



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**DIFERENCIACIÓN GENÓMICA DE SEMILLAS Y CLADODIOS
DE *OPUNTIA* SPP., Y SU POSIBLE USO PARA
DIFERENCIACIÓN**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

ARTURO LUNA PAEZ

ABRIL DE 2008

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



**DIFERENCIACIÓN GENÓMICA DE SEMILLAS Y CLADODIOS DE *Opuntia*
spp., Y SU POSIBLE USO PARA DIFERENCIACIÓN**

Tesis realizada por **Arturo Luna Paez** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener
el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESIDENTE:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DR. ALEJANDRO F. BARRIENTOS PRIEGO

ASESOR:



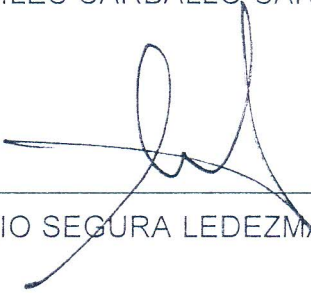
DR. CLEMENTE GALLEGOS VAZQUEZ

ASESOR:



DR. AQUILES CARBALLO CARBALLO

LECTOR EXTERNO:



DR. SEGIO SEGURA LEDEZMA

Ten cuidado de las cosas de la tierra,
haz algo, corta leña, labra la tierra,
planta nopales, planta magueyes.

Tendrás que beber, que comer, que
vestir, con eso estarás en pie, serás
verdadero, con eso andarás.

Con eso se hablará de ti, se te alabará,
con eso te darás a conocer.

Huehuetlatolli



DEDICATORIA

A mis padres

Plácido Luna Palma por su amor y su comprensión

Gloria Paez Belmonte por su cariño incondicional y cuidados siempre presentes en mí andar.

A mis hijos **Isaac Nahúm** y **Josué Fabricio** por su cariño puro y amor desinteresado.

A la mamá de mis hijos **Maricarmen** por su valioso apoyo durante la realización y en la culminación de este trabajo.

A la más pequeña de mis sobrinas **Sharon Alexia** por su cariño incondicional.

Con amor a mis demás familiares, en correspondencia a sus atenciones y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al **CONACYT** por el financiamiento otorgado para la realización de los estudios de Doctor en Ciencias.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por la oportunidad brindada para realizar los estudios de Doctor en Ciencias.

Al **Instituto de Horticultura** que me ha ofrecido la formación académica y profesional de excelencia.

A la **Red Nopal** por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. **Ernestina Valadez Moctezuma** por la acertada conducción de este trabajo, por su apoyo constante, su comprensión y amistad.

Al Dr. **Alejandro F. Barrientos Priego** por su disposición para asesorarme, además de su apoyo amistad.

Al Dr. **Clemente Gallegos Vázquez** por su disposición para asesorarme, además de su apoyo y amistad.

Al. Dr. **Aquiles Carballo Carballo** por su participación y sugerencias durante la realización de este trabajo.

A la planta académica de Instituto de Horticultura, que compartieron su conocimientos facilitando mi formación académica.

A todas las personas, que por evitar omitir alguno no menciono nombres, pero que de una u otra manera contribuyeron a llevar a buen fin este trabajo.

DATOS BIOGRAFICOS

Arturo Luna Paez nació el 15 de diciembre de 1974 en Chimalhuacán, Estado de México. Su vida académica comenzó en ese municipio y prosiguió la educación básica en Celaya, Guanajuato. Ingresó a la educación media básica en su lugar de origen, la educación media superior la continuó en el Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Oriente, UNAM.

La educación superior la realizó de 1994-1998 en el Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia.

Durante el periodo 2000-2002 realizó sus estudios de Maestro en Ciencias en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Ingresó al Instituto de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo, en el año 2003 y obtuvo el grado de Doctor en Ciencias en Horticultura en el año 2008. Colaboró en diversos proyectos de investigación en el laboratorio de biología molecular desde el año 2000 al 2007, y ha escrito a la fecha tres artículos científicos de los cuales dos han sido aceptados para publicación. Además fué RA I Asociado de Investigación Patología en PHI, Servicios, S. A. de C. V. Actualmente se desempeña como "Testing Manager" en el programa de Bajío para mejoramiento de maíz, Monsanto Producción y Servicios S. A. de C. V.

RESUMEN

ANÁLISIS GENÓMICO DE SEMILLAS Y CLADODIOS DE *OPUNTIA* SPP Y SU POSIBLE USO PARA DIFERENCIACIÓN

Arturo Luna Paez, Doctor en Ciencias en Horticultura. Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Bajo la dirección de Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

México se considera uno de los centros de origen y dispersión del género *Opuntia*, debido al gran número de especies que habitan en el país. Con el objetivo de conocer esta diversidad, en el presente trabajo se estimó la variabilidad y diversidad genómica de este género mediante las técnicas RAPDs e ISSRs. Para ello se consideraron 52 variedades de 11 especies de *Opuntia*. El DNA se extrajo mediante el método de CTAB tanto de cladodios como de semillas. El DNA obtenido de cladodio presentó una cantidad excesiva de mucílago que interfirió con la amplificación de los fragmentos mediante PCR, por lo que se extrajo DNA de semilla; estas muestras carecieron de estos metabolitos y facilitaron las amplificaciones respectivas. La similitud genética se estimó mediante el coeficiente de Jaccard y para la aglomeración se utilizó el método Neighbor-joining. Para realizar el árbol consenso se utilizó el programa FreeTree; considerando el método de remuestreo bootstrapping con 1000 repeticiones, el árbol consenso se visualizó con el programa Tree View. Con los resultados obtenidos se conformaron diferentes grupos con cada una de las técnicas de análisis. Con esta información fue posible corroborar la variabilidad intraespecífica y la diversidad interespecífica de las 11 especies estudiadas. Esta diversidad y variabilidad sugieren que todas las variedades estudiadas son diferentes a nivel de genoma. También se observó que algunas especies están muy relacionadas entre sí, como es el caso de *O. ficus-indica*, *O. albicarpa* y *O. megacantha*. Así mismo, se aprecia que a nivel intraespecífico las especies *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* presentan alta variabilidad.

Palabras clave. Nopal, variabilidad, caracterización, DNA, marcadores moleculares, RAPDs, ISSRs, análisis multivariados.

ABSTRACT

GENOMIC ANALYSIS OF SEEDS AND CLADODES OF *OPUNTIA* SPP AND ITS POSSIBLE USE FOR DIFFERENTIATION

Arturo Luna Paez, Doctor en Ciencias en Horticultura. Instituto de
Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Directed by Dr. Ernestina Valadez Moctezuma.

Mexico is considered one of the centers of origin and dispersion of the genus *Opuntia* because of the large number of species found in the country. In order to know this diversity at the genomic level, the present work estimated both genetic variability and diversity of the genus by RAPDs and ISSRs techniques. To do so, 52 varieties of 11 species of *Opuntia* genus were considered. The DNA of both cladodes (pads) and seeds was extracted by CTAB method. The DNA obtained from the cladode presented an excessive amount of mucilage. This interfered with the amplification of the fragments by PCR, so DNA was extracted from the seed samples that lacked these metabolites and facilitated the respective amplifications. The genetic similarity was estimated using the Jaccard Coefficient, and for clustering Neighbor-joining method was used. To make the consensus tree, FreeTree software was used, considering 1000 resampling of bootstrapping; the obtained consensus tree was visualized using the Tree View software. With the results obtained different groups were formed with each one of the analysis techniques. With the generated molecular information, it was possible to corroborate the intra-specific variability and the inter-specific diversity of the 11 species studied from the genus. Both diversity and variability suggest that all the studied varieties are different at the genome level. It was also observed that some of the species are closely related, as shown by the case of *O. ficus-indica*, *O. albicarpa* and *O. megacantha*. In the same way, it was observed that at the intra-specific level, the species *O. ficus-indica* and *O. albicarpa* present high variability.

Keywords: Prickly pear cacti, variability, characterization, DNA, molecular markers, RAPDs, ISSRs, multivariate analysis.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
 CAPITULO 1. Introducción	 1
Introducción	1
Objetivos generales	4
Hipótesis	5
Etapas del trabajo	5
Literatura citada	6
 CAPITULO 2. Revisión de literatura	 10
Revisión de literatura	10
Origen y distribución geográfica	10
Propósitos y usos de <i>Opuntia</i> spp	11
Descripción morfológica de <i>Opuntia</i>	13
Clasificación taxonómica de <i>opuntia</i>	22
Descripción de especies estudiadas	26
Caracterización de <i>Opuntia</i>	31
Caracterización con base en su morfología	31
Caracterización mediante marcadores moleculares	33
Literatura citada	36
 CAPITULO 3. Optimización de las condiciones electroforéticas para análisis de fragmentos RAPDs de variedades de <i>Opuntia</i> spp.	 41
Resumen	41
Abstract	42
Introducción	43
Materiales y métodos	45
Extracción de DNA genómico	47
Separación de productos	48
Resultados y discusión	50
Conclusiones	58
Literatura citada	58
 CAPÍTULO 4. Análisis del DNA de semillas de <i>Opuntia</i> spp con marcadores RAPDs e ISSRs y su posible uso para diferenciación	 62
Resumen	62
Abstract	64
Introducción	66
Materiales y métodos	70

Material vegetal	70
Aislamiento de DNA	71
Amplificación con PCR y electroforesis	72
Toma de datos y análisis	74
Resultados y discusión	76
Conclusiones	89
Literatura citada	90
 CAPITULO 5. Estimación de la variación genética y diversidad de <i>Opuntia</i> spp detectada en semillas con polimorfismos RAPDs e ISSRs	
Resumen	95
Abstract	96
Introducción	97
Materiales y métodos	103
Material vegetal	103
Aislamiento de DNA genómico y cuantificación	105
PCR y electroforesis	106
Registro de datos y análisis	108
Resultados y discusión	108
Conclusiones	120
Literatura citada	122
 Discusión general	 126

INDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 2

Cuadro 2.1 Clasificación taxonómica de *Opuntia* spp 23

Cuadro 2.2 Ubicación por especies de las variedades consideradas en este estudio 24

CAPÍTULO 3

Cuadro 3.1 Acciones de *Opuntia* spp incluidas en este estudio 45

CAPÍTULO 4

Cuadro 4.1 Variedades de *Opuntia* spp analizadas con RAPDs e ISSRs 70

Cuadro 4.2 Mezcla de reacción, concentración inicial, concentración final y volumen final, cantidades para una muestra 73

Cuadro 4.3 Iniciadores RAPDs e ISSRs utilizados para el análisis de genotipos de *Opuntia* spp 78

Cuadro 4.4 Eigenvalores y la contribución en porcentaje derivado del análisis de correspondencia de 22 acciones de *Opuntia* spp utilizando marcadores RAPDs e ISSRs 86

CAPÍTULO 5

Cuadro 5.1 Acciones de *Opuntia* spp incluidas en el estudio 103

Cuadro 5.2 Iniciadores RAPDs e ISSRs utilizados para el análisis de genotipos de *Opuntia* spp 107

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Formas de cladodios de diferentes especies del género <i>Opuntia</i>	14
Figura 2.2 Variación de formas y colores del fruto de algunas variedades de nopal	19
Figura 2.3 Morfología externa de semillas del género <i>Opuntia</i> spp	21
Figura 2.4 Morfología del embrión de una semilla de nopal <i>Opuntia</i> spp	22

CAPÍTULO 3

Figura 3.1 Gel de agarosa 1%, muestra la calidad del DNA, M: marcador de 1 kb DNA Ladder de Promega, carril 1 - 24 DNA de 24 muestras nopal	50
Figura 3.2 Perfil electroforético de DNA genómico de <i>Opuntia</i> spp generado con el iniciador RAPDs Carl Roth K-17 separado en agarosa (panel A) y en poliacrilamida (panel B). Carril M corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb DNA Ladder de Promega. Las flechas blancas señalan algunos polimorfismos claramente detectados	51
Figura 3.3 Agrupamiento RAPDs de fragmentos separados en agarosa de 50 variedades de <i>Opuntia</i> spp obtenido con el coeficiente DICE y el análisis de agrupamiento SAHN	54
Figura 3.4 Agrupamiento RAPDs de fragmentos separados en poliacrilamida de 50 variedades de <i>Opuntia</i> spp obtenido con el coeficiente DICE y el análisis de agrupamiento SAHN	56

CAPÍTULO 4

Figura 4.1 Gel de agarosa 1% donde se muestra la calidad e integridad del DNA de alto peso molecular de las 22 variedades estudiadas; se observa una banda compacta en la parte superior del gel (ver flechas). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de fermentas	76
Figura 4.2 Arbol consenso conformado con datos RAPDs (A) de 22 variedades de nopal (<i>Opuntia</i> spp). Agrupamiento realizado con el coeficiente Jaccard y el método Neighbor-Joining con 1000 remuestreos	79
Figura 4.3 Arbol consenso conformado con datos ISSRs (B) de 22 variedades de nopal (<i>Opuntia</i> spp). Agrupamiento realizado con el coeficiente Jaccard y el método Neighbor-Joining con 1000 remuestreos	80

Figura 4.4 Arbol consenso obtenido con los datos conjuntos de RAPDs e ISSRs de 22 variedades de <i>Opuntia</i> utilizando el coeficiente Jaccard y el método de agrupamiento Neighbor-Joining con 1000 remuestreos	84
Figura 4.5 Proyección de 22 accesiones de <i>Opuntia</i> spp generado con tres factores obtenido por análisis de correspondencias simples, utilizando marcadores RAPDs e ISSRs	87
Figura 4.6 Perfiles RAPDs detectados con 5 iniciadores en la variedad 'Burrona' (<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar). Repeticiones A, B y C de semillas de plantas independientes. (Mix: mezcla de semillas de las plantas A, B y C). Carril M corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb de fermentas. Las flechas señalan algunos polimorfismos detectados entre repeticiones	88
CAPÍTULO 5	
Figura 5.1 Arbol consenso generado a partir de información RAPDs	111
Figura 5.2 Arbol consenso generado con información de datos ISSRs	113
Figura 5.3 Arbol consenso obtenido con información conjunta de datos RAPDs e ISSRs	118

CAPITULO 1

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Todos los seres vivos han divergido por descendencia directa a partir de un origen único y con el paso del tiempo, el cambio en las frecuencias génicas de las poblaciones produce nuevas especies a lo largo de generaciones. Charles Darwin denominó este fenómeno descendencia con modificación, un proceso lento que suele obrar a lo largo de cientos, miles y hasta millones de años (Milner, 1995). En la actualidad este proceso continúa complicando el trabajo de los taxónomos de plantas, ya que existen grupos de seres vivos que presentan mayor grado de dificultad para clasificarlos adecuadamente, y la familia de las cactáceas es un grupo de plantas que por sus características intrínsecas representa un trabajo tortuoso para quienes se dedican a su taxonomía (Rebman y Pinkava, 2001).

La familia cactaceae constituye un grupo de plantas que algunos autores consideran está en proceso de diferenciación, por lo cual su clasificación se ha vuelto complicada. La amplia variación que se percibe responde a mutaciones, hibridación natural, poliploidias, apomixis, variación clonal, aislamiento geográfico, así como la domesticación (Scheinvar, 1995; Pimienta y Muñoz, 1995; Reyes *et al.*, 2005).

México es un país megadiverso en virtud de la biodiversidad que posee y las plantas cactáceas son un grupo que bien representa esa cualidad; ya que se estima en más de 900 especies el acervo, de las cuales se reporta ampliamente

su uso con diferentes fines desde tiempos prehispánicos, aunque para el caso específico del género *Opuntia* su utilización puede remontarse desde 7000 o 9000 a. C. (Heiser, 1981; Nobel, 1998).

Es probable que el aprovechamiento del nopal, como se le llama en general a todo el género, haya tenido un papel importante en el proceso de sedentarización de los antiguos pobladores del continente americano de donde es originario y en especial de México, encontrándose un estrecho vínculo con el desarrollo de las culturas prehispánicas sustentado no solo por fuentes históricas, sino por evidencias arqueológicas que apoyan la teoría del uso de cladodios tiernos y tunas como alimento o como remedios caseros; además del enfoque mágico-religioso entre el pueblo mexicana, ya que según la mitología fue de gran importancia al asociar su lugar de asentamiento con un nopal, aunado al hecho de nombrar su gran ciudad como Tenochtitlan que se puede traducir como lugar de tunas (Bravo, 1978; Griffiths, 2004; Gallegos *et al.*, 2005).

El género *Opuntia* es originario de América y se encuentra ampliamente distribuido en todo el continente, desde los 59° al norte en Canadá y hasta 52° al sur en Argentina, en altitudes por debajo del nivel del mar en California, o por arriba de 4700 msnm en Perú. Sin embargo es México uno de los centros de origen y dispersión donde encuentra la mayor diversidad genética a nivel intra e interespecífico (Bravo, 1978; Nobel 1988; Gallegos y Méndez, 2000).

Esta riqueza genética debe ser considerada primordial entre el patrimonio, y demandar la atención en su conservación, mejoramiento y usos haciendo con ello un factor activo del desarrollo, por lo cual los países con amplia

biodiversidad deben conservar esos recursos a manera de bancos de germoplasma (León, 1978).

En México los intentos de organizar y clasificar al nopal se remonta a la época prehispánica en donde se ya se habían establecido dos grupos bien definidos, el grupo Comitl, donde se incluyeron las plantas de tallos cilíndricos y esferoides y el grupo Nopalli donde se encontraban las especies con tallos articulados, discoides y aplanados. Las diferentes clases se distinguían añadiendo a la palabra Nochtli uno o más términos precisando sus cualidades morfológicas (Granados y Castañeda, 1991).

Esta tendencia se siguió hasta la época de Carl Von Linneo que en 1735 presentó su propuesta de clasificación binomial, la cual se apoyaba en relaciones existentes entre los organismos por sus cualidades y características. Durante los siguientes dos siglos la taxonomía se basó en este sistema y fue hasta el siglo XX cuando se tomaron en cuenta aspectos bioquímicos, fisiológicos y citogenéticos. Más recientemente con en el estudio de los ácidos nucleicos, se han sugerido modificaciones a la clasificación (Wang *et al.*, 1998; García *et al.*, 2003).

Varias son las técnicas de la biología molecular empleadas para generar marcadores moleculares, aunque son cuatro las más utilizadas. Una es la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos del DNA (RAPDs por sus siglas en inglés), utilizada por sus bondades de manejo, costos, capacidad informativa en cuanto a identificación de genotipos, estimación de la diversidad

genética y análisis filogenéticos (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Iruela *et al.*, 2002).

Otra técnica es la que se utiliza para detectar inter secuencias simples repetidas (ISSRs por sus siglas en inglés) que además de presentar las bondades de los RAPDs, manifiestan mayor cantidad de polimorfismos por iniciador utilizado; además, son más específicas que los RAPDs ya que amplifican secuencias conservadas. Otras dos técnicas son la amplificación de fragmentos de longitud polimórfica (AFLPs) y secuencias simples repetidas (SSRs) que representan ventajas pero también desventajas, entre las cuales se encuentra su alto costo, así como de iniciadores que demandan el conocimiento previo de las secuencias que van a amplificar (Valadez y Kahl, 2000).

Con fundamento en todo lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la variabilidad genotípica y la estimación de la relación genética entre especies y accesiones de *Opuntia* spp., obtenidas del banco de germoplasma CRUCEN-UACH utilizando las técnicas de ISSRs y RAPDs, postulándose los siguientes:

1.2 OBJETIVOS GENERALES

1.2.1 Caracterizar diferentes variedades de *Opuntia* spp con RAPDs e ISSRs.

1.2.2 Diferenciar inter e intra específicamente variedades de *Opuntia* spp con huellas de DNA.

1.2.3 Establecer grupos de *Opuntia* spp con base en similitudes y diferencias de su genoma evidenciado por huellas de DNA.

1.3 HIPOTESIS

Ho: El análisis mediante huellas tipo RAPDs e ISSRs permitirá la caracterización de accesiones de *Opuntia* así como inferir sobre la relación inter e intraespecífica con base en la similitud de su genoma.

Ha: El análisis mediante huellas tipo RAPDs e ISSRs no permitirá la caracterización de accesiones de *Opuntia* así como inferir sobre la relación inter e intraespecífica con base en la similitud de su genoma.

1.4 Etapas del trabajo.

1.4.1 Los resultados de la investigación se reportan en este escrito a manera de artículos científicos, uno de ellos se transcribió de acuerdo a la versión aceptada para su publicación (capítulo 4). Los capítulos 3 y 5 están escritos con el formato como serán enviados para su posible publicación.

1.4.2 El trabajo consistió de 4 etapas, en la primera se consideró un marco teórico con información acerca del género *Opuntia*, tomando en cuenta la clasificación y taxonomía que guarda actualmente, así como la descripción de algunas especies utilizadas.

1.4.3 Posteriormente se llevó a cabo en laboratorio la estandarización del protocolo de extracción del DNA genómico, en donde se realizaron varias modificaciones a los reportes anteriores acerca del método de extracción CTAB. Aquí se incluyó la evaluación de concentraciones de reactivos así como inclusión o exclusión de otros. Además se contempló utilizar material genómico

proveniente de semilla y no tejido de cladodio para minimizar la presencia de mucílago. Con todas estas modificaciones el DNA se obtuvo en cantidad y calidad suficiente para llevar a cabo los análisis moleculares.

1.4.4 Enseguida se adecuó el sistema de separación por electroforesis de los productos amplificados. Analizando las ventajas y desventajas del sistema de separación en geles de agarosa respecto al de geles de poliacrilamida.

1.4.5 En otra etapa se llevó a cabo la generación de huellas genómicas mediante ISSRs y RAPDs de las accesiones consideradas en este análisis. Se realizaron análisis multivariados que agruparon por similitudes genéticas a las accesiones en estudio, pero además, permitieron estimar su variabilidad genotípica y determinar las relaciones inter e intraespecíficas.

1.5 LITERATURA CITADA

Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Vol 1. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 743 p.

Fernández, M., A. Figueiras and C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104 (5): 845-851.

Gallegos V., C. y S. de J. Méndez G. 2000. La tuna: criterios y técnicas para su producción comercial. Universidad Autónoma Chapingo – Colegio de Postgraduados – Fundación Produce Zacatecas, A.C. Chapingo, Edo. de Méx. 164 p.

Gallegos, V. C.; J. Cervantes H. y A. F. Barrientos P. 2005. Manual Gráfico para la descripción varietal del nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca (SNICS-SAGARPA) y Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Tlalnepantla, Edo. de México, México. 116 p.

García Z., E. A., G. E. García S., E. Cárdenas C., R. E. Vázquez A., F. Zavala G. y A. Gutiérrez D. 2003. Clasificación y estimación de la diversidad genética de nopal (*Opuntia* spp.) en base a descriptores fenotípicos y marcadores genético moleculares. En: G. Esparza F., M. A. Salas L., J. Mena C. y R. d. Valdez C. Memorias del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre el Cocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Zacatecas, Zac. pp 95-100.

Granados S., A. y A. D. Castañeda P. 1991. El Nopal. Historia, Fisiología, Genética e Importancia Frutícola. Editorial Trillas. D. F., México. 227 p.

Griffiths, P. M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany (91): 1911-1921.

Heiser, Ch. B. 1981. Seed to civilization, the history of food. Second edition. W. H. Freeman and Company. San Francisco, U.S.A. 243 p.

Iruela, M., J. Rubio, J. I. Cubero, J. Gil and T. Millán. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104 (4): 643-651.

- 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 69-72.
- Milner, R. 1995. Diccionario de la evolución. VOX. BIBLIOGRAF. Barcelona, España. 684 pp.
- Nobel, P. S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. USA. 270 p.
- Nobel, S.P.1998. Los incomparables agaves y cactus. Trillas. México, D.F. 213 p.
- Pimienta, B. E., A. Muñoz U. 1995. Domestications of opuntias and cultivated varieties. In: Barbera, G., P. Inglese, E. Pimienta B. (eds). Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO. Plant Production and Protection Paper 132. Rome, Italy. pp 58-61.
- Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath, 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. Genome 44 (5): 763-772.
- Rebman, J. P. y D. J. Pinkava. 2001. *Opuntia* cacti of North America-An Overview. Florida Entomologist. 84 (4) 474-483.
- Reyes, A. J. A., J. R. Aguirre R., y J. L. Flores F. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. Interciencia 30 (8): 476-484.

Scheinvar, L. 1995. Taxonomy of utilized *Opuntias*. *In*: Barbera, G., P. Inglese, E. Pimienta-Barrios (eds). Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO. Plant Production and Protection Paper 132. Rome pp 20-27.

Valadez M., E. y G. Kahl. 2000. Huellas genómicas de ADN de plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. México, D. F. 147 p.

Wang, X., P. Felker, D. M. Burow and H. A. Paterson. 1998. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. Journal of the Professional Association for Cactus Development 3: 3-14.

CAPITULO 2

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución geográfica

Mauseth (1991) citado por Muñoz, 2004 propone que la familia cactaceae se originó hace 90 o 100 millones de años y la diseminación de esta se llevó a cabo cuando se separó América del sur y África hace 20 ó 30 millones de años atrás. Esta familia se supone emparentada con la familia Aizoaceae y Portulacaceae, esta última la más antigua (Cota y Wallace, 1996).

Las diversas especies de la familia cactaceae se encuentran distribuidas sobre todo en regiones áridas y semiáridas, es en estas zonas donde se encuentra la mayor variabilidad, sin embargo existen muchas especies que se desarrollan y adaptan a diferentes condiciones agroclimáticas (Pimienta, 1990). De manera particular las especies del género *Opuntia* son originarias del norte del continente americano y se encuentran algunas en el Ecuador y Perú, pero de acuerdo con Bravo, (1978) es en México donde se encuentra la mayor diversidad genética, indicando que existen aproximadamente 74 especies para el género *Opuntia*, por lo cual se ha considerado como uno de los dos centros de origen y dispersión del género (Gallegos y Méndez, 2000).

El género *Opuntia* mantiene dos centros de origen y diversificación, uno es el norte y el otro es el sur del continente americano. Desafortunadamente no se reportan restos fósiles con los que se puedan fechar exactamente el lugar y época cuando se originaron (Bravo, 1978; Flores y Yeaton, 2000). Sin embargo

todos los autores del tema concluyen que el género *Opuntia* es originario de América y se encuentra ampliamente distribuido en todo el continente, desde los 59° latitud norte en Canadá y a -40 °C y hasta 52° latitud sur en Argentina, pasando por regiones tropicales donde la temperatura siempre esta por arriba de los 5 °C con altitudes abajo del nivel del mar como en el caso de California, o por arriba de 4700 msnm en Perú (Bravo, 1978; Gallegos y Méndez, 2000).

Actualmente el nopal se encuentra en casi todo el mundo, sin embargo la mayoría de los autores coinciden que su origen es el continente americano, específicamente refiriendo a México y Centro América; no obstante la variabilidad fenotípica de las variedades europeas respecto a las americanas, aunque esto podría responder a la selección artificial y la adaptación de las plantas a la forma de cultivo en esas regiones (Griffiths, 2004).

2.2 Propósitos y usos de *Opuntia* spp.

La explotación del nopal tiene varios propósitos y su utilidad se remonta desde la época de tribus nómadas, encontrando que se utilizaba como verdura, fruto, forraje, ornato, uso medicinal o para manufactura de armas de caza y pesca en épocas prehispánicas. Actualmente se han sumado usos potenciales para la industria cosmética, o para producir colorantes naturales a partir de la grana cochinilla (*Dactylopius coccus*) que es un insecto parásito de cuyo cuerpo seco y molido de las hembras adultas se extrae ácido carmínico, en la industria farmacéutica como agente hipoglucemiante; además la medicina tradicional aprovecha el nopal contra inflamaciones, dolor muscular, como laxante y diurético; y en la agroindustria para la elaboración de mermeladas, jugos,

dulces, quesos, galletas o bebidas alcohólicas. Por otro lado el nopal juega un papel ecológico y agronómico como cercos vivos, y por su utilidad en el control de la erosión y recuperación de suelos (Flores y Yeaton, 2000) debido a que su sistema de raíces se extiende ampliamente y presenta crecimiento acelerado constituyendo un agente de enorme aportación contra la erosión eólica y pluvial; pero recientemente se le ha dado también uso en la descontaminación de agua como agente aglomerante de partículas.

Actualmente, con el cambio de los hábitos de alimentación, los compuestos funcionales que proporcionan un beneficio fisiológico, han ubicado al nopal como una fuente importante de estos compuestos destacando su contenido de fibra dietética que según Sáenz (2004) puede llegar a constituir 42.99% del peso seco de cladodios y de ese total, 28.45% corresponde a fibra insoluble y 14.54% la reportan como fibra soluble, dentro de la cual se encuentran el mucílago que es un polisacárido complejo conformado por arabinosa, galactosa, xilosa, ácido galacturónico y ramnosa. Este mucílago esta considerado como un hidrocoloide por su gran capacidad de captar y retener agua por lo que se aprovecha como espesante de algunos alimentos. Los pigmentos (betalaínas y carotenoides) son otro de los usos recientes ya que se aprovechan; por ejemplo, las betalaínas de los frutos púrpura se utilizan como sustituto de colorantes sintéticos, también se ha investigado la posibilidad de obtener edulcorantes reportando que después de ciertos tratamientos el jugo de tuna puede tener hasta 60 °Brix (Sáenz, 2004). Otros compuestos encontrados en los cladodios son minerales (calcio y potasio principalmente) y en menor

proporción minerales como magnesio, sílice, sodio y mínimas cantidades de hierro, aluminio, algunos cloruros, sulfatos y fosfatos (Fuentes y López, 2004).

2.3 Descripción morfológica *Opuntia*

Las plantas de este género característicamente son arborescentes, arbustivas o rastreras, presentan en general cuatro hábitos de crecimiento que pueden ser erguido, extendido, decumbente o colgante; algunas presentan tronco bien definido y otras presentan ramas desde la base. Los tallos se presentan como cladodios aplanados y carnosos, la longitud de estos es variable, encontrándose algunos de 30 cm o menos y otros de 80 cm o más, mientras que de ancho es posible encontrar cladodios de más de 25 cm cuando han llegado a la madurez. Estos tallos modificados llamados cladodios, presentan aréolas que son las estructuras características de la familia Cactaceae en ellas se encuentran las espinas y glóquidas, es a partir de estas estructuras de donde se originan nuevos brotes vegetativos y usualmente de las aréolas apicales surgen los brotes florales.

Las yemas localizadas en las areolas suelen producir hojas reducidas efímeras, y como ya se mencionó anteriormente ahí se producen nuevos tallos, flores y espinas y bajo ciertas condiciones se pueden generar también raíces. El número, forma, tamaño, color y tipo de las espinas, así como su arreglo en la areola, son constantes entre los individuos de una especie (Bravo, 1978).

En la figura 2.1 se muestra la variabilidad de formas que se pueden presentar en los cladodios de algunos genotipos estudiados; estos pueden ser característicamente de formas alargadas, circulares o intermedias de manera

que se pueden encontrar cladodios elípticos estrechos, elíptico medio, elíptico ancho, circular, rómbico, oboval estrecho u oboval ancho. La longitud relativa de estos cladodios puede ser muy corta, corta, media, larga o muy larga; en cuanto a su anchura relativa se pueden diferenciar las formas muy estrechas, estrecha, media, ancha o muy ancha. En la serie de Figuras 2.1 se puede observar que las espinas se presentan en diversas formas y tamaños e inclusive pueden no estar presentes en algunas accesiones. Otras características como cerosidad, color, grosor, pubescencia son poco observables al menos en estas figuras.



Rojo pelón *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.



Bolañera *Opuntia undulata* Griffiths.



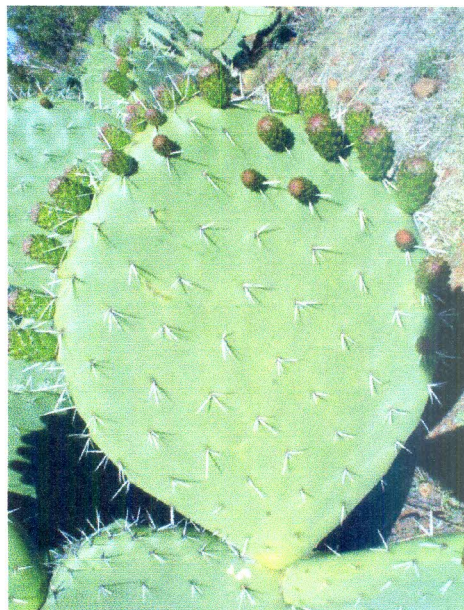
Burrona *Opuntia albicarpa* Schienv. var.



Cardón de Castilla *Opuntia streptacantha* Lem.



Vaquera *Opuntia albicarpa* Scheinvar.



Mango *Opuntia albicarpa* Scheinvar.



Charola tardia *Opuntia hyptiacantha* F.A.C.



Pico chulo *Opuntia megacantha* Salm-Dyck.



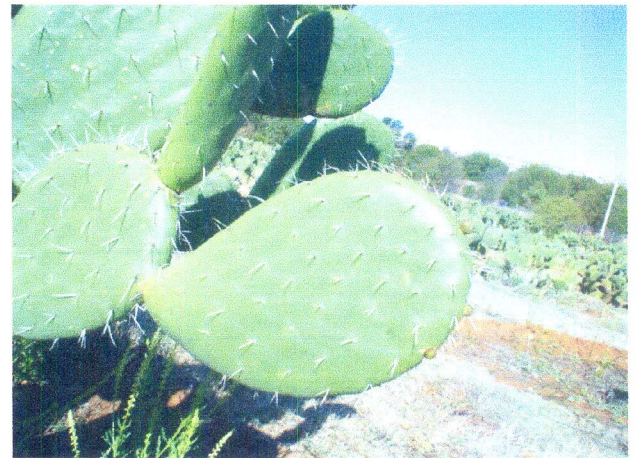
Tapón aguanoso *Opuntia robusta* H.L. Wendl.



Naranjón legítimo *Opuntia megacantha* Salm-Dyck.



San Juanera *Opuntia lasiacantha* Pfeiff



Morada T-10 *Opuntia megacantha* Salm-Dyck.



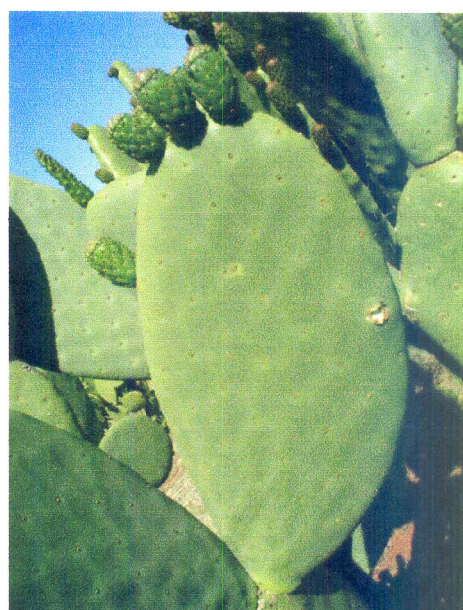
Camuezo *Opuntia megacantha* Salm-Dyck.



Tapona de mayo *Opuntia robusta* H.L. Wendl.



Cacalote *Opuntia cochinera* Griffiths



Milpa alta *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.

Figura 2.1 Formas de cladodios de diferentes especies del género *Opuntia*.

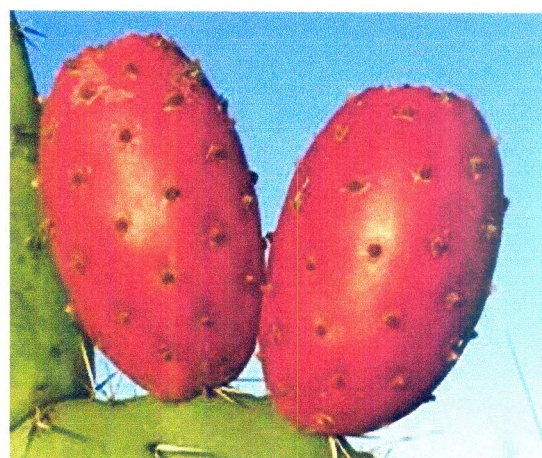
Las flores de este género son por lo regular hermafroditas aunque pueden existir unisexuales, el pericarpelo es muy similar al tallo, las areolas del pericarpelo producen espinas, fieltro, hojas, escamas y brácteas. El cáliz y la corola forman el perianto, compuesto de tépalos de los cuales los segmentos exteriores (sépalos) suelen ser de color verde, mientras que los segmentos interiores (pétalos) son por regular de color amarillo, aunque también existen de color blanco, anaranjado, rosa, rojo, púrpura y hasta flores moteadas. Los estambres y el estilo son más cortos que los tépalos, los estambres son numerosos y el estilo termina en varios lóbulos cortos denominados lóbulos estigmáticos, el ovario es ínfero (Bravo, 1978; Reyes *et al.*, 2005).

El género presenta un síndrome en el cual típicamente algunas flores abren de 24-48 h, son protandrias y pueden abrir por la mañana (tipo A) o por la tarde (tipo B). Todas las flores cierran por la tarde-noche este evento marca la antesis de las flores tipo A, mientras que las flores tipo B volverán abrir al día siguiente por la mañana y cerrarán por la tarde marcando la antesis (Pimienta, 1990). Ambos tipos de flores suelen reabrir por un día más durante algunas horas en la mañana. Se ha registrado dehiscencia de las anteras y polinización del estigma antes de la apertura floral por lo que se considera que muchas especies presentan cleistogamia. Además se han registrado dos tipos comportamiento tigmotrópico de los estambres, uno cuando al ser tocados se mueven hacia el lugar del contacto y un segundo en el cual se mueven y curvan hacia el estilo favoreciendo la autopolinización sin considerar el lugar de contacto (Pimienta, 1990; Nerd y Mizrahi, 1995; Reyes *et al.*, 2005).

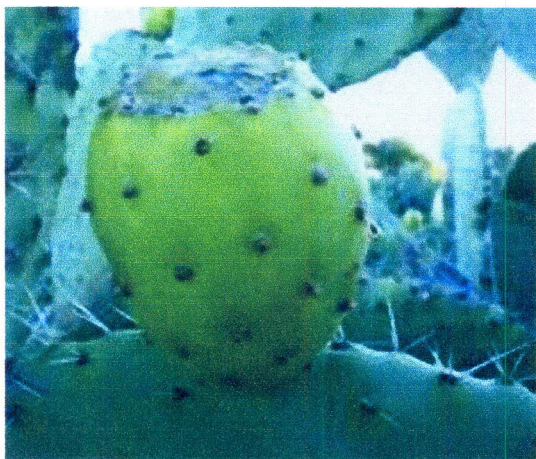
El fruto es una baya unilocular poliespérmica, carnososa seca o jugosa, que de acuerdo con Gallegos *et al.*, (2005) su forma es muy variable pudiendo ser oblonga, elíptica estrecha, elíptica, circular, achatada u oboval y de colores también variables blanco, verde claro, verde intermedio, verde oscuro, amarillo, anaranjado, rosa, rojo intermedio, rojo oscuro o púrpura, estos mismos colores también se presentan en la pulpa (Figura 2.2). La tuna como se le conoce en México al fruto del nopal, se considera que presenta un patrón respiratorio no climatérico como lo señala Corrales *et al.*, (1997), lo cual quiere decir que los frutos en postcosecha presentan elevadas tasas de respiración como respuesta a procesos metabólicos acelerados y esto provoca una corta vida de anaquel que a su vez se traduce en ablandamiento y pérdida de peso, no obstante son varias las especies apreciadas por sus frutos y entre estas se pueden citar principalmente a *O. ficus-indica*, *O. streptacantha* y *O. albicarpa*. A continuación se muestran algunos frutos para resaltar la variación en formas y colores.



Rubi reyna *Opuntia megacantha* Salm-Dyck.



Rojo vigor *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller.



Reyna *Opuntia albicarpa* Scheinvar.



Naranjón legítimo *Opuntia megacantha* Salm-Dick.

Figura 2.2 Variación de formas y colores del fruto de algunas variedades de nopal.

Las semillas de *Opuntia* por lo general son pequeñas, salvo en *O. megasperma* (especies no considerada en este estudio) la cual posee semillas de hasta 1.3 cm de largo; comúnmente las semillas de estas plantas son de forma ovoide o lentiformes. Bravo (1978) y Pimienta y Engleman (1985) señalan que las semillas están cubiertas en el exterior por una estructura funicular dura (Figura 2.3), la testa es delgada y no lignificada. El funículo que rodea a la semilla en estados tempranos y la parte interna se lignifica, mientras que la parte externa es carnosa y contribuye a la pulpa (Bravo, 1978).

En la siguiente figura se resalta la morfología externa de las semillas de *Opuntia*, señalando las estructuras más visibles, además se indican las regiones dorsal y ventral de acuerdo a como lo advierten Guerrero *et al.*, (2006).

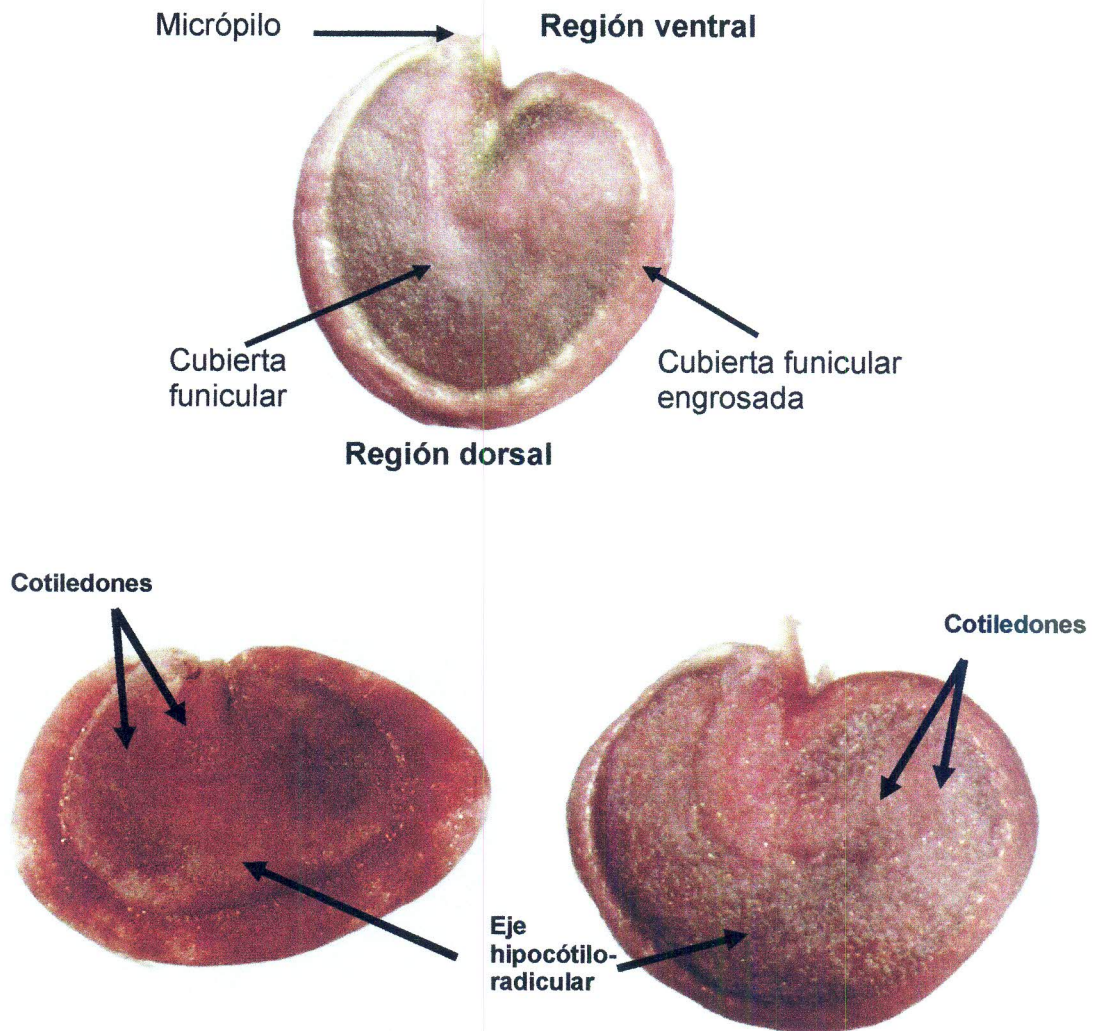


Figura 2.3 Morfología externa de semillas de *Opuntia*. Cortesía Guerrero *et al.*, 2006).

Como se puede observar en la Figura 2.4 el embrión ocupa casi la totalidad de la semilla, es encorvado aunque veces esta dispuesto en espiral, los cotiledones son grandes y la radícula se orienta hacia el micrópilo (Bravo, 1978). Varias semillas de este género presentan dormancia asociada con la

impermeabilidad del tegumento y lo endurecido de la cubierta funicular (Guerrero *et al.*, 2006).



Figura 2.4 Morfología del embrión de una semilla de nopal *Opuntia* spp. (Cortesía Guerrero *et al.*, 2006).

El sistema radical del nopal es somero pero denso, el parénquima cortical de las raíces gruesas permanece turgente almacenando agua. Las raíces secundarias pueden morir con la sequía prolongada pero vuelven a brotar durante el periodo de lluvias (Bravo, 1978).

2.4 Clasificación taxonómica de *Opuntia*

Entre las variedades de nopal se encuentran grupos cultivados y grupos silvestres que varían aún entre las especies cultivadas en sus caracteres fenotípicos como en tamaño, espesor de la cáscara, forma y color del fruto, forma del cladodio, tipo y presencia o no de espinas, color de flor entre otros caracteres. No obstante toda esta variación, el nopal se ubica en taxones básicos como se muestra en el cuadro siguiente:

Cuadro 2.1 Clasificación taxonómica de *Opuntia* spp.

Reino	Vegetal
Subreino	Fanerógamas
División	Angiospermae
Clase	Dicotiledoneae
Orden	Opuntiales
Familia	Cacateceae
Subfamilia	Opuntoideae
Tribu	Opuntiae
Género	Opuntia
Subgénero	Opuntia
Especie	<i>Opuntia</i> spp.

Fuente: Bravo, 1978; González *et al.*, 2001.

Las variedades consideradas en este estudio están identificadas de acuerdo con Reyes *et al.* 2005, como se presentan en el siguiente cuadro 2.2

Cuadro 2.2 Ubicación por especies de las variedades consideradas en este estudio.

<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	<i>Opuntia chaveña</i>	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	<i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire	<i>Opuntia hyptiacantha</i> FAC Weber	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiffer	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths	<i>Opuntia matudae</i> Scheinvar	<i>Opuntia joconostle</i> FAC Weber	<i>Opuntia robusta</i> HL Wendland	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Vaquera	Cascarón	Camuezo	Cardona	Charola Tardía	San Juanera	Bolañera	Xoconostle Cuasemeño	Xoconostle Blanco	Tapón Aguanoso	Milpa Alta
Cristalina		Amarilla Montesa	Cardona de Castilla	Memelo	Amarilla Miquihuana			Xoconostle Colorado	Tapona de Mayo	Rojo Pelón
Mango		Morada T-10						Zaponopal Blanco		Atlixco
Blanca San José		Amarilla Jarro						Zaponopal Rojo		Amarilla Jalpa
Blanca la Gavia		Pico Chulo								Roja San Martín
Burrona		Torreaja								Rojo Vigor
Fafayuca		Rubí Reyna								Villanueva
Alfajayucan		Rosa de Castilla								Copena F-1
Bola de Masa		Rojo Azteca								Copena V-1
Chapeada		Rojo Lirio								Pabellón

Continuación cuadro 2.2 Ubicación por especies de las variedades consideradas en este estudio.

<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	<i>Opuntia chaveña</i>	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	<i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire	<i>Opuntia hyptiacantha</i> FAC Weber	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiffer	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths	<i>Opuntia matudae</i>	<i>Opuntia joconostle</i> FAC Weber	<i>Opuntia robusta</i> HL Wendland	<i>Opuntia ficus-indica</i>
Amarilla Oro		Amarilla Plátano								Rojo Chicle
Naranjón Legítimo										
Amarilla Zacatecas										
Tuna Mansa										
Tuna Rosa										

2.5 Descripción de especies estudiadas

La ubicación taxonómica de las especies y variedades del género *Opuntia*, como ya se ha mencionado ampliamente, se ha realizado tradicionalmente a partir de características morfológicas, es así como los autores han separado especies y actualmente se puede encontrar la descripción de las 10 que se estudiaron en este trabajo como a continuación se menciona.

2.5.1 *Opuntia albicarpa* Scheinvar.

Plantas arbustivas con artículos oblongos hasta elípticos, de 30 a 40 cm de largo, gruesos, de color verde oscuro a verde glauco. Hojas de 4 mm de largo, agudas y rojas. Areolas pequeñas con 1 o 2 cerdas cortas en la parte inferior. Espinas de 1 a 4, rígidas, casi perpendiculares, divergentes, usualmente de menos de 3 cm de largo, son de color blanco a ligeramente marrón, las más robustas son anguladas, las glóquidas son color marrón, caducas. Las flores son amarillentas y su fruto no es muy jugoso (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.2 *Opuntia undulata* Griffiths.

Plantas altas, muy robustas, con ramificación abierta, tronco cilíndrico de 30 cm ó más de diámetro; artículos muy grandes, obovados, ampliamente redondeados arriba de la parte media, usualmente de 35 a 55 cm, firmes, duros, undulados o aplanados, brillantes, al principio de color amarillo verdoso, después verde oscuro, con un ligero tinte glauco hasta marrón; escamosos en los troncos viejos, hojas subcirculares en sección, subuladas, acuminadas,

generalmente con matiz rojo en la punta, de 4 mm de largo sobre un tubérculo prominente y sustentadas por una aréola prominente de color marrón oscuro. Aréolas subcirculares hasta obovadas o elípticas de 3.5 por 4.5 mm, distantes de 5 a 6 cm; glóquidas en haces compactos en la parte superior de la areola de 1 mm de largo aproximadamente. Espinas blancas de 1 a 4 usualmente 1 o ninguna, cortas, erectas, aplanadas, rectas o torcidas de 10 a 15 mm de largo. Fruto grande de 4 a 5 cm de ancho y de 9 a 10 cm de largo, de color rojo hasta con un ligero tinte anaranjado, de pulpa roja y anaranjada (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.3 *Opuntia ficus-indica* (L) Miller.

Plantas arborescentes algunas veces erectas, se presentan un tronco leñoso bien definido de 60 cm a 1.5 m de altura aunque puede tener hasta 5 m de altura y de 20 a 30 cm de diámetro; artículos oblongos o largamente abovados, usualmente de 30 a 60 cm de largo, a veces más largos y de 20 a 40 cm de ancho y 1.9 a 2.8 cm de grueso de color verde opaco; areólas pequeñas distantes, usualmente sin espinas, cuando se encuentran presentes son escasas y pequeñas, glóquidas amarillas, numerosas, caducas. Flores de 7 a 10 cm de diámetro y de 6 a 8 cm de largo, segmento exteriores del perianto ovados hasta ampliamente cuneados, abovados, agudos hasta truncados, enteros, mucronados o denticulados, amarillos con la parte media rojiza o verdosa, segmentos interiores del perianto angostamente obovados hasta angostamente cuneados, truncados hasta redondeados, enteros, mucronados o denticulados, amarillos hasta anaranjados, pericarpelo con algunas espinas

pequeñas caducas. Fruto oval de 5 a 10 cm de largo y de 4 a 8 cm de diámetro, amarillo, anaranjado, rojo o purpúreo, con abundante pulpa carnosa, algo umbilicado (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.4 *Opuntia hyptiacantha* F.A.C. Weber.

Plantas arborescentes de hasta 4 m de altura, muy ramosa y con el tronco bien definido, los artículos son oblongos hasta obovados de 20 a 30 cm de longitud, gruesos, color verde oscuro, las hojas son subuladas, las aréolas son pequeñas, distantes entre sí de 2 a 3 cm, con fieltro marrón y algunos setas oscuras, las espinas en los artículos jóvenes frecuentemente es una sola espina porrecta grande y 2 o 3 espinas chicas setosas blancas, algo pungentes, en los artículos viejos existen de 4 a 6 espinas tortuosas, horizontales o adpresas de 1 o 2 cm de longitud y algunas setas negras; glóquidas escasas, marrón. Las flores son rojas y el fruto es globoso con ombligo amplio, amarillento hasta purpúreo (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.5 *Opuntia lasiacantha* Pfeiffer.

Plantas arborescentes, con tronco más o menos bien definido, artículos obovados hasta oblongos de 20 a 30 cm de longitud. Areólas pequeñas, distantes entre sí de 2 a 3 cm, con numerosas gloquídas amarillentas hasta marrón, espinas de 1 a 3, aciculares, blancas, de 2 a 4 cm de longitud, extendidas, la inferior más larga. Flores grandes, amarillentas o anaranjadas, de 6 a 8 cm de ancho, ovario con largas cerdas marrón, caducas, estilo rosado, lóbulos del estigma color verde pálido (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.6 *Opuntia megacantha* Salm-Dyck.

Plantas altas de 4 a 5 m de alto, a veces más; presentan un tronco leñoso más o menos definido, los artículos son grandes, obovados hasta oblongos, a menudo oblicuos, de 40 a 60 cm de largo o más, de color verde ligeramente glauco. Las hojas son pequeñas de 3 mm de largo, verdes o purpúreas, las areolas son pequeñas, en los artículos grandes se encuentran distantes entre sí de 4 a 5 cm y cuando son jóvenes presentan tomento marrón. Las espinas son aplanadas blancas, generalmente de 1 a 5, ligeramente extendidas, a veces porrectas, por lo común de 2 a 3 cm de largo, a veces escasas y confinadas a las areolas superiores, las glóquidas son escasas, amarillentas, caducas, a veces vuelven a crecer en los artículos viejos. Las flores son amarillas hasta anaranjadas, de 8 cm de ancho aproximadamente, el ovario es obovoide con o sin espinas y el fruto es de 7 a 8 cm de largo (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.7 *Opuntia joconostle* F. A. C. Weber.

Plantas arborescentes de 2 a 3 m de altura con tronco bien definido, aproximadamente 20 cm de diámetro, grisáceo, ramificación abundante, artículos pequeños, ovales con epidermis glabra de color verde claro, ligeramente amarillento, espinas blancas, de longitud desigual. Flor amarilla, fruto globoso, de aproximadamente 2 cm de diámetro, pulpa ácida de color rosa, ligeramente perfumado (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.8 *Opuntia robusta* H. L. Wendland. Ex Pfeiffer.

Plantas arbustivas, muy ramosas, no muy altas de 1 a 2 m. Tronco regularmente definido, artículos orbiculares algo oblongos de 15 a 40 cm de longitud o más, muy robustos, color verde azulado claro. Areolas grandes, distantes con glóquidas marrón. Espinas vigorosas de 2 a 12 y de unos 5 cm de longitud, ligeramente obscuras o amarillentas en la base y blancas hacia el extremo. Las flores son grandes, amarillas de 5 a 7 cm de ancho, lóbulos del estigma son verdes. Frutos globosos o elípticos, al principio más o menos tuberculados de 7 a 8 cm de longitud, color verdoso o con tinte purpúreo (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978).

2.5.9 *Opuntia streptacantha* Lemaire.

Plantas arborescentes, muy ramosas, de hasta 5 m de altura, tronco bien definido en ocasiones de 45 cm de diámetro. Artículos obovados hasta orbiculares de 25 a 30 cm de longitud, color verde oscuro, areolas pequeñas cercanas entre ellas, espinas numerosas, extendidas, en ocasiones adpresas, blancas. Glóquidas de color marrón rojizo muy cortos. Flores de 7 a 9 cm de ancho, amarillas hasta anaranjadas, sépalos rojizos, filamentos verdosos o rojizos, lóbulos del estigma 8 a 12, verdes. Fruto globoso de 5 cm de diámetro de color rojo oscuro a veces amarillento (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978; Guzmán *et al.*, 2003).

2.5.10 *Opuntia cochinera* Griffiths.

Planta arbustiva que comúnmente mide 2 m de altura. Sus areólas presentan un indumento negro o gris; las glóquidas pueden estar ausentes o medianamente abundantes y en general se presentan de 5 a 8 espinas por areóla.

2.6 Caracterización de *Opuntia*

2.6.1 Caracterización en base a su morfología.

La morfología de las cactáceas refleja en sus características las condiciones del medio en que se han desarrollado y evolucionado, estas particularidades las han concentrando por medio de la herencia de antiguas líneas evolutivas; sin embargo actualmente presentan también caracteres que pueden haber derivado de cambios evolutivos recientes (Bravo, 1978). La descripción morfológica suele aprovechar las características fenotípicas de un grupo de plantas “tipo” para diferenciarlas de otros grupos; este método de caracterización es de amplia aplicación cuando se lleva a cabo con la debida dedicación y cuidado al momento de evaluar las características, para ello se requiere de entrenamiento y experiencia. Es por esto que en ocasiones la caracterización morfológica suele caer en sesgos que subestiman o sobreestiman algunas características conduciendo a conclusiones erróneas.

La caracterización de *Opuntia* spp no es la excepción de este caso descrito y muchas veces las apreciaciones se realizan llevando implícito el interés personal o inclinación hacia alguna característica, por lo que la apreciación del

encargado de describir una accesión difiere generalmente con la apreciación de otro evaluador; no obstante, en un esfuerzo para reducir este sesgo se han desarrollado guías técnicas que pretenden ser un punto de comparación estándar para considerar una característica predeterminada, en este sentido podemos encontrar que para el caso del género *Opuntia* el uso de cladodios es la vía tradicional de la que parten casi todos los estudios de descripción y caracterización de nopal y xoconostle, debido a que las guías técnicas para la descripción de variedades aprobadas por la UPOV (Internacional Union for the Protection of New Varieties of Plants) ha reconocido la importancia y por eso demanda la utilización de cladodios para la descripción y caracterización, además de descriptores de flor y fruto (Gallegos *et al.*, 2005).

Para la descripción de variedades suelen considerarse variedades propagadas vegetativamente y el material para caracterización corresponde a ocho plantas de tres años de edad. Se demanda además la sanidad y buen estado fisiológico de la planta. Por otra parte, las evaluaciones deben realizarse en un mismo lugar, detectando características distintivas importantes y en caso de que no produzca alguna característica importante para distinción, caso de efectos de endemismo, pueden llevarse a otro lugar en donde pueda expresarse tal distintivo.

El subgénero *Opuntia* agrupa especies en donde se encuentran aquellas que son apreciadas para la producción de fruta o verdura, entre las que se pueden citar a *O. streptacantha*, *O. albicarpa*, *O. megacantha*, *O. ficus-indica*, y otras que son menos cultivadas como *O. robusta*, *O. joconostle*, *O. undulada*,

además de algunas silvestres como *O. lasiacantha* y *O. hypticantha*. Varias de estas especies han generado numerosas formas hortícolas distinguibles por ciertos rasgos característicos, que han contribuido a una identificación mediante nombres coloquiales. En ocasiones estas variantes al interactuar con el ambiente exhiben ciertas diferencias morfológicas, que sin embargo, no llegan a constituir formas completamente diferentes generando sinonimias que refieren a una misma variedad con dos o más nombres. No obstante la morfología de las cactáceas proporciona información de las condiciones del medio en que se desarrollan, sus características las van adquiriendo por herencia de antiguas líneas evolutivas, y otras derivan de tendencias evolutivas recientes (Bravo, 1978).

2.6.2 Caracterización con marcadores moleculares.

No obstante su relevancia para la agricultura nacional y el enorme papel biológico que esta planta desempeña, el nopal es una especie de la cual no se realiza suficiente investigación científica. Hasta hace pocos años, cobra importancia su estudio debido a su participación en el mercado internacional como producto de exportación para diversos fines y por el interés de su mejoramiento genético, principalmente por Japón y Estados Unidos. Por esta situación y los antecedentes anteriormente vividos como centro de origen de esta y otras especies nativas, las cuales han sido mejoradas, manipuladas genéticamente y explotadas comercialmente, México debe dar atención a la conservación, mejoramiento y explotación. Sin embargo no se dispone de

información concluyente y confiable de esta especie acerca de su diversidad genética y clasificación taxonómica.

Las herramientas modernas de la biotecnología como los marcadores genético-moleculares, permiten estimar la variación genética y diferenciar a nivel inter e intraespecífico a poblaciones de individuos, debido a su comportamiento neutro en cuanto a la variación debido al ambiente, además se encuentran prácticamente de manera ilimitada en el genoma y son independientes de la etapa fenológica de las plantas (Beebe *et al.*, 2000; Valadez *et al.*, 2001).

Las técnicas basadas en PCR se han preferido dada su facilidad de implementación y calidad informativa. Uno de los sistemas de marcadores más utilizados son los RAPDs que representan una técnica utilizada comúnmente en estos estudios por su eficiencia y bondades de manejo, así como las ventajas de su análisis para identificar polimorfismos que sirvan como marcadores, y particularmente se utilizan para diferenciar especies o poblaciones con variabilidad genética amplia (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002); pero para conocer el grado de parentesco genético, normalmente se recurre a marcadores conservados entre las especies tales como los SSRs y algunas variantes de la técnica. Pero, aun cuando los SSRs tienen la capacidad de diferenciar a dos individuos de la misma especie, su implementación es costosa y solo funcionan en la especie para y sobre la cual se diseñaron (Moxon y Wills, 1999; Valadez y Kahl, 2000).

Como técnica alternativa a los SSRs pero con diferente capacidad informativa, existen los ISSRs; estos marcadores detectan regiones de DNA comprendidas

entre dos microsatélites con núcleos que comparten la misma secuencia de bases. Esta técnica, al igual que los RAPDs requiere de un iniciador dirigido y en posición invertida a los núcleos de dos microsatélites adyacentes, de manera que se amplifica la región comprendida entre ambos, evidenciando posibles polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (ISSRs). Estos polimorfismos evidencian mutaciones ocurridas en esa región particular del DNA, de manera que aquellos que se comparan tenderán a agruparse en función de esas diferencias, lo que denota cierto valor en distancia genética. Tanto las técnicas de RAPDs como ISSRs se han utilizado ampliamente y de manera complementaria con fines de genotipificación y generalmente los fragmentos detectados, tienden a ser monomórficos cuando la variabilidad o diversidad genética de los organismos que se comparan es reducida, por lo que se infiere mayor relación entre ellos; sin embargo, altos índices polimórficos permiten presuponer lo contrario (Patzak, 2001; Iruela *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2003). Otra ventaja que han mostrado ambas técnicas es que los agrupamientos logrados con los datos moleculares generalmente muestran congruencia con aquellos establecidos con descriptores morfológicos (Wang *et al.*, 1998; Scarano *et al.*, 2002).

Como se puede apreciar, la caracterización molecular como complemento a la caracterización morfológica encuentra su pertinencia como una herramienta para llegar a resultados que permitan concluir con base en ambos métodos y contrastarlos, observando virtudes y desventajas de uno u otro, pero que finalmente permitan tener conclusiones más próximas a la realidad.

Por los antecedentes mencionados y con el uso de las herramientas a nuestra disposición se demanda generar conocimientos de esta especie con fines de caracterización genómica para apoyar las conclusiones basadas en los análisis de descriptores morfológicos.

2.6 LITERATURA CONSULTADA

Beebe, S. E.; Skroch, