

Estimación de la diversidad genética del Nopal, usando marcadores moleculares tipo AFLP¹

Estimation of the genetic diversity of *Opuntia* spp. using molecular markers AFLP

García-Zambrano² EA, F Zavala-García², A Gutiérrez-Diez, MC Ojeda-Zacarías, I Cerda-Hurtado³

Resumen. El presente estudio tiene por objetivo aplicar la técnica de los marcadores moleculares tipo AFLP para la estimación de la diversidad genética en nopal dentro del Banco de Germoplasma de la FAUANL, donde se han reportado 12 accesiones como posibles duplicados por medio de marcadores moleculares tipo RAPD. El método utilizado para la extracción de ADN fue el del ruptor celular. El ADN fue digerido y ligado, para posteriormente realizar una preamplificación y después la amplificación selectiva. Los fragmentos amplificados fueron luego separados y analizados. Se concluyó que ninguna de las accesiones estaba duplicada. Esto se debió a que en el dendograma generado al usar el método de UPGMA se formaron 8 grupos. Dos de estos grupos lo integraron 3 accesiones en cada uno y los 6 grupos restantes estuvieron formados por una accesión. Estos resultados se confirmaron al estimar la distancia genética entre las accesiones, ya que ninguna de ellas generó el valor de cero.

Palabras clave: marcadores moleculares, AFLP, accesiones.

Abstract. The objective of this study was to apply the AFLP-type molecular marker technique to estimate genetic diversity in cactus pear within the Germplasm Bank of FAUANL. Twelve accessions have been reported as possible duplicates through type RAPD- molecular markers in such Bank. DNA was extracted using the cellular ruptor technique, and then digested and bound. A preamplification and subsequent selective amplification were conducted. Amplified fragments were then separated and analyzed. It was concluded that none of the accessions was duplicated. This was because 8 groups were formed in the dendogram obtained after applying the UPGMA method. There were 3 accessions in each of two groups. The six remaining groups were formed by one accession each. These results were confirmed when the genetic distance was estimated among the study accessions, since none of them gave the zero value.

Key words: molecular markers, AFLP, accessions.

¹ Trabajo realizado en la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. Apartado Postal 358, San Nicolás de los Garza N. L. C.P. 66450. México.

² Maestro Investigador de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México

³ Alumna del programa Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Address Correspondence to: Eduardo Alejandro García Zambrano, e-mail: eagarca@fa.uanl.mx

Recibido/Received: 28.V.2007. Aceptado/Accepted 28.VI.2009.

INTRODUCCIÓN

El nopal, *Opuntia* spp., se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial. Sin embargo, es en México donde se encuentra la mayor diversidad genética a nivel inter e intraespecífico siendo reconocido como el centro de origen y dispersión de este género (Bravo, 1978). La riqueza genética que presenta México debe ser considerada como parte de su patrimonio, por lo que se debe dar atención a su conservación, mejoramiento y uso, haciendo de ella un elemento activo en el desarrollo del país. Lo anterior implica la formación de centros de recursos genéticos, cuyas funciones principales deberían ser la conservación, exploración, documentación e intercambio de los mismos (León, 1978).

La Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL) se ha dedicado a estudiar al nopal a nivel molecular para estimar la diversidad genética existente en el país. Para esto utilizará su Banco de Germoplasma, en el cual se encuentran representados la diversidad genética existente en la zona norte y centro de México. Desde 1998 se inició la estimación de la diversidad genética por medio de marcadores moleculares tipo RAPD (García, 2006). Posteriormente (2005) se estableció el protocolo para la generación de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). El poder de los AFLP está basado en las variaciones genéticas moleculares que existen entre especies, variedades o cultivares genéticamente cercanos. Estas variaciones en la secuencia del ADN son explotadas por los AFLP de tal manera que se generan huellas genéticas, las cuales pueden ser producidas en forma rutinaria y consistente (Vos et al., 1995).

La aplicación de AFLP al estudio del genoma de nopal es una técnica que no se ha reportado previamente. El objetivo del presente trabajo fue aplicar esta herramienta para estimar la diversidad genética dentro del Banco de Germoplasma de Nopal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se trabajó con 12 accesiones de nopal (Pabellón, Octubreña T-39, Sangre de Toro, Rojo 3589 T26 L, Amarillo 2289 T 32 L, Colorada T6, Octubreña, Fafayucan T-23, Cardón Rojo, Concha de Oro, Liso Forrajero y Pabellón T30), las cuales fueron reportadas como duplicados dentro del Banco de Germoplasma de Nopal de la FAUANL (García, 2006).

Extracción de ADN. El ADN fue extraído por el método del ruptor celular con el kit FastDNA® (Qbiogene, Inc., C.A.). La cuantificación del ADN se realizó mediante fluorimetría; la calidad del ADN se determinó en un gel de agarosa 1%.

Protocolo para generar AFLP en Nopal.

Digestión del ADN genómico utilizando enzimas de restricción.

