance was identified in all genotypes of Groups I and II. In this regard, two structural metabolites (hexyl acetate and butyl butanoate) with the same m/z (144,21) have been reported in different species (*C. aestivalis*, *C. opaca* and *C. rufula*) of *Crataegus* from the United States by HORVAT and CHAPMAN (1991) and CHA et al. (2011), however the last metabolite was found in the aroma of a different species (*C. pinnatifida*) cultivated in China (LINGYUN and BIJUN, 1997). Both compounds have also been identified in the aroma of apple (ESPINO-DÍAZ et al., 2016).

Table 3.3. The five volatile compounds with increased relative intensity (%) by genotype.

Genotype	M/Z (abundance)				
CH4	173.01 (4.31)	270.8 (4.11)	144.98 (4.01)	242.81 (3.99)	98.99 (3.94)
CH8	270.8 (5.18)	173.01 (5.12)	344.74 (2.74)	98.99 (2.87)	144.98 (2.47)
CH10	173.01 (5.02)	270.8 (4.39)	344.74 (2.87)	144.98 (2.57)	187.01(2.51)
CH13	173.01 (5.03)	144.98 (4.14)	270.8 (3.44)	200.99 (2.37)	288.74 (2.34)
CH15	144.98 (4.95)	270.8 (4.22)	173.01 (3.70)	98.99 (3.34)	288.74 (3.21)
CH16	173.01 (6.53)	144.98 (4.53)	270.8 (2.73)	344.74 (2.63)	288.74 (2.36)
CH18	144.98 (4.11)	173.01 (3.79)	270.8 (2.16)	98.99 (2.11)	288.74 (2.02)
CH19	98.99 (3.19)	173.01 (3.15)	144.98 (2.87)	270.8 (2.83)	200.99 (2.44)
CH22	144.98 (6.91)	288.74 (6.82)	274.77 (2.68)	260.78 (2.54)	173.01 (2.13)
P25	144.98 (5.45)	173.01 (4.62)	288.74 (3.32)	270.8 (2.99)	98.99(2.44)
CH27	144.98 (4.62)	173.01 (4.35)	270.8 (4.01)	288.74 (3.08)	98.99 (2.56)
CH43	144.98 (4.28)	173.01 (3.87)	270.8 (3.75)	98.99 (3.14)	288.74 (2.11)
CH44	288.74(12.25)	260.78(8.12)	144.98(7.85)	274.77 (3.72)	117.03 (3.10)
CH51	173.01 (4.46)	270.8 (4.42)	187.01 (2.97)	98.99 (2.81)	144.98 (2.75)
P55	288.74 (6.45)	144.98 (6.07)	260.78 (4.11)	274.77 (3.82)	117.03 (2.46)
EM66	144.98 (5.62)	288.74 (4.70)	173.01(2.99)	270.8 (2.52)	260.78 (2.46)
CH69	173.01 (4.56)	144.98 (4.02)	270.8 (2.29)	200.99 (2.24)	117.03 (2.07)
CH72	173.01 (5.95)	270.8 (3.98)	144.98 (3.72)	344.74 (3.11)	200.99 (2.30)
CH83	144.98 (5.95)	98.99 (3.19)	28.84 (3.02)	173.01 (2.19)	270.8 (1.56)
P86	288.74 (8.03)	144.98 (6.74)	260.78 (5.21)	117.03(2.73)	274.77 (2.65)
P100	144.98 (6.55)	288.74 (4.56)	98.99 (2.30)	260.78 (1.85)	117.03 (1.77)
P02	144.98 (5.52)	288.74 (3.81)	98.99 (2.25)	173.01 (1.62)	117.03 (1.61)
P05	144.98 (6.46)	288.74 (3.52)	98.99 (2.59)	173.01 (1.69)	117.03 (1.45)
P06	144.98 (4.58)	98.99 (4.52)	173.01 (2.06)	117.03 (2.00)	270.8 (1.72)

There are few studies that report the volatile profile in the *Crataegus* fruit; of the 37 compounds reported in this study only seven coincide with those reported in the fruit (Tab. 4), however volatile compounds have been reported in flowers (KOVALEVA et al., 2009) and leaves (LAKACHE et al., 2014).

