

## Primer reporte de empleo de marcadores AFLP en Asteraceae en Cuba

### First report of the employment of AFLP markers in Asteraceae in Cuba

Grecia Montalvo Fernández\*, Adriana Quiroz Moreno\*\*, Luis Rojas Jiménez\*\*\*, Elisa Quiala Mendoza\*\*\*, Reinaldo Mederos Oroza\*, Hernán Morffi Mestre\*, Lorenzo Felipe Sánchez-Teyer\*\*

#### Resumen

*Rhodogeron coronopifolius* Griseb., es una especie vegetal de la familia Asteraceae, que se encuentra en peligro crítico de extinción. Es endémico de la provincia Villa Clara en la región central de Cuba. Habita en el matorral xeromorfo sub espinoso sobre serpentina. Existen solo cinco poblaciones naturales dentro de un área protegida, la principal causa de amenaza es la fragmentación de su hábitat por acciones antrópicas. Debido a su situación de conservación, se hace necesario realizar estudios de la diversidad genética de las poblaciones naturales para así generar información básica y diseñar una estrategia de conservación. El objetivo de este trabajo fue analizar de manera preliminar la diversidad genética de cuatro poblaciones de esta especie utilizando marcadores AFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados). Se emplearon dos combinaciones de iniciadores y se evaluó el porcentaje de polimorfismo así como la similitud entre los individuos. Se obtuvieron 165 loci de los cuales el 78,7 % fueron polimórficos. La población de mayor polimorfismo fue Corojito con 85,2%, de manera general el polimorfismo fue alto con valores entre 75 y 87%. La similitud entre los individuos también fue alta con un promedio de 0,74. El agrupamiento genético fue independiente a la población de procedencia, lo que sugiere que existe intercambio genético entre las poblaciones y que estas comparten más del 80% de los alelos que fueron analizados. Los resultados obtenidos son importantes para el mantenimiento *in situ* de la especie y para tomar decisiones en aras de su conservación.

**Palabras clave:** *Rhodogeron coronopifolius*, peligro de extinción, polimorfismo, conservación.

#### Abstract

*Rhodogeron coronopifolius* Griseb., is a specie of Asteraceae family, in critical danger of extinction. It is an endemic of Villa Clara city in the central region of Cuba. Its inhabits sub thorny xeromorphic heath on serpentine soil. Only five natural populations exist included in a protected area, the main threat cause is the fragmentation of its habitat for antropics activities. Due to their conservation status, it becomes necessary to analyze the genetic diversity of the natural populations in order to generate basic information usefull to apply a conservation strategy. The main goal of this work was to evaluate in a preliminary manner the genetic diversity of four populations of this specie using AFLP markers (Amplified Fragment Length Polymorphism). Two primer combinations were used and the polymorphism percentage was evaluated as well as the similarity among the individuals. A total of 165 loci were obtained of which 78,7% were polymorphic. The population with higher polymorphism was Corojito with 85,2%. High level of polymorphism was observed among population showing values between 75 and 87%. The similarity among the individuals was also high with an average of 0,74. The genetic group-

\* Empresa Nacional para la Protección de la Flora y la Fauna. Territorio Villa Clara, Cuba.

\*\* Unidad de Biotecnología. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, (CICY), México.

\*\*\* Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

ping was independent to the origin of the population. This suggesting that gene flow exists among the populations, those which share more than 80% of the alleles analyzed. This is important for the *in situ* maintenance of the specie and to take decisions for their conservation.

**Key words:** populations, *Rhodogeron coronopifolius*, threatened, endemic, fragmentation, polymorphism.

**Recibido:** junio 6 de 2012

**Aprobado:** noviembre 21 de 2012

## Introducción

El archipiélago cubano tiene una riqueza florística bien conocida, con una flora vascular de unas 6700 especies y un 51,4 % de endemismo (Borhidi y Muñoz, 1983). *Rhodogeron* es uno de los cuatro géneros monotípicos endémicos cubanos que ha sido designado por las categorías de la IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources) en peligro crítico de extinción (Peña, 1998). Dentro de este género se ubica *Rhodogeron coronopifolius* Griseb. Son plantas herbáceas, perennes y habitan en el matorral xeromorfo sub espinoso sobre serpentina (Berazaín, 2006). Solo existen cinco poblaciones naturales enmarcadas en la Reserva Florística Manejada “Sabanas de Santa Clara”, en la región Central de Cuba. Por su crítica situación de conservación es uno de los objetos focales de conservación de la reserva, donde se desarrolla un proyecto para la conservación de plantas amenazadas.

Los programas de conservación de especies amenazadas deben tener en cuenta varios aspectos como es el estado de conservación de las poblaciones naturales, cómo está estructurada desde el punto de vista demográfico, su distribución espacial, aspectos relacionados con la biología reproductiva así como la diversidad y estructura genética de sus poblaciones.