La digestión del ADN se realizó de acuerdo a lo especificado en el kit IRDye™ Fluorescent AFLP de LI-COR® Biosciencias. Se trabajó con un volumen de reacción de 12,5 µl, que incluyó los siguientes componentes en la mezcla de reacción: solución amortiguadora 5X, 100 ng de ADN, mezcla de enzimas *EcoR1* / *Mse1* y agua desionizada; el tiempo de incubación fue de 2 horas a 37°C, con un paso final de inactivación de enzimas a 70°C por 15 minutos. La digestión se corroboró en un gel de agarosa al 1%.

Ligamiento de adaptadores.

El volumen total de la mezcla de reacción fue de 25 µl. Los componentes de la mezcla fueron: solución de adaptadores, 12 µl; *T4* ADN ligasa, 0,5 µl y, agua estéril desionizada hasta completar el volumen de reacción. La reacción se incubó a 20°C por dos horas. Posteriormente se realizó una dilución 1:10 en TE de la mezcla de ADN digerido y ligado.

Preamplificación.

En el caso de la preamplificación, se manejó un volumen de reacción de 25,5 µl, los componentes de la mezcla de reacción fueron: ADN digerido y ligado, 2,5 µl; mezcla de preamplificación AFLP, 20 µl; solución amortiguadora 10 X (proporcionado con la *Taq* polimerasa), 2,5 µl, y *Taq* ADN polimerasa (5 U/µl), 0,5 µl. La mezcla de reacción se sometió a amplificación en un termociclador bajo el programa térmico de 20 ciclos a: 94°C por 30 segundos, 56°C por un minuto y 72°C por un minuto. Una vez finalizado el programa, las muestras se mantuvieron a 4°C. La preamplificación se corroboró en un gel de agarosa al 1%. Con la mezcla de reacción se realizó una dilución 1:40 en TE.

Amplificación selectiva.

La amplificación selectiva se realizó en la modalidad "dúplex", un iniciador *MseI* con dos iniciadores *EcoRI* marcados con IRDye en 700 y 800; el volumen de reacción fue de 11 µl. Los componentes de la mezcla fueron: ADN preamplificado y diluido, 2 µl; solución de trabajo de *Taq* ADN polimerasa, 6 µl; iniciador *MseI*, 2 µl; iniciador *EcoRI* marcado a 700 IRDye, 0,5 µl e iniciador *EcoRI* marcado a 800 IRDye, 0,5 µl. El volumen para el manejo por muestra para la preparación de la solución de trabajo de *Taq* ADN polimerasa es demasiado pequeño. Como resultado, se prepararon 200 µl que fue suficiente para procesar 33 muestras. La mezcla y proporción de los reactivos fue: agua estéril deionizada, 158 µl; solución amortiguadora 10 X, 40 µl, y *Taq* ADN polimerasa, 2 µl. La amplificación se realizó en termociclador bajo el programa térmico de: un ciclo de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por un minuto; 12 ciclos consecutivos donde la temperatura de alineación (65°C) disminuye 0.7°C por cada ciclo (la temperatura de desnaturalización de 94°C y de extensión de 72°C se mantuvieron); y 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por un minuto. Una vez que

se terminó el programa las muestras se conservaron a 4°C. Se probaron las 64 combinaciones de iniciadores del kit (Tabla 2) en 32 reacciones dúplex.

Electroforesis.

La separación y análisis de los fragmentos amplificados se realizaron en gel de poliacrilamida al 6,5% utilizando el secuenciador LI-COR R2 4200 con el programa SAGAMX. Las condiciones de recolección de datos fueron: 16 bit; voltaje 1500; energía=40 W; corriente a 40 mA; temperatura a 45°C, y tiempo=4 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con todos los iniciadores se obtuvieron productos de amplificación (Tabla 1). En promedio se observaron fragmentos cuyo peso osciló entre los 500 y 50 bp (Fig. 1). Los fragmentos producidos son potencialmente polimórficos, observándose una mayor cantidad de bandas cuando se utilizaron los iniciadores marcados con IRDye 700.

Tabla 1. Combinaciones de iniciadores que dieron productos de amplificación en Nopal.

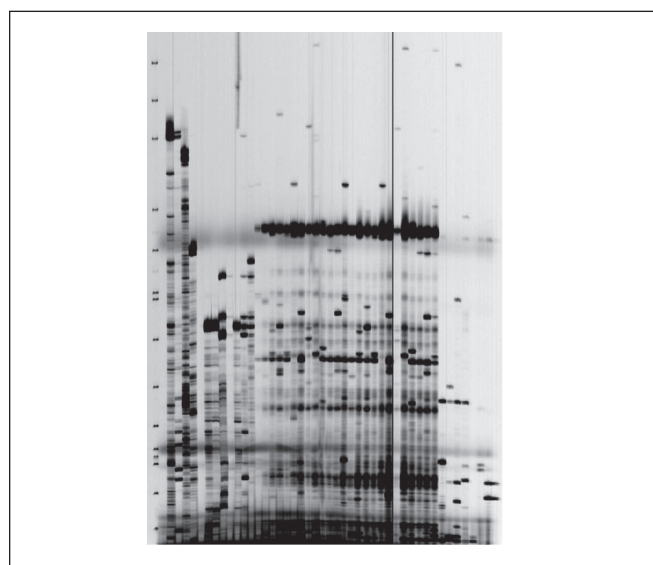
Table 1. Initiator combinations which give amplification products in Nopal.