Table 3.4. Volatile compounds identified by GC-MS in the *Crataegus* fruit.

Name	Formula	<i>m/z</i>	M W	Species	Source
2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98.99	98.145	<i>C. aestivalis</i> , <i>C. opaca</i> , <i>C. rufula</i> y <i>C. piinnatifida</i>	LINGYUN and BIJUN, 1997 HORVAT and CHAPMAN, 1991
Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	106.99	106.124	<i>C. aestivalis</i> , <i>C. opaca</i> , <i>C. rufula</i> y <i>C. piinnatifida</i>	LINGYUN and BIJUN, 1997 ROBERTSON et al., 1993
Hexyl acetate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.98	144.214	<i>C. aestivalis</i> , <i>C. opaca</i> , <i>C. rufula</i> y <i>C. piinnatifida</i>	LINGYUN and BIJUN, 1997 HORVAT and CHAPMAN, 1991
Butyl butanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂	144.98	144.214	<i>C. aestivalis</i> y <i>C. opaca</i>	CHA et al., 2011
Citral	C ₁₀ H ₁₆ O	152.06	152.237	<i>C. piinnatifida</i>	LINGYUN and BIJUN, 1997
Hexyl hexanoate	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200.99	200.322	<i>C. aestivalis</i> , <i>C. opaca</i> y <i>C. rufula</i>	HORVAT and CHAPMAN, 1991
β-caryophyllene	C ₁₅ H ₂₄	204.12	204.357	<i>C. monogyna</i>	ROBERTSON et al., 1993

m/z: Mass-to-charge ratio; MW: Molecular weight.

In this study, even though the detection of volatiles with the LTP-MS technique did not allow the structural identification of the compounds identified by their *m/z* ratio, the heat map allowed to prove a different chemical profile for each genotype.

Analysis of color

The color parameters evaluated provide quality attributes that are important in consumer preferences. The lower values (<52) of *chroma* (purity of color) obtained in the exocarp of the red fruits showed great variability in the intensity of color in comparison with yellow fruits which showed higher values (> 66) (Table 4). The fruits with yellow exocarp (P55 and P05) and mesocarp (CH72 and CH83) had the highest values (> 61 and > 71, respectively) of luminosity (tissues with brighter colors) and *hue* (yellow

exocarp and mesocarp), compared to red exocarp fruits with a luminosity of 32.46 to 47.49 h 26 ° to 32 ° (Table 4).

It is important to mention that yellow and larger fruits (P55, P02 and P100), grown in Puebla (first producer state at a national level with a production of 3500 t per year), are the most demanded in Mexico due to their agroindustrial and cultural use (SAGARPA, 2015).

Content of carotenoids

Carotenoids are natural pigments metabolized by plants, are responsible for the colors yellow, orange and red in some fruits and vegetables. The apocarotenoids (derivatives) are the result of the breaking of the carotenoids present in the aroma of flowers and fruits (NAMITHA AND NEGI, 2010). The exocarp of the genotypes P55 and P05 showed the highest concentrations of carotenoids (42.09 and 42.35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, respectively), which coincides with the higher values found for *hue* in the present study. However, despite of having small fruits, the mesocarp of genotype P25 had the highest concentration of carotenoids (20.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW), but also a considerable concentration in the exocarp (38.17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de FW), this non-commercial genotype from Puebla was the only one in Group I, where most of the genotypes from Chiapas were grouped. Concentrations in the exocarp of the two genotypes (P100 and P02) from *C. mexicana* were higher (38.68 and 33.61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) than that reported (26.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) by MÉNDEZ-ITURBIDE ET AL. (2013), but in lyophilized exocarp of the same species from the state of Tlaxcala, Mexico. The differences in the contents of both studies could be explained mainly by environmental factors, different stage of fruit ripening and post-harvest management (REILLY, 2013), as has been reported in other fruits (LÓPEZ-VIDAL et al., 2014; MESEJO et al., 2011). The content of carotenes in hawthorn was lower than that reported for melon (185.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) by MARTÍNEZ-VALDIVIESO et al., 2014), but higher than that found in peach (12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW) (CAMBELL and PADILLA, 2013). Therefore, the consumption of hawthorn fruits represent a source of carotenoids in the human diet, important in the prevention of vitamin A deficiencies, cancer, cardiovascular diseases, age-related macular degeneration and cataract formation; beside this fruit has an important antioxidant activity (ARATHI et al., 2015).

