

Primer reporte del empleo de marcadores ISTR en Cactaceae (*Pilosocereus sp*)

First report of the employment of ISTR markers in Cactaceae (*Pilosocereus sp*)

Grecia Montalvo Fernández¹, Matilde Ortiz García¹, Elisa Quijala Mendoza²,
Miguel Keb-Llanes², Luis Emilio Rojas³, Martín Bautista Alor², Maruchi Alonso Esquivel⁴,
Adriana Quiroz Moreno², Wolfgang Rohde⁵, Lorenzo Felipe Sánchez Teyer²

Resumen

Pilosocereus sp es una especie en peligro crítico de extinción, la única población conocida se encuentra en una mina de mármol verde, hoy abandonada, en la que su explotación produjo la disminución del 80% de la población en 3 años; en la actualidad quedan 28 ejemplares, de ellos unos pocos son adultos, de los cuales solo dos producen frutos. Una de las etapas necesaria para su recuperación es la producción de plántulas para realizar el reforzamiento de la población natural. Como las plantas obtenidas serán plantadas en condiciones naturales, donde se enfrentarán a diversas situaciones ambientales, es conveniente realizar un estudio de diversidad genética. El objetivo de este trabajo fue estimar la variabilidad genética de plántulas de *Pilosocereus sp* empleando la técnica Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR). Se realizó la germinación *in vitro* de semillas y se determinó la variabilidad genética de las plántulas obtenidas. Con el análisis molecular se detectaron un total de 97 bandas, de ellas el 62,8% fueron polimórficas. El mayor porcentaje de bandas polimórficas (85,7%) se obtuvo con la combinación de oligonucleótidos F6/B6. Con las combinaciones de oligonucleótidos empleados se detectaron de 4 a 6 patrones de banda diferentes. La heterocigosidad media esperada fue de 0,39.

Palabras clave: Cactaceae, variabilidad, extinción, polimorfismo.

Abstract

Pilosocereus sp is a species in critical danger of extinction; the only known population is in an abandoned green marble mine; its exploitation produced an 80% decrease in the population in just 3 years. There are 28 individuals today but only a few of them are mature and only two produce fruit. One of the necessary stages for their recovery is seedling production aimed at reinforcing the natural population. A genetic diver-

-
- 1 Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. Territorio Villa Clara, Cuba. greciamf@cine.com
 - 2 Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, México.
 - 3 Instituto de Biotecnología de Las Plantas, Villa Clara, Cuba.
 - 4 Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). Cuba
 - 5 Max-Planck Institut für Züchtungsorschung (MPIZ). Köln. Germanv.

sity study should be carried out as the plants will be planted in natural conditions where they will face varied environmental situations. This work was aimed at estimating *Pilosocereus sp* genetic variability using the inverse sequence-tagged repeat (ISTR) technique. *Pilosocereus sp* seeds were germinated *in vitro* and the seedlings' genetic variability was determined. Molecular analysis led to 97 bands being detected, 62.8% of them being polymorphic. The highest percentage of polymorphism (85.7%) was obtained with the F6/B6 oligonucleotide combination; 4 to 6 different band patterns were detected with these primer combinations. Mean expected heterozygosity was 0.39.

Key words: Cactaceae, variability, extinction, polymorphism.

Recibido: junio 23 de 2010

Aprobado: noviembre 5 de 2010

Introducción

Pilosocereus sp es una especie de la familia Cactaceae que es endémica de la provincia Villa Clara, Cuba. Esta especie se encuentra en peligro crítico de extinción, solo existe una sola población natural con muy pocos individuos. El hábitat natural era una cantera de mármol que fue explotada durante varios años por el hombre, lo cual provocó su destrucción. La obtención de plántulas es una de las etapas del proyecto de recuperación de esta especie. Cuando trabajamos con especies amenazadas es de vital importancia la diversidad genética de las plántulas obtenidas ya que estas serán devueltas a las condiciones naturales donde se enfrentarán a diversas situaciones ambientales.