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	●	●	●	●	●	●	●	●
E-AAG	●	●	●	●	●	●	●	●
E-ACA	●	●	●	●	●	●	●	●
E-ACC	●	●	●	●	●	●	●	●
E-ACG	●	●	●	●	●	●	●	●
E-ACT	●	●	●	●	●	●	●	●
E-AGC	●	●	●	●	●	●	●	●
E-AGG	●	●	●	●	●	●	●	●

En el dendograma de la Figura 2, obtenido al usar el método de UPGMA, se observó que ninguna accesión presentó una distancia de eslabonamiento de cero. Esto indica que los valores se encuentran entre un rango de 0,3 a 0,78 al calcular la distancia genética. Por lo tanto no existe duplicidad entre las accesiones estudiadas. Además, se formaron ocho grupos a la mitad de la máxima distancia de eslabonamiento (Cenis, 2000), 6 de los cuales presentaron una accesión (Pabellón, Octubreña T-39, Sangre de Toro, Rojo 3589 T26 L, Amarillo 2289 T 32 L, y Colorada T6). Se formaron otros 2 grupos con 3 accesiones cada uno (Octubreña, Fafayucan T-23 y Cardón Rojo, así como Concha de Oro y Liso Forrajero-Pabellón T30).

Fig 1. Productos de amplificación en 12 accesiones de Nopal por medio de la técnica de AFLP con varias combinaciones de iniciadores IRDye 700.

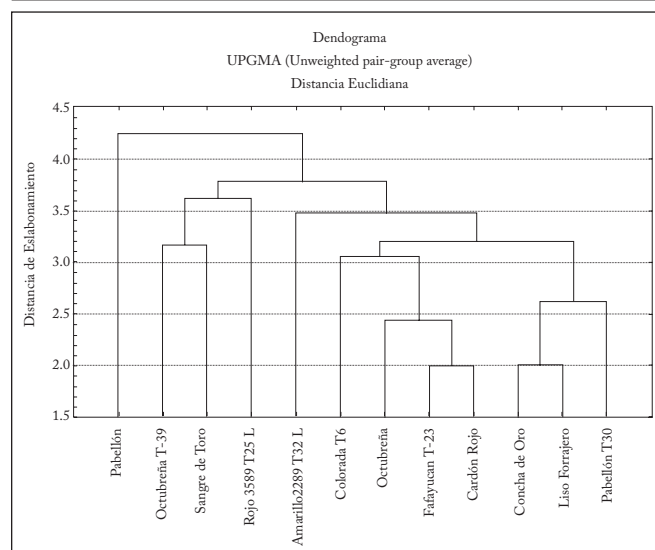
Fig 1. Amplification products in 12 accessions of Nopal through the AFLP technique with various combinations with initiators IRDye 700.



Al analizar estas plantas fenotípicamente, se observó que no existe ningún carácter fenotípico que nos pueda marcar similitudes notables (Pimienta, 1994) que justifiquen un agrupamiento a una distancia de eslabonamiento de 2,9. Se puede decir entonces que el agrupamiento de las accesiones se podría deber a algún carácter no expresado fenotípicamente. Sin embargo, es claro que estas accesiones no son duplicadas.

Fig. 2. Dendograma calculado a partir de datos moleculares de las 12 accesiones estudiadas como posibles duplicados dentro del Banco de Germoplasma de la FAUANL, usando el método de UPGMA.

Fig. 2. Calculated dendrogram from molecular data of the 12 study accessions as possible duplicates within the Germplasm Bank of the FAUANL, using the UPGMA method.



CONCLUSIONES

Las 12 accesiones reportadas como posibles duplicados en el estudio efectuado molecularmente por medio de RAPD en el Banco de Germoplasma de la FAUANL se analizaron con la técnica de AFLP. Se concluyó que ninguna de las accesiones es duplicada, ya que al estimar la distancia genética existente en las accesiones, ninguna generó el valor de cero. El uso de la distancia genética hace que se detecten posibles duplicados en el dendograma. Se concluye que no existe duplicidad en las accesiones estudiadas molecularmente en el Banco de Germoplasma de Nopal.

REFERENCIAS

- Bravo, H. (1978). Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México, D.F. 743 p.
- Cenis, J.L. (2000). Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. CIDA La Alberca Murcia pp: 40-43.
- García Zambrano, EA, G. Salinas, R. Vázquez, E. Cárdenas y A. Gutiérrez (2006). Clasificación y estimación de la diversidad genética de Nopal *Opuntia* spp en base a descriptores fenotípicos y marcadores genético moleculares. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 75: 125-135.
- León, J. (1978). Información sobre bancos de germoplasma existentes en el mundo. En: T. Cervantes S. (Eds.), Recursos genéticos disponibles a México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, Méx. pp: 60-80.
- Pimienta-Barrios, E. (1994). Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of México. *Journal of Arid Environments* 28: 1-11.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijan, T. Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407- 4414.