Anthocyanin content

The anthocyanins comprise another type of pigments responsible for the coloring of fruits from red to purple, are phenolic with antioxidant properties, which justify their nutraceutical properties (DELGADO-VARGAS et al., 2000). It was found that the genotypes with intense and dark red exocarp (CH18, CH51 and CH19) had the highest concentrations ($992.34 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $844.69 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and $747.69 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW, respectively) (Table 4) which corresponds to the smallest values of *hue* ($< 28^\circ$) and *chroma* (< 52), concentrations higher than those reported by FROELICHER et al. (2009) ($58.0 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ FW) in the exocarp of *C. monogyna*; however, lower than those reported for cranberries ($206.0 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}$ FW) (RIBERA et al., 2010) and raspberry ($28.7\text{-}55.6 \text{ mg}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$ FW) (PEÑA-VARELA et al., 2006). In contrast, yellow exocarp fruits showed very small concentrations ($5.56 - 30.3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW). In the mesocarp of all genotypes a lower concentration of these pigments was observed ($6.95 - 29.22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW), the exceptions were the genotypes CH10 and CH18, which had the highest anthocyanin values (29.22 and $28.38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and higher *hue* values ($> 51^\circ$).

It should be noted that in most of the genotypes the highest concentration of both pigments predominated in the exocarp, the exception was the genotypes P25 and CH18, where the concentrations in the fruit (exocarp + mesocarp) were important from the nutraceutical and medicinal point of view, because their consumption could provide high content of antioxidant pigments, for health benefits.

1 Table 3.5. Color parameters, total carotenoid content (TC) and total anthocyanins (TA) in the exocarp and mesocarp of 23 genotypes
 2 of the genus *Crataegus*.