La diversidad genética de especies amenazadas y hábitats reducidos, empleando marcadores moleculares, ha sido muy estudiada en la última década (Xue-Jun *et al.*, 2005; Arens *et al.*, 2006; Shanshan *et al.*, 2006; Giulia *et al.*, 2008; Mourawer *et al.*, 2008; Sosa *et al.*, 2010; Craig *et al.*, 2011; Cunha *et al.*, 2011; Lachlan, 2011). Los marcadores son una potente herramienta para realizar estudios poblacionales porque pueden generar información necesaria para diseñar planes de conservación.

Existen diversas técnicas de marcadores moleculares pero las más empleadas en estudios de poblaciones son los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, William *et al.*, 1990); los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms, Vos *et al.*, 1995), los ISSR (Inter-simple sequence repeats, Zietkiewicz *et al.*, 1994)

y los microsatélites (SSR) (Chambers y MacAvoy, 2000). Cada uno tiene sus ventajas y desventajas y su aplicación dependerá, en última instancia, de la disponibilidad de recursos para ejecutar un sistema de marcadores moleculares dado (Coto y Cornide, 2003). Los marcadores AFLP han sido ampliamente empleados porque permiten una exploración rápida de los polimorfismos del genoma, generan un gran número de bandas por experimento, son altamente reproducibles y no se necesita información previa del genoma para su aplicación (Vos *et al.*, 1995).

En la familia Asteraceae se han realizado varios estudios de diversidad genética empleando marcadores AFLP (Haldimann, 2003; Tremetsberger, 2003, 2006; Mulatu, 2008) sin embargo en Cuba no existe ningún reporte de un estudio similar. Teniendo esto en cuenta el objetivo de este trabajo es realizar un primer acercamiento al estudio de la diversidad genética de la especie *Rhodogeron coronopifolius* empleando marcadores AFLP.

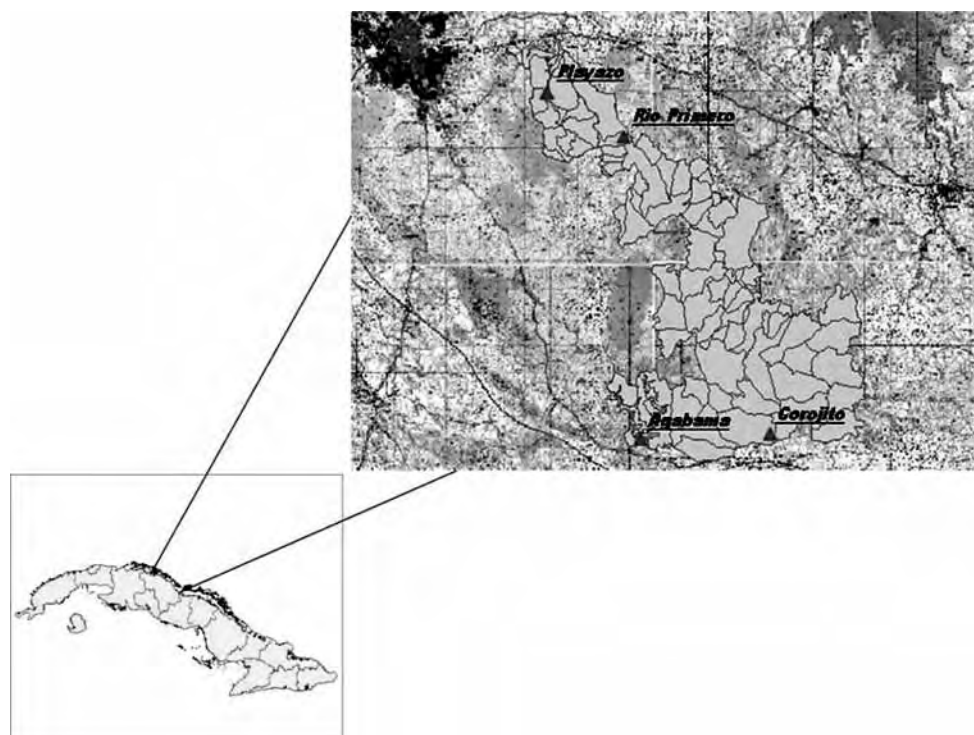
## Materiales y métodos

### Área de estudio y poblaciones empleadas

Las poblaciones de *Rhodogeron coronopifolius* se encuentran en la Reserva Florística Manejada “Sabanas de Santa Clara”, situada en el Distrito “Serpentinas de Santa Clara”, Subsector “Cuba Centro-Oriental” (Samek, 1973), a los 22° 24' 29, 22° 16' 09 de Latitud y los 79° 55' 24, 79° 47' 44 de Longitud (Hojas Cartográficas del sistema de coordenadas Cuba- Norte: Santa Clara: 4283- III- C, Falcón: 4283- III- D, Suazo: 4282- IV- B, Seibabo: 4282- IV -A) (figura 1). Inicialmente se conocían solo cuatro poblaciones de esta especie, este año hemos descubierto una nueva población pero no fue incluida en este estudio. Las coordenadas geográficas de las poblaciones empleadas se muestran en la tabla 1.

### Material vegetal

Esta especie tiene un crecimiento en forma de roseta y muy ramificado formando colonias o clones donde es



**Figura 1.** Localización geográfica de la Reserva Florística Manejada “Sabanas de Santa Clara” y las cuatro poblaciones naturales de *R. coronopifolius* empleadas en este estudio.

**Tabla 1.** Coordenadas geográficas, altitud de las poblaciones de *R. coronopifolius* empleadas y cantidad individuos analizados.

Población	Coordenadas		Altitud (msnm)	Individuos analizados
Playazo	22° 23' 18.7 N	79° 54' 49.2 W	103	4
Agabama	22° 16' 39 N	79° 52' 47 W	135	4
Corojito	22° 16' 44 N	79° 49' 55 W	188	6
Río Primero	22° 22' 27.9 N	79° 53' 07 W	126	2

imposible individualizar cada planta, por lo que para todo el estudio consideramos un individuo como una colonia. En las poblaciones naturales se colectaron 10 hojas frescas de cada individuo, las cuales se empacaron en papel de aluminio, se etiquetaron, se sumergieron en nitrógeno líquido para su traslado hacia el Instituto de Biotecnología de las Plantas de Villa Clara donde se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ADN. Para este estudio se utilizaron 16 individuos provenientes de las 4 poblaciones, cada uno corresponde a un genotipo. Un ejemplar de esta especie se encuentra depositado en el herbario UCL (serie HPVC) con el número de referencia A. Noa 4096.

#### **Extracción de ADN genómico**

Para la extracción de ADN se empleó el protocolo Khayat *et al.* (2004) con ligeras modificaciones en los volúmenes de los reactivos. A partir de 100 mg de tejido vegetal se obtuvo el macerado y se añadió 1mL de buffer de extracción (4% CTAB, 10 mM tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% PVP 10.000) a este buffer previamente se le añadió 10 mM de  $\beta$ -Mercapto EtOH (7  $\mu$ L para 10 mL) para evitar la fenolización y 3  $\mu$ L de RNAsa para eliminar fragmentos de RNA que pudieran contaminar la muestra. La mezcla se incubó a 55 °C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a

12000 rpm durante 5 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante, se añadió cloroformo-isoamilalcohol y se centrifugaron nuevamente a 12000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se añadió isopropanol frío y se dejó la reacción a -20 °C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante conservando el pellet. La pastilla de ADN se lavó con etanol absoluto al 70% y el ADN se puso a secar en la campana durante 2 horas. Las muestras fueron resuspendidas en 30 µL de agua estéril y después que se midió la integridad del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % a 90 volts durante 40 minutos se evaluó su concentración y pureza mediante espectrofotometría.

### **Análisis AFLP**

Las reacciones de AFLP fueron llevadas a cabo según el protocolo original de Vos *et al.* (1995).

*Digestión:* 500 ng de ADN fue digerido con las enzimas de restricción Mse1 (enzima de corte frecuente) y EcoR1 (enzima de corte raro). La mezcla de reacción contenía 4 U de Eco R1, 1 U de Mse1, 0,1ng/µL de BSA y 2 µL de buffer Mse4 (Biolab 10X) (50mM acetato de potasio, 20mM Tris-acetato, 10mM acetato de magnesio, 1 mM ditiotretitol) en un volumen final de 20µL con agua estéril ultra pura. Se incubó a 37 °C durante 3 horas. Después se desactivaron las enzimas en 65 °C por 15 minutos.

*Ligación:* Se ligaron los adaptadores a los sitios de restricción empleando la enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen®). La mezcla de reacción contenía 20 µL de ADN digerido, 6 µL de buffer de ligasa 5X (250mM Tris-HCl (pH 7,9), 330 mM de acetato de sodio, 5 mM ATP, 5mM DTT, 25% (p/v) polietilenglicol-800), 50 pmol y 5 pmol de adaptadores Mse1 y Eco R1 respectivamente, 1 U de enzima T4 ligasa. El volumen final fue de 30 µL. El producto de la ligación fue observado en un gel de agarosa al 1,5% a 80 volts durante 15 minutos. El DNA ligado fue diluido a 1:5 ó 1:10 en dependencia de la intensidad de las bandas.

*Screening de iniciadores:* Como es primera vez que se emplean marcadores AFLP en esta especie, se realizó un screening con nueve combinaciones de iniciadores (E-ACA/M-CTT; E-ACA/M-CAG; E-ACA/M-CTA; E-ACG/M-CTT; E-ACG/M-CAG; E-ACG/M-CTA; E-AAC/M-CTT; E-AAC/M-CAG; E-AAC/M-CTA). Estos iniciadores se probaron y teniendo en cuenta el número de bandas obtenidas y su intensidad, se seleccionaron dos para realizar este estudio (E-ACA/M-CTT y E-ACG/M-CTA). Estos iniciadores estaban marcados con un fluoróforo azul y verde respectivamente.

*Preamplificación:* La preamplificación por PCR fue llevada a cabo empleando una mezcla de reacción que contenía 5 µL de la dilución 1:5 ó 1:10 de ADN ligado, 2 µL de buffer 10X de PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8,0) y 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 20 pmol de cebadores específicos de preamplificación EcoR1 y Mse1 con un nucleótido selectivo y 0,5 U de enzima Taq Polimerasa (Invitrogen®) en un volumen final de 20 µL. El programa de PCR empleado fue: 5 minutos de desnaturalización a 94 °C, 20 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 56 °C durante 1 min, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. El producto de esta reacción fue chequeado en gel de agarosa al 1,5%. El producto de preamplificación fue diluido 1:25 ó 1:50 (en dependencia de la intensidad de las bandas del gel de agarosa).

*Amplificación Selectiva:* La reacción de amplificación contenía 5 µL de la dilución, 1 µL de buffer 10X de PCR (200 mM Tris-HCl (pH 8,0) y 500 mM KCl), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1,5 y 1 ng de cebadores específicos EcoR1 y Mse1 (E-ACA/M-CTT y E-ACG/M-CTA marcado con azul y verde respectivamente) con tres nucleótidos selectivos y 0,1 U de Taq polimerasa (Invitrogen®). El volumen final fue de 10 µL. El programa empleado para esta reacción fue: 5 min de desnaturalización a 94 °C, 12 ciclos a 94 °C por 1 min, 65 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min, 23 ciclos a 94 °C por 1 min, un gradiente de 0.5°C de temperatura desde 65 a 56 °C, 72 °C por 1 min y extensión final durante 7 min.

*Electroforesis Capilar:* Todas las reacciones de amplificación fueron reveladas mediante la electroforesis capilar en un secuenciador automático Beckman y el programa CEQ TM 8800 Genetic Analysis system. Para esto, se mezcló 1µL del producto de amplificación selectiva con 25 µL de Formamida y 0,25 µL de Rox™ Size Standard GeneSan™-500. Los electroferogramas obtenidos se analizaron con el software GeneMarker ver 1.75. Los criterios de análisis se establecieron considerando una intensidad mínima de 100 unidades de fluorescencia en un rango de 60 a 350 pb. Se eliminaron los alelos que se encontraron en menos del 20 % de las muestras. Finalmente se generó una matriz binaria asignando el valor de 1 a la presencia de un pico, y el valor de 0 a la ausencia.

### **Análisis de datos y cuantificación de fragmentos (polimorfismo)**

Se calcularon los siguientes parámetros:

1. Número de loci polimórficos (np).
2. Número de loci no polimórficos (nnp).

3. Número total de loci ( $n = np + nnp$ ).
4. Porcentaje de polimorfismo/iniciador ( $\%P = np / \text{total de loci}$ ).
5. Número de patrones de bandas identificados por combinación de oligonucleótidos ( $Tp$ ).
6. Número de patrones únicos identificados por población ( $Tpu$ ).
7. Porcentaje de alelos compartidos entre poblaciones.

Para la determinación de los loci polimórficos se estableció el criterio de que solo se considera un loci polimórfico si se encuentra en menos del 95% del total de individuos de lo contrario se considera monomórfico (Cornide *et al.*, 2002). Estos análisis se realizaron a nivel de especie, comparando ambos iniciadores y a nivel de poblaciones.

### Índice de similitud y agrupamiento

La similaridad entre individuos se obtuvo aplicando la fórmula (Nei y Li, 1979)  $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$ . Donde,  $S_{ij}$  es la similaridad entre los individuos  $i$  y  $j$ ;  $a$  es el número de loci presentes en ambos  $i$  y  $j$ ;  $b$  es el número de loci presentes en  $i$  y ausentes en  $j$ ; y  $c$  es el número de loci presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ . El dendrograma que refleja la similitud genética entre individuos se construyó a partir de la matriz de similitud generada, empleando el coeficiente DICE y agrupando los datos con el método de agrupación de pares no ponderados con medias aritméticas UPGMA por sus siglas en inglés (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average) del programa Freetree versión 0.9.1.50 y se generó un árbol con el programa Treeview versión 1.4. Adicionalmente, el dendrograma fue sometido a una prueba

tipo "bootstrap" (Efron, 1982) por medio del programa TreeView 1.6.6, dicha prueba brinda como resultado un valor relativo de "soporte" para cada agrupación obtenida en el dendrograma original. A su vez, dicho valor puede ser interpretado como la confiabilidad del mismo (Nei y Kumar, 2000). Para este estudio, se ejecutó una prueba "bootstrap" de 1000 remuestreos.