Los marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados en la familia Cactaceae, tanto para estudios filogenéticos y taxonómicos (Charles *et al.*, 2002) como para estudios de variabilidad genética entre individuos y entre poblaciones (Clark-Tapia *et al.*, 2005). Un aspecto importante para tener en cuenta es la selección del tipo de marcador que se empleará. Dicha elección dependerá del objetivo del estudio que se pretende abordar, y de la biología de la especie. Sin embargo, no se puede olvidar que todas las técnicas moleculares presentan ventajas y limitaciones, y su aplicación dependerá, en última instancia, de la disponibilidad de recursos para ejecutar un sistema de marcadores moleculares dado (Coto y Cornide, 2003).

El análisis de las secuencias inversas repetidas y marcadas (ISTR) es una técnica basada en PCR aplicable a genomas de animales, plantas y microorganismos (Rohde, 1995). El inicio del empleo de esta técnica en Cuba está vinculado a cultivos de interés agrícola y han sido de utilidad para estudios de diversidad genética y mapeo genético en coco (Rhode *et al.*, 1995; Rhode *et al.*, 1999; Durán *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2008), mango (Capote *et al.*, 2003) y aguacate (Ramírez *et al.*, 2003), así como para la certificación de variedades de cereales (Donini *et al.*, 1999). Considerando la utilidad de estos marcadores para estudios de diversidad genética, el presente trabajo tiene como objetivo estimar la variabilidad genética entre plántulas de *Pilosocereus sp* mediante el polimorfismo generado por los ISTR. Este es el primer estudio de diversidad genética en una especie de la familia Cactaceae empleando estos marcadores.

Materiales y métodos

Área de estudio

La población natural de esta especie se encuentra en la provincia Villa Clara, Cuba, específicamente en la carretera central banda a Placetas km 317, y limita con un área protegida que atesora varias plantas endémicas y en peligro de extinción, por lo que ostenta la categoría de Reserva Florística Manejada. *Pilosocereus sp* es una de las 14 especies endémicas y amenaza-

da que tiene la reserva, en la cuál se ejecuta un proyecto para su recuperación y conservación.

Material vegetal

En la población natural se colectaron 4 semillas, y como esta especie tiene polinización cruzada, cada semilla es un genotipo diferente. Las mismas se lavaron y se pusieron a secar a temperatura ambiente, luego se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,5% durante 10 min. Para la germinación de las semillas se empleó un medio de cultivo semisólido con el 50% de las sales MS (Murashige-Skoog, 1962). Se utilizaron frascos de cristal los cuáles fueron colocados en una cámara de luz solar. A las plántulas geminadas se les realizó la extracción de ADN.

En la accesión 9887 del herbario ULV del jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas se encuentra depositada una rama de *Pilosocereus sp* como muestra de referencia.

Extracción de ADN. Se utilizó el método del CTAB descrito por Doyle y Doyle (1990) con una modificación (Rhode, 1995). El tampón CTAB básico estuvo compuesto por 100 mM Tris-HCl (pH=8,0), 2,1 M NaCl, 150 mM EDTA, 3% bromuro de cetiltrimetilamónio (CTAB), 4% de polivinil pirrolidona (PVP) y 140nM de β - mercaptoetanol).

Análisis de diversidad genética mediante ISTR

Las reacciones de ISTR fueron realizadas mediante el protocolo establecido por Rohde (1995). Teniendo en cuenta las pocas semillas que fue posible recolectar, se utilizaron muestras de ADN de cuatro plántulas que corresponden a cuatro genotipos diferentes. Como esta es la primera experiencia del uso de los marcadores ISTR en esta especie, se realizó primero un estudio con 15 combinaciones de oligonucleótidos que ya se conocía que generaban polimorfismo en varias especies, las corridas electroforéticas de estas reacciones se realizaron en geles de agarosa al 1,5%. Posteriormente se seleccionaron 6 combinaciones de oligonucleótidos F1/B3, F3/B3, F4/B3, F5/B3, F6/B3, F6/B6, que fueron los que detectaron mayor polimorfismo (tabla 1), y se hicieron las corridas electroforéticas en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 4%. Cada reacción contenía 20-40 ng de ADN genómico, 200 μ M de dNTP, tampón de PCR 10X con $MgCl_2$, 10 pmol de cada cebador, y una unidad de Taq ADN polimerasa (GIBCO-BRL) en un volumen final de 30 μ L. La amplificación fue realizada bajo las condiciones siguientes: 94 °C por 2 min, 40 ciclos de (94 °C, 30 seg, 50 °C por 30 seg, 72 °C por 2 min), y un ciclo final de 72 °C por 10 min. Los productos de la amplificación fueron visualizados mediante tinción con plata de forma similar a lo reportado por Rohde (1995).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la estimación de la variabilidad genética de 4 genotipos de *Pilosocereus sp*