Genotype	Luminosity	Hue	Exocarp			Mesocarp				
			Chroma	TC* ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	TA** ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Luminosity	Hue	Chroma	TC ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	TA ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
CH4	60.73 a	64.14 ab	66.21 abc	23.80 ab	5.56 e	65.43 defg	65.75 ab	59.02 a	15.61 ab	22.26 abc
CH8	35.95 ef	29.91 efg	54.88 ghj	16.41 ab	563.59 c	64.07 efg	62.42 ab	49.17 bcd	9.85 bcd	16.70 abc
CH10	37.10 def	28.73 fg	54.60 hi	11.84 ab	368.77 d	61.15 fg	51.08 bc	51.83 abc	4.51 fg	29.22 a
CH13	47.49 bc	37.31 d	62.15 bcdef	28.70 ab	239.35 d	68.47 bcdef	66.88 ab	50.14 bc	7.39 cdef	16.70 abc
CH15	64.35 a	67.25 a	68.27 a	13.77 ab	6.95 e	65.87 cdefg	68.54 ab	54.30 ab	9.78 bcd	10.43 abc
CH16	42.80 cd	32.41 e	57.51 fghi	11.99 ab	285.27 d	67.91 bcdef	67.60 ab	46.51 bcd	10.57 bcd	14.61 abc
CH18	32.46 f	26.99 g	45.05 j	19.54 ab	992.34 a	70.08 abcde	71.93 ab	48.15 bcd	5.04 efg	28.38 ab
CH19	34.68 ef	28.06 fg	51.94 i	5.71 b	747.69 b	67.74 bcdef	70.22 ab	47.54 bcd	3.95 g	18.17 abc
CH22	50.73 b	55.31 c	57.78 efgh	22.26 ab	16.19 e	61.49 fg	69.95 ab	45.69 bcd	7.28 def	12.01 abc
P25	52.48 b	59.38 bc	60.94 abc	38.17 ab	23.66 e	52.98 h	64.69 ab	52.02 abc	20.92 a	16.70 abc
CH27	52.13 b	61.47 abc	60.56 cdefg	14.41 ab	15.83 e	60.00 gh	66.97 ab	49.20 bcd	7.77 cde	14.96 abc
CH43	59.97 a	63.09 ab	63.76 abcd	10.71 ab	23.66 e	66.21 cdefg	70.91 ab	52.86 ab	9.55 bcd	9.73 abc
CH44	64.42 a	63.47 ab	66.16 abc	16.92 ab	10.43 e	66.72 cdefg	70.21 ab	45.60 bcd	6.67 defg	8.35 abc
CH51	34.83 ef	28.77 fg	52.59 hi	15.37 ab	844.69 ab	60.13 gh	57.35 b	43.93 cd	9.6 bcd	26.44 abc
P55	64.93 a	63.08 ab	67.36 ab	42.09 a	12.51 e	71.94 abcd	69.58 ab	47.62 bcd	8.98 bcd	6.95 c
EM66	60.64 a	62.75 ab	65.11 abc	13.38 ab	6.96 e	68.39 bcdef	65.81 ab	53.60 ab	9.11 bcd	16.70 abc
CH72	40.93 de	32.62 e	58.00 defgh	38.10 ab	315.89 d	71.60 abcd	72.65 ab	52.43 abc	7.37 def	15.30 abc
CH83	40.31 de	31.38 ef	55.76 ghi	22.06 ab	528.80 c	73.22 abc	73.31 ab	46.94 bcd	7.87 cde	13.92 abc
P86	62.23 a	60.75 abc	65.52 abc	13.53 ab	12.52 e	69.66 bcdef	72.48 ab	46.12 bcd	4.74 efg	23.66 abc
P100	61.79 a	62.23 ab	62.86 abcdef	33.61 ab	25.04 e	71.71 abcd	69.34 ab	53.85 ab	12.84 abc	8.35 bc
P02	62.44 a	61.94 abc	67.28 ab	38.68ab	18.09 e	70.18 abcde	69.32 ab	53.93 ab	5.22 efg	20.87 abc
P05	61.26 a	59.26 bc	67.44 ab	42.35 a	20.87 e	75.99 a	79.80 a	41.23 d	10.34 bcd	11.13 abc
P06	60.89 a	62.05 abc	63.42 abcde	22.06 ab	30.30 e	74.74 ab	79.71 a	40.41 d	9.83 bcd	9.67 abc
HSD	6.26	5.81	5.79	8.09	158.92	7.42	8.89	8.89	5.57	24.04

3
 4 * $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of fresh tissue. Means with the same letters are not statistically different (Tukey, $P < 0.05$). HSD: Honestly significant
 5 difference.

CONCLUSIONS

The profiles of chemical volatile compounds were different among the 24 genotypes of the Mexican *Crataegus*. The metabolomic study allowed to cluster the genotypes according to their chemical profile. The differences in the volatile profile were related to the size of the fruit, and in some genotypes to their origin (state of Chiapas). No relationship of volatile compounds by color or by species was found. The highest concentration of carotenoids was observed in the exocarp in comparison with the mesocarp of yellow fruits, in contrast the red fruits showed the highest concentrations in the exocarp. The LTP-MS technique allowed to detect volatile compounds of low abundance when analyzing the sample without pretreatment. The results of the present research could be used for the development of products derived from hawthorn with high levels of bioactive compounds that would justify their medicinal properties.

Acknowledgments

We thank Dr. Maria Teresa Carrillo Rayas (CINVESTAV Unidad Irapuato, CUI), and Maria Isabel Cristina Elizarraraz Anaya (CUI), Thermo and Waters Mexico for technical support. The project was funded by the CONACyT Fronteras project 2015-2/814 and the bilateral grant CONACyT-DFG 2016/277850. MDPL acknowledges her CONACyT postgraduate scholarship.

REFERENCES

- ARATHI, B.P., SOWMYA, P.R., VIJAY, KBASKARAN, V., LAKSHMINARAYANA, R. 2015: Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects – A review. Trends Food Sci. Tech. 45, 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.003>
- BARRETT, D.M., BEAULIEU, J.C. AND SHEWFELT R. 2010: Color, Flavor, Texture, and Nutritional Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Desirable Levels, Instrumental and Sensory Measurement, and the Effects of Processing. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50, 369–389. doi: 10.1080/10408391003626322.
- BANDERAS-TARABAY, J.A., CERVANTES-RODRÍGUEZ, M., GRADA-SÁNCHEZ, M., ESPINDOLA-LOZANO, M., CUEVAS-ROMERO, E., NAVARRO-OCAÑA, A., MENDEZ-ITURBIDE, D. 2015:

Antioxidant-mediated protective effect of hawthorn (*Crataegus mexicana*) peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Afr. J. Food Sci.* 9, 208-222. <https://doi.org/10.5897/AJFS2015.1269>

BETANCOURT-OLVERA, M., NIETO-ÁNGEL, R., URBANO, B., GONZÁLEZ-ANDRÉS, F. 2018: Analysis of the biodiversity of hawthorn (*Crataegus* spp.) from the morphological, molecular, and ethnobotanical approaches, and implications for genetic resource conservation in scenery of increasing cultivation: the case of Mexico. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 65, 897-916. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0583-4>.

BORYS, M., LESZCZYŃSKA-BORYS, W.Y.H. 1994: Tejocote (*Crataegus* spp.) planta para solares, macetas e interiores. *Rev. Chapingo Serie Hort.* 2, 95-107.

CABRERA L., G. 1992. *Diccionario de Aztequismos*. Ediciones Colofón. Distrito Federal, México. 166 p.

CALISKAN, O., GÜNDÜZ, K., SERCE, S., TOPLU, C., KAMILOĞLU, O., SENGÜL, M., ERCISLI, S. 2012: Phytochemical characterization of several hawthorn (*Crataegus* spp.) species sampled from the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Pharmacogn. Mag.* 8, 16-21. DOI:10.4103/0973-1296.93305

CAMPBELL, O. E., & PADILLA-ZAKOUR, O. I. 2013: Phenolic and carotenoid composition of canned peaches (*Prunus persica*) and apricots (*Prunus armeniaca*) as affected by variety and peeling. *Food Res. Int.* 54, 448–455. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.016>

CUI, N., NAKAMURA, K., TIAN, S., KAYAHARA, H., TIAN, Y. 2006: Polyphenolic content and physiological activities of chinese hawthorn extracts. *Biosci. Biotech. Bioch.* 70, 2948-2956.

CHA, D.H., POWELL, T.H.Q., FEDER, J.L., LINN, C.E. JR. 2011: Identification of host fruit volatiles from three mayhaw species (*Crataegus* series estivales) attractive to mayhaw-origin *Rhagoletis pomonella* flies in the Southern United States. *J. Chem. Ecol.* 37, 961-973. DOI 10.1007/s10886-011-0013-6

CHANG, Q., ZUO, Z., HARRISON, F., CHOW, M.S. 2002: Hawthorn. *J. Clin. Pharmacol* 42, 605-612.

DELGADO-VARGAS, F., JIMÉNEZ, A.R., PAREDES-LÓPEZ, O. 2000: Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40, 173-289. DOI:10.1080/10408690091189257

- EDWARDS, J.E., BROWN, P.N., TALENT, N., DICKINSON, T.A., SHIPLEY, P.R. 2012: A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 79, 5-26.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.006>
- ECHEVERRÍA, G., FUENTES, M.T., GRAELL, J., LÓPEZ, M. L. 2003: Relationships between volatile production, fruit quality and sensory evaluation of Fuji apples stored in different atmospheres by means of multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* 84, 5-20.
- ESPINO-DÍAZ, M., ROBERTO SEPÚLVEDA, D., GONZÁLEZ-AGUILAR, G., OLIVAS, G.I. 2016: Biochemistry of apple aroma: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 54, 375-394.
- EGGLESTON W., W. 1909: The *Crataegi* of Mexico and Central America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 36, 501-514.
- FROELICHER, T., HENNEBELLE, T., MARTIN-NIZARD, F., CLEENWERCK, P., HILBERT, J.L., TROTIN, F., GREC, S. 2009: Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chem.* 115, 897-903.
- GAMBOA-BECERRA, R., MONTERO-VARGAS, J.M., MARTÍNEZ-JARQUÍN, S., GÁLVEZ-PONCE, E., MORENO-PEDRAZA, A., WINKLER, R. 2017: Rapid classification of coffee products by data mining models from direct electrospray and plasma-based mass spectrometry analyses. *Food Anal. Method.* 10, 1359-1368. <https://dx.doi.org/10.1007/s12161-016-0696-y>
- GARCÍA, E. 1988: *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. Edit. UNAM. D. F., México. 246 p.
- GARCÍA-MATEOS, R., AGUILAR-SANTELISES, L., SOTO-HERNÁNDEZ, M., NIETO-ANGEL, R., KITE G. 2012. Compuestos fenólicos totales, flavonoides y actividad antioxidante en las flores de *Crataegus* spp. *Agrociencia* 46, 651-662.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n7/v46n7a2.pdf>
- GIUSTI, M.M., and WROLSTAD, R.E. 2001: Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. Ed. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, unit F1.2.1-13. New York. John Wiley & Sons.
- GRACE, S.C., HUDSON, D.A. 2016: Processing and Visualization of Metabolomics Data Using R. In: Prasain, J.K. Ed. *Metabolomics-Fundamentals and Applications* 667-94. Croatia. Intechopen, <http://dx.doi.org/10.5772/65405>

- HORVAT, R.J., CHAPMAN, J.R. 1991: Identification of volatile compounds from ripe mayhaw fruit (*Crataegus opaca*, *C. aestivalis*, and *C. rufula*). *J. Food Quality* 14, 307-312. DOI: 10.1111/j.1745-4557.1991.tb00071.x
- KOSTIĆ, D.A., VELICKOVIĆ, J.M., MITIĆ, S.S., MITIĆ, M.N. RANDELOVIĆ, S.S. 2012: Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial Activities of *Crataegus oxyacantha* L (Rosaceae) fruit extract from Southeast Serbia. *Trop. J. Pharm. Res.* 11, 117-124. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v11i1.15>
- KOVALEVA, A.M., GONCHAROV, N.F., KOMISSARENKO, A.N., SIDORA, N.V., KOVALEV, S.V. 2009: GC/MS Study of essential oil components from flowers of *Crataegus jackii*, *C. robesoniana*, and *C. flabellata*. *Chem. Nat. Compd.* 45, 582-584. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10600-009-9373-3.pdf>
- LAKACHE, Z., TIGRINE-KORDJANI, N., TIGRINE, C., KAMELL, A., MEKLATT, B.Y. 2014: Volatile constituents, phenolic compounds, and antioxidant activity of *Crataegus azarolus* leaves and flowers growing in Algeria. *Chem. Nat. Compd.* 50, 1132-1135. DOI 10.1007/s10600-014-1183-6
- LINGYUN, C., BIJUN, X. 1993: Identification of volatile compounds of hawthorn by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). *Chinese J. Chromatography* 15(3), 219-221.
- LÓPEZ-VIDAL, O., ESCALONA-BUENDÍA, H., PELAYO-ZALDÍVAR, C., CRUZ-SALAZAR, J., VILLAHERNÁNDEZ, J.M., RIVERA-CABRERA, F., VILLEGAS-TORRES, O., ALIA-TEJACAL, I., PÉREZ-FLORES, L.J., DÍAZ DE LEÓN-SÁNCHEZ F. 2014: Carotenoides, capacidad antioxidante y volátiles del aroma durante la maduración de jitomate. *Rev. Int. Bot. Exp. PHYTON* 83, 139-146. <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v83n1/v83n1a24.pdf>
- LIU, S., CHANG, X., LIU, X., SHEN, Z. 2016: Effects of pretreatments on anthocyanin composition, phenolics contents and antioxidant capacities during fermentation of hawthorn (*Crataegus pinnatifida*) drink. *Food Chem.* 212, 87-95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.146>
- MARTÍNEZ-JARQUÍN, S., MORENO-PEDRAZA, A., CÁZAREZ-GARCÍA, D., WINKLER, R. 2017: Automated chemical fingerprinting of Mexican spirits derived from Agave (tequila and mezcal) using Direct-Injection Electrospray Ionisation (DIESI) and Low-Temperature Plasma

(LTP) Mass Spectrometry. Anal. Methods 9, 5023-5028. <https://doi.org/10.1039/C7AY00793K>

MARTÍNEZ-JARQUÍN, S., WINKLER, R. 2013: Design of a Low-Temperature Plasma (LTP) probe with adjustable output temperature and variable beam diameter for the direct detection of organic molecules. Rapid Commun. Mass Sp. 27, 629-634. <https://doi.org/10.1002/rcm.6494>

MARTÍNEZ-VALDIVIESO, D., FONT, R., BLANCO-DÍAZ, M. T., MORENO-ROJAS, J. M., GÓMEZ, P., ALONSO-MORAGA, A., DEL RÍO-CELESTINO, M. 2014: Application of near-infrared reflectance spectroscopy for predicting carotenoid content in summer squash fruit. Comput. Electron. Agr. 108, 71–79. <http://doi.org/10.1016/j.compag.2014.07.003>

MC. GUIRE, G.R. 1992: Reporting of objective color measurements. HortScience 27, 1254– 12555.

MÉNDEZ-ITURBIDE, D., BANDERAS-TARABAY, J.A., NIETO-CAMACHO, A., ROJAS-CHÁVEZ, A., GARCÍA-MEZA, M.G. 2013: Antioxidant capacity of extracts from hawthorn (*Crataegus mexicana*) skin. Afr. J. Food Sci 7, 50-158. <https://doi.org/10.5897/AJFS2013.1006>

MESEJO, C., GAMBETTA, G., GRAVINA, A., MARTINEZ-FUENTES, A., REIGA, C., AGUSTIA, M. 2012: Relationship between soil temperature and fruit colour development of ‘Clemenpons’ Clementine mandarin (*Citrus clementina* Hort ex. Tan). J. Sci. Food Agr. 92, 520 -525.

NAMITHA, K. K., NEGI, P. S. 2010: Chemistry and biotechnology of carotenoids. Crit. Rev. Food. Sci. 50, 728-760. <http://doi.org/10.1080/10408398.2010.499811>

NIETO A., R. 2007: Tejocote. In: Nieto A., R. Ed. Frutales Nativos, Un Recurso Fitogénético de México, 25-118. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

NIETO-ANGEL, R., BORYS, M.W. 1992: Banco de germoplasma de tejocote (*Crataegus* spp.) de la República Mexicana. Revista Chapingo 77, 126-130.

NÚÑEZ-COLÍN, C.A., HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M.A. 2011: La problemática en la taxonomía de los recursos genéticos de Tejocote (*Crataegus* sp.) en México. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 2, 141-153.

PEÑA-VARELA, G., SALINAS-MORENO, Y., RÍOS-SÁNCHEZ., R. 2006: Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). Rev. Chapingo Serie Hort. 12, 159-163.

- PHIPPS J., B. 1997: Monograph of Northern Mexican *Crataegus* (Rosaceae subfam. Maloideae). SIDA Botanical Miscellany 15, 1-94.
- PHIPPS J., B., O'KENNON, R.J., LANCE, R.W. 2003: Hawthorns and Medlars. Royal horticultural society plant collector guide. Portland, USA. Timber Press, 139 p.
- REILLY, K. 2013: On farm and fresh produce management. In: Tiwari, B. K., Bruton, N.P., Brennan, C.S. Eds. Handbook of Plant Food Phytochemicals: sources, stability and extraction pp. 201-234. Oxford, UK. John Wiley and Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118464717.ch9>
- SAGARPA. 2015: Autoriza EUA la importación de higos y tejocotes mexicanos. SAGARPA. http://comunicacion-socialguajuato.blogspot.com.es/2015_04_06_archive.html. Accessed 19 June 2017.
- ROBERTSON, G.W., GRIFFITHS, D.W., WOODFORD, J.A.T., BIRCH, A.N.E., PICKET, J.A., WADHAMS, L.J. 1993: A comparison of the flower volatiles from hawthorn and four raspberry cultivars. Phytochemistry 33, 1047-1053. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85021-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85021-I)
- VEBERIC, R., SLATNAR, A., BIZJAK, J., STAMPAR, J., MIKULIC-PETKOVSEK, M. 2015: Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. LWT - Food Sci. Tech. 60, 509-517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.033>
- WROLSTAD, R.E., DURST, R.W., LEE, J. 2005: Tracking colour and pigment changes in anthocyanin products. Trends Food Sci. Tech. 16, 423-428. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.019>
- ZHAO, Y., WANG, Y., WANG, J., WU, Z., ZULI SUN, Z., TIAN, T., NIU, H., JING, L., FANG, Z. YANG, J. 2015: Characterization of Volatile Constituents of Chinese Hawthorn (*Crataegus* spp.) Fruit Juices 533-545. In: ZHANG, T.C. and NAKAJIMA, M. (eds.). Advances in Applied Biotechnology. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York. DOI 10.1007/978-3-662-46318-5_55

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de la presente investigación se logró optimizar un protocolo de extracción de ADN basado en el protocolo de Doyle y Doyle (1990) sin procedimientos tan largos y laboriosos evitando el uso de compuestos tóxicos y contaminantes como el fenol, a partir de hoja de tejocote (*Crataegus* sp.) liofilizada. El ADN obtenido de este procedimiento fue de buena calidad para ser utilizado en posteriores técnicas de marcadores moleculares.

Con el uso de los códigos de barra *matK*, *rbcl* y *psbA-trnH* se obtuvo la separación de las accesiones de tejocote mexicano de aquellas accesiones obtenidas del GenBank, mostrando algunas divergencias; la región de mayor variabilidad fue *psbA-trnH* seguida de *matK*, el locus *rbcl* fue el que mostro menor evolución. De manera particular para las 35 accesiones mexicanas, no se logró separación entre ellas mostrando alto grado de parentesco, probablemente relacionado con eventos de reciente divergencia. Así mismo se encontró 100% de similitud entre las secuencias de las accesiones mexicanas analizadas con la especie reportada como *C. pubescens* en otros estudios.

En cuanto al perfil de compuestos volátiles obtenido por LTP-MS, se encontró que este fue diferente en las 24 accesiones de tejocote analizadas, cuyas diferencias se relacionaron con el tamaño del fruto y en algunos casos con el origen del genotipo, no se encontró relación por color ni especie. El contenido de carotenos fue mayor en el exocarpio de frutos amarillos en relación al mesocarpio; en contraste el exocarpo de los frutos rojos mostró mayor contenido de antocianinas.