## Resultados y discusión

### Análisis de polimorfismo a nivel de especie

Se obtuvo un total de 165 loci de los cuales el 78,7% fueron polimórficos (tabla 2), esto demuestra la eficiencia de los marcadores AFLP para generar un gran número de loci, en concordancia con lo planteado por Valdés-Infante (2009).

Los porcentajes de polimorfismo obtenidos en este estudio fueron altos, con valores superiores a los reportados por Haldimann *et al.*, (2003) en un estudio de diversidad genética de *Senecio vulgaris* (Asteraceae), donde obtuvieron 328 bandas de las cuales el 33,8 % fueron polimórficas, empleando marcadores AFLP con cuatro combinaciones de iniciadores. Otro ejemplo donde se obtuvieron valores de polimorfismo inferiores a los reportados en este estudio es el realizado con *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae), donde emplearon seis combinaciones de iniciadores y solo obtuvieron 24 % de polimorfismo (Tremetsberger *et al.*, 2003).

Los altos valores de polimorfismo detectados en *R. coronopifolius* concuerdan con los obtenidos por Tremetsberger *et al.*, (2006) en el género *Hypochaeris* (Asteraceae), donde empleando 6 combinaciones de iniciadores obtuvieron 665 fragmentos de los cuales el 99,3% fueron polimórficos. Resultados similares obtu-

**Tabla 2.** Niveles de polimorfismo detectados para cada combinación de iniciadores y el total, en el análisis de 16 individuos de *R. coronopifolius*.

Índices y abreviaturas	Combinaciones de iniciadores		Total
	E-ACA/M-CTT	E-ACG/M-CTA	
Número de loci polimórficos ( $np$ )	36	94	130
Número de loci no polimórficos ( $nnp$ )	5	30	35
Número total de loci ( $n = np + nnp$ )	41	124	165
Porcentaje de polimorfismo ( $\%P$ )	87,8	75,8	78,7
Número de patrones de bandas identificados ( $Tp$ )	40	97	137

vo Mulatu *et al.*, (2008) con la especie de Asteraceae *Guizotia abyssinica* empleando marcadores AFLP y siete combinaciones de iniciadores, donde obtuvieron 89,6% de polimorfismo.

El número de patrones de banda diferentes obtenidos con los dos iniciadores fue de 137, lo cual apoya el alto grado de variabilidad que existe incluso dentro de cada loci polimórfico en los individuos analizados en el presente estudio.

### **Comparación del polimorfismo entre combinaciones de oligonucleótidos**

Al comparar las dos combinaciones de oligonucleótidos se observa que con la combinación de iniciadores E-ACG/M-CTA se obtuvo un mayor número de loci con un 75,8% de polimorfismo, sin embargo con la combi-

nación E-ACA/M-CTT aunque obtuvimos menos loci se obtuvo un mayor porcentaje de polimorfismo (tabla 2).

### **Análisis del polimorfismo entre poblaciones**

Al realizar el análisis por poblaciones (tabla 3) se observó que la población de Corojito presentó el mayor número de fragmentos y mayor porcentaje de polimorfismo. Los valores de polimorfismo en las tres poblaciones restantes fueron similares oscilando entre 40 y 47%.

En este estudio no se encontraron loci específicos para ninguna población lo cual sugiere que existe intercambio genético entre las mismas.

### **Alelos compartidos entre poblaciones.**

Se cuantificaron los alelos que compartían cada par de poblaciones lo cual resultó ser alto (tabla 4).

**Tabla 3.** Análisis de fragmentos por poblaciones.

Población	Combinación de cebadores	Fragmentos totales	Fragmentos Monomórficos	Fragmentos Polimórficos	Polimorfismo (%)
Río Primero	Total	137	81	56	40,8
	E+ACG/M+CTA	97	50	47	48,4
	E+ACA/M+CTT	40	31	9	22,5
Playazo	Total	160	91	69	43,1
	E+ACG/M+CTA	124	76	48	38,7
	E+ACA/M+CTT	41	15	26	63,4
Corojito	Total	163	24	139	85,2
	E+ACG/M+CTA	124	11	113	91,1
	E+ACA/M+CTT	39	13	26	66,6
Agabama	Total	160	90	70	47,7
	E+ACG/M+CTA	123	76	47	38,2
	E+ACA/M+CTT	37	24	13	54,1

**Tabla 4.** Porcentaje de alelos compartidos entre cada par de poblaciones de *R. coronopifolius*

	Playazo	Corojito	Agabama
Río primero	80	81,8	80
Playazo	---	96,3	95,1
Corojito	---	---	95,7

Como lo indican estos valores, el acervo genético de esta especie está muy compartido, lo cual sigue reforzando la hipótesis de que hay flujo genético entre las poblaciones.

A pesar de que no existen artículos publicados sobre la biología reproductiva de esta especie, se conoce que la dispersión de los frutos es por el viento, teniendo esto en cuenta y la corta distancia geográfica que separa las poblaciones (Montalvo *et al.*, datos no publicados) se puede explicar los altos porcentajes de alelos compartidos entre estas.

### **Similitud y agrupamiento genético entre individuos**

La matriz de similitud entre los individuos se muestra en la figura 2. El índice de similitud varió de 0,59 hasta 0,84, con un promedio de 0,74.

Realizando un análisis de la variación del índice de similitud por poblaciones (figura 3) podemos ver que los rangos de variación son similares, aunque es vá-

lido destacar que en las poblaciones de Corojito y Agabama, el rango de similitud es menor lo que indica que en estas poblaciones los individuos son mas similares entre sí.

El análisis de agrupamiento (figura 4), basado en la matriz de similitud, mostró la presencia de tres grupos. Cada grupo tiene individuos de al menos tres poblaciones por lo que no se observó un agrupamiento específico para una misma población, aunque todos los individuos de la población de corojito se agruparon en la misma rama pero esto puede deberse al poco número de individuos que se pudieron analizar.

Este agrupamiento corrobora que el acervo genético está muy compartido. Esto puede deberse a que la dispersión de esta especie es por anemocoria (por el viento) una de las vías de dispersión de mayor eficiencia y a la corta distancia geográfica que separa las poblaciones (Montalvo *et al.*, datos no publicados).

	10	23	31	32	40	47	49	53	55	64	66	74	101	104	94
10															
23	0.75														
31	0.634	0.709													
32	0.598	0.61	0.825												
40	0.817	0.735	0.614	0.604											
47	0.67	0.664	0.819	0.776	0.642										
48	0.734	0.702	0.737	0.695	0.71	0.778									
53	0.708	0.746	0.81	0.732	0.711	0.808	0.795								
55	0.686	0.681	0.803	0.726	0.643	0.849	0.797	0.786							
64	0.696	0.682	0.795	0.73	0.66	0.81	0.771	0.777	0.803						
66	0.707	0.711	0.771	0.723	0.691	0.778	0.815	0.819	0.789	0.822					
74	0.726	0.67	0.762	0.679	0.684	0.794	0.789	0.817	0.819	0.844	0.821				
101	0.655	0.658	0.852	0.773	0.626	0.798	0.733	0.774	0.759	0.739	0.741	0.708			
104	0.77	0.784	0.695	0.657	0.804	0.737	0.783	0.78	0.726	0.764	0.723	0.749	0.681		
94	0.76	0.774	0.737	0.683	0.708	0.771	0.791	0.763	0.741	0.763	0.73	0.723	0.714	0.811	
97	0.759	0.764	0.655	0.66	0.755	0.699	0.773	0.729	0.689	0.744	0.756	0.712	0.667	0.784	0.82

**Figura 2.** Matriz de similitud entre los individuos obtenida en base a la fórmula de Nei y Li (1979).

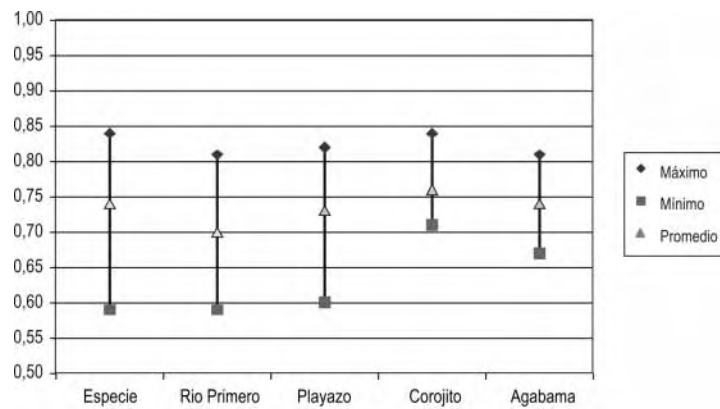


Figura 3. Variación del índice de similitud en las cuatro poblaciones y a nivel de especie.

### Conclusiones

A pesar de la crítica situación de conservación y la fragmentación del hábitat de *R. coronopifolius*, los resultados obtenidos demuestran que las poblaciones de esta especie tienen un alto polimorfismo.

Los marcadores AFLP resultaron ser eficientes ya que con solo dos combinaciones de iniciadores, se logró detectar un alto porcentaje de polimorfismo similar a

los obtenidos por otros autores, empleando de 4 a 7 combinaciones de oligonucleótidos.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se puede inferir que existe flujo genético entre las poblaciones, lo cual es muy importante para diseñar una estrategia de conservación y contribuir al mantenimiento *in situ* de la especie.

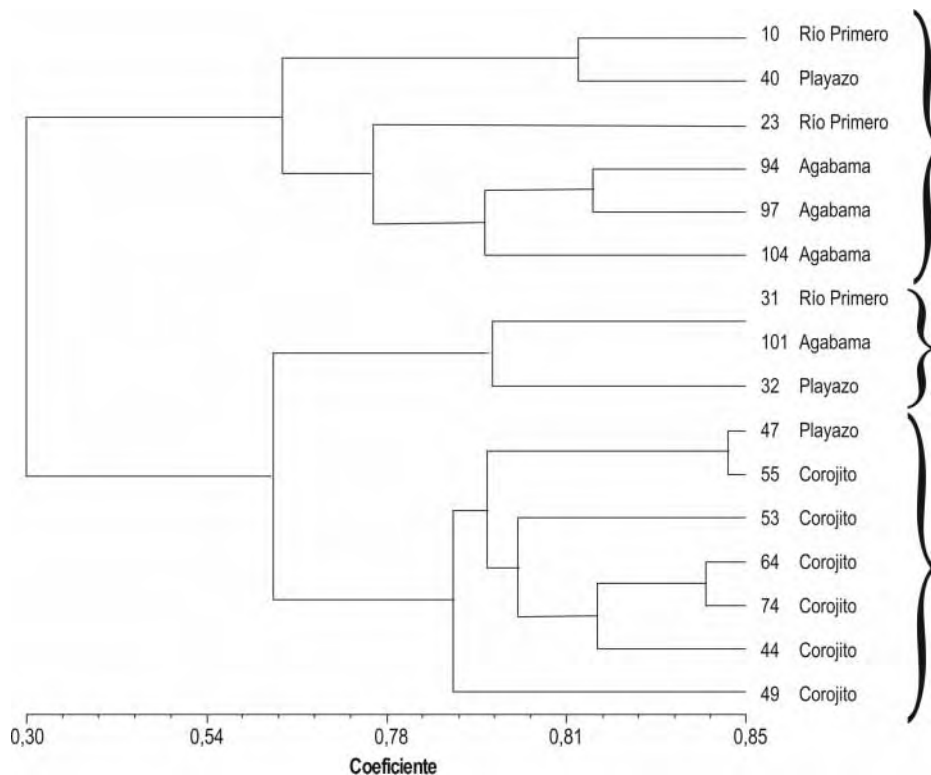


Figura 4. Agrupamiento de los individuos de cuatro poblaciones de *R. coronopifolius* empleando el índice de similitud (Nei y Li, 1979) y el coeficiente DICE, agrupando los datos con el método de agrupación de pares no ponderados con medias aritméticas UPGMA.



## Recomendaciones

Teniendo en cuenta que en ocasiones los marcadores AFLP no se recomiendan para realizar estudios de diversidad genética, por su naturaleza dominante, consideramos oportuno realizar un estudio más exhaustivo de la diversidad genética de esta especie. Para esto proponemos emplear un marcador molecular de naturaleza codominante como los microsatélites (SSR). Con estos marcadores es posible diferenciar entre individuos homocigóticos y heterocigóticos con lo cual se obtiene una medida más certera de heterocigosidad en las poblaciones y adicionalmente cuantificar el flujo genético y corroborar las inferencias hechas en este estudio. También recomendamos muestrear las cinco poblaciones y un mayor número de individuos.

## Agradecimientos

Esta publicación es un producto científico del programa de beca del Food Security Center de la University of Hohenheim, la cual es parte del programa de la DAAD (German Academic Exchange Service) y es financiada por DAAD y la German Federal Ministry for Economic Cooperation and Development (BMZ). Además, este artículo es producto de la colaboración con la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY), México, donde se desarrolló esta investigación. Agradecemos también al MSc. Víctor Manuel de Jesús Canché Ke por su ayuda con los programas estadísticos.

## Bibliografía

- Arens, P., Bugter, R., Van't Westende, W., Zollinger, R., Stronks, J., Vos, C., Marinus J. M. 2006. Microsatellite variation and population structure of a recovering Tree frog (*Hyla arborea* L.) metapopulation. *Conservation Genetics*. 7:825-834.
- Berazaín, R. 2006. Comentarios sobre los géneros endémicos cubanos. *Revista del Botánico Nacional*. 27: 23-31.
- Borhidi, A; Muñiz, O. 1983. Catálogo de plantas cubanas amenazadas o extinguidas. Editorial Academia, Havana. 85 pp.
- Chambers, G. K., MacAvoy, E. S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative biochemistry and Physiology Part B*. 126:455-470.
- Cornide, T. 2002. Marcadores Moleculares. Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección de Plantas. La Habana: Editorial Félix Varela, p 130.
- Coto, O; Cornide, M. T. 2003. Marcadores moleculares. Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana: Felix Varela. p. 92-11
- Craig, S., Echt, D. D., Gustafson, Danny. 2011. Patterns of differentiation among endangered pondberry populations. *Conservation Genetics*. 12:1015-1026.
- Cunha, L., Acacio, R., Bernadete, M. 2011. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. *Genetica*. 139:1159-1168.
- Efron, B. 1982. The Jackknife, the Bootstrap and other resampling plans. Regional Conference in Applied Mathematics. Philadelphia: CBMF-NSF.
- Haldimann, P., Steinger, T., Muller-Scharer, H. 2003. Low genetic differentiation among seasonal cohorts in *Senecio vulgaris* as revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Molecular Ecology*. 12: 2541-2551.
- Khayat, E., Duvdevani, A., Lahav, E., Ballesteros, B. A. 2004. Somaclonal variation in Banana (*Musa acuminata* cv *Gran Naine*). Genetic mechanism, frequency, and applications as a tool for clonal selection. In Banana improvement: Cellular, Molecular-Biology, and Induced Mutations, ed. S.M: Jain and R. Swennen. Science Publisher Inc., Plymouth, UK. Pp. 97-109.
- Lachlan, W. 2011. Microsatellite markers for the threatened Australian freshwater fish, Macquarie Perch (*Macquaria australasica*). *Conservation Genetics Resources*. 4(2): 235-237.
- Mameli, G., Filigheddu, R., Binelli, G., Meloni M. 2008. The Genetic Structure of the Remnant Populations of *Centaurea horrida* in Sardinia and Associated Islands. *Annals of Botany*. 101: 633-640.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetics (TFPGA) 1.3: a Windows Program for the Analysis of Allozymes and Molecular Population Genetic Data. Computer Software Distributed by the Author.
- Mounawer, B., Zitoun, A., Soula, S., Houcine, I., Huguet, T., Elarbi M. 2008. Low levels of quantitative and molecular genetics differentiation among natural populations of *Medicago ciliaris* Kroch. (Fabaceae) of different Tunisian eco-geographical origin. *Conserv Genet*. 9:1509-1520.
- Mulatu, G., Bryngelsson, T., Endashaw, B., Kifle, D. 2008. Assessment of genetic diversity of *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass. (Asteraceae) from Ethiopia using amplified fragment length Polymorphism. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 6(1): 41-51.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press.
- Nei, M.; Li, W-H. 1979. Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science*. 76 (10): 5269-5273.
- Peña, E., López, P. I., Lazcano, J., Leiva, A., Seal, T., (U. S. Editors). 1998. "Memorias del Primer Taller para la Conservación y Manejo Planificado de Plantas Silvestres Cubanas, 13-15 de abril. UICN/SSC. Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, Ciudad de La Habana. Cuba.
- Samek, V. 1973. Regiones Fitogeográficas de Cuba, Serie Forestal. N° 15, La Habana. 63 pp.
- Shanshan, L., Tzen-Yuh, Ch., Xun G. 2006. High Genetic Diversity vs. Low Genetic Differentiation in *Noouelia insignis* (Asteraceae), a Narrowly Distributed and Endemic Species in China, Revealed by ISSR ingeprinting. *Annals of Botany*. 98: 583-589.

- Sosa, P.A., Gonzalez, M, A., Moreno, C., Clarke, J. B. 2010. Conservation genetics of the endangered endemic *Sambucus palmeris* Link (Sambucaceae) from the Canary Islands. *Conservation Genetics*. 11:2357–2368.
- Tremetsberger, K., Tod, F., Stuessy, G. K., Urtubey, E., Baeza, C. M. Beck, S. G., Valdebenito, H. A., Ruas, C., Matzenbacher, N. I. 2006. AFLP Phylogeny of South American Species of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Systematic Botany*. 31(3): 610–626.
- Tremetsberger, K., Tod, F., Stuessy, Y.P. G., Baeza, C. M., Weiss, Hanna., Rosabelle M. S. 2003. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochoeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. *Population Biology*. Taxon 52: 237-245.
- Valdes-Infante, J. 2009. Utilización de caracteres morfo-agronómicos y de marcadores de ADN para el desarrollo de una metodología que contribuya al mejoramiento genético del guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología, UH. 110 p.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407–4414.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Xue-Jun, G., Xian-Long, Z., Zhong-Chao, L., Tsai-Wen, H., Schaal, B. A., Tzen-Yuh, Ch. 2005. Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting. *Journal Plants Resources*. 118:415–422.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, Y D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reactions amplification. *Genomics*. 20: 176-183.