Oligonucleótidos (ISTR)	Nomenclatura
5' AGGAGGTGAATACCTTAG 3'	F1
5' GTCGACATGCCATCTTTC 3'	F3
5' TATAGTACCTATTGGGTG 3'	F4
5' ATATATGGACTTAAGCAAGC 3'	F5
5' GTATTGTACGTGGATGACATC 3'	F6
5' ATTCCCATCTGCACCATT 3'	B3
5' ATATATGGACTTAAGCAAGAC 3'	B6

Se realizó la lectura visual de los geles de poli(acrilamida y las bandas polimórficas se evaluaron de forma binaria con 1 y 0 para la presencia y ausencia de bandas respectivamente. A partir de las matrices de datos originales se calcularon los siguientes parámetros:

1. Número total de bandas (N).
2. Número de bandas polimórficas (np).
3. Número de bandas no polimórficas (npm).
4. Porcentaje de bandas polimórficas (% P).
5. Número promedio de bandas polimórficas (npp).
6. Número de patrones de bandas identificados por combinación de oligonucleótidos (Tp).
7. Heterocigosidad esperada (He) del loci polimórfico: $He = 1 - \sum p_i^2$ donde p_i es la frecuencia del i^{mo} alelo.
8. Heterocigosidad media esperada: $\Sigma He / n$ donde n es el número de oligonucleótidos empleados (Hep).

Se estimó la similitud genética entre los genotipos estudiados, mediante el paquete estadístico NTSys-PC (versión 2.1), subprograma SIMQUAL, empleando como coeficiente Dice (Dice, 1945), y para el agrupamiento el método de las medias aritméticas por grupo no ponderadas UPGMA.

Resultados y discusión

En este estudio, con el empleo de 6 combinaciones de oligonucleótidos ISTR se obtuvieron un total de 97 bandas de las cuales el 62,8% fueron polimórficas. La combinación F6B6 presentó el menor número de bandas (7), sin embargo, es precisamente con esta combinación que se logró el mayor porcentaje de bandas polimórficas (85,7%) (tabla 2); resultados similares obtuvieron Alonso *et al.* (2008) cuando, al analizar ecotipos de cocotero con

la combinación de oligonucleótido F1/B2A, obtuvieron el menor número de bandas pero todas fueron polimórficas. El mayor número de bandas se obtuvo con la combinación F5B3 (25) con un 84% polimórficas. Con las combinaciones F3/B3 y F4/B3 se obtuvieron iguales valores de porcentajes de bandas polimórficas (50%), seguido por la combinación F1/B3 que mostró 52%. De forma general, el promedio de bandas polimórficas fue de 10,1.

El número de patrones de bandas observados es un parámetro que nos da más información en cuanto a la variabilidad entre las bandas polimórficas. Obtuvimos de 4 a 6 patrones de banda diferentes con las distintas combinaciones de oligonucleótidos ISTR. Con las combinaciones F3/B3, F4/B3 y F6/B3 se obtuvieron 5 patrones de bandas.

En cuanto a la heterocigosidad esperada es válido resaltar que es muy similar en todas las combinaciones de oligonucleótidos empleadas, con valores que oscilan entre 0,37 (F6/B3) y 0,42 (F1/B3). La heterocigosidad media esperada fue de 0,39, valor que se considera bajo lo que puede deberse a que hay una sola población de esta especie y, aunque es alógama, hay muy pocos individuos reproductores, a esto se le suma el bajo número de individuos que fue posible analizar.

El análisis de agrupamiento permitió la diferenciación de todos los genotipos, la figura 1 muestra las relaciones genéticas entre ellos. Se puede definir la presencia de un grupo formado por los individuos 1, 2 y 3, mientras que el genotipo 4 está más alejado genéticamente. Los valores de similitud pueden verse en la tabla 3, donde los genotipos 1, 2 y 3 presentan valores altos (81, 82 y 83%). Hay tres factores que pudieron influir en este resultado: las semillas que dieron origen a estas plantas procedían de la misma planta madre, otro aspecto que pudo incidir es que esta especie tiene una sola población por lo que el intercambio de material genético se realiza entre pocos individuos. Por último, nos referiremos al tipo de reproducción, que en este caso es por autofecunda-

Tabla 2. Niveles de polimorfismo detectados para cada combinación de oligonucleótidos empleados en el análisis molecular de 4 genotipos de *Pilosocereus* sp

Parámetros evaluados		Combinaciones de oligonucleótidos ISTR					
		F1/B3	F3/B3	F4/B3	F5/B3	F6/B3	F6/B6
No. total de bandas	N	19	20	16	25	10	7
No. de bandas polimórficas	np	10	10	8	21	6	6
No. de bandas no polimórficas	nnp	9	10	8	4	4	1
Porcentaje de bandas polimórficas	P	52,6	50	50	84	60	85,7
No. promedio de bandas polimórficas	npp	10,1					
No. de patrones de bandas	npb	6	5	5	6	5	4
Heterocigosidad esperada	He	0,42	0,40	0,40	0,39	0,37	0,41
Heterocigosidad media esperada	Hep	0,39					

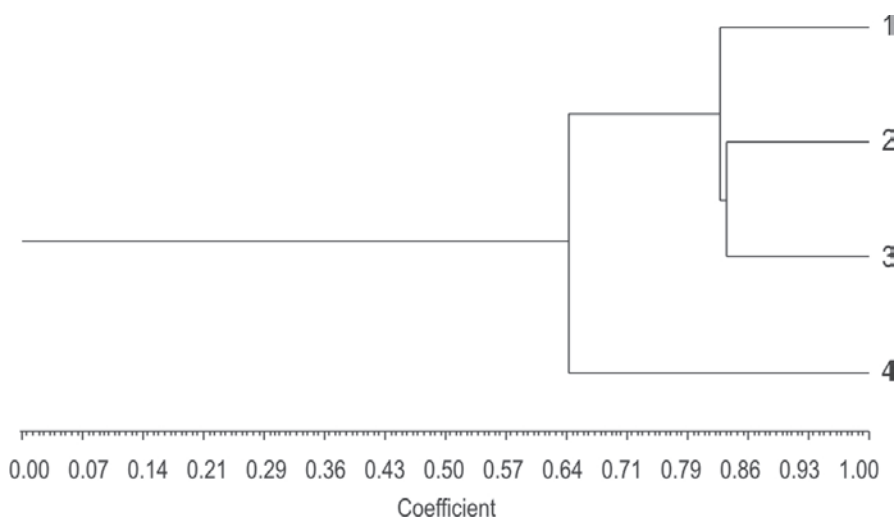


Figura 1. Resultados del análisis de agrupamiento realizado sobre la base de 6 combinaciones de oligonucleótidos ISTR, mediante el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA del paquete de programa NTSYS-pc (versión 2.1).

ción y alogamia. Al existir autofecundación la progenie tiene menos diversidad genética y por ende hay una tendencia a que la descendencia sea más similar.

El genotipo 4 mostró menos similitud con los genotipos 1, 2 y 3 (61, 66, 65% respectivamente). Sin embargo, es válido resaltar que a pesar de los pocos genotipos que se pudieron

analizar es evidente que partiendo de semillas se puede obtener variabilidad en las plántulas obtenidas, lo cual pudiera hacerse más evidente al analizar más plantas y emplear más combinaciones de oligonucleótidos. Estos resultados refuerzan la hipótesis planteada por Quiala *et al.* (2007) quien plantea que para propagar especies amenazadas el mejor material vegetal de

partida lo constituyen las semillas pues ellas por sí solas son fuente de variabilidad genética, y que la propagación *in vitro* de especies amena-

zadas a partir de tejido somático resulta en una clonación que empobrece la variabilidad genética de la población de plantas obtenidas.

Tabla 3. Matriz de similitud entre los genotipos estudiados

	1	2	3	4
1	1,0000000			
2	0,8194444	1,0000000		
3	0,8285714	0,8307692	1,0000000	
4	0,6129032	0,6666667	0,6545455	1,0000000

Conclusiones

Los marcadores ISTR demostraron ser eficientes para la detección de variabilidad genética en *Pilosocereus* sp.

A pesar de los pocos genotipos que fue posible analizar, se evidenció que se puede lograr diversidad genética en las plántulas obtenidas siempre que se trabaje con semillas como material vegetal de partida.

Referencias bibliográficas

- Alonso, M., Cueto, J., Santos, Y., Llauger, R., Rodríguez, M., Santos, Y., Rohde, W. 2008. Estimación de la variabilidad genética entre ecotipos de cocoteros presentes en Cuba por ISTR. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (2): 6-13.
- Capote, M., Becker, D., Cueto, J. R., Rohde, W. 2003. Development and application of various DNA marker types for the characterization of genetic diversity within commercial mango varieties in Cuba. *Journal Genet and Breeding*, 57: 175-184.
- Charles, A., Butterworth, J., Cota-Sánchez, H., Wallace, R. S. 2002. Molecular Systematics of Tribe Cactaceae (Cactaceae: Cactoideae): A Phylogeny Based on rpl16 Intron Sequence Variation. *Systematic Botany*, 27 (2): 257-270.
- Clark, R., Alfonso, C., Eguiarte, L. E., Molina, F. 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonora desert. *American Journal of Botany*, 92 (2): 272-278.
- Coto, O. y Cornide, M. T. 2003. *Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. La Habana: Félix Varela. p. 92-119.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Donini, P., Cooke, R., Reeves, R. 1999. Molecular markers in variety and seed testing. In: Proceedings of International Symposium on plant genetic engineering. La Habana: CIGB.
- Doyle, J. J. y Doyle, L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12 (1): 13-15.
- Durán, Y., Rohde, W., Kullaya, A., Goikoetxea, P., Ritter, E. 1997. Molecular analysis of East African Tall coconut genotypes by DNA marker technology. *Journal Genet and Breeding*, 5: 279-288.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiology Plant*, 15:473-497.
- Ramírez, I., Fuentes, J. L., Rodríguez, N. N., Cueto, J. R., Rohde, W. 2003. DNA polymorphism in Cuba varieties of avocado (*Persea americana* Mill.) as detected by Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR). *Cultivos Tropicales*, 23 (3): 75-85.
- Rohde, W. 1995. Inverse Sequence-Tagged Repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal Genet and Breeding*, 50: 249-261.
- Rohde, W., Kullaya, A., Rodríguez, J., Ritter, E. 1995. Genetic analysis of *Cocos nucifera* L. by PCR amplification of spacer sequences separating a subset of co-

- pia-like ecori repetitive elements. *Journal Genet and Breeding*, 49: 179-186.
- Rohde, W., Becker, D., Kullaya, A., Rodríguez, J., Herrán, A., Ritter, E. 1999. *Analysis of coconut germplasm biodiversity by DNA markers technology and construction of a genetic linkage map*. Kluwer Academic publishers. p. 99-121.
- Quijala, E., Montalvo, G., Matos, J., Mederos, R. 2007. La biotecnología vegetal: Su aplicación para el manejo integrado de cactáceas cubanas amenazadas. *Boletín de la Red Iberoamericana y del Caribe de Cactáceas y Suculentas*, 4 (3): 11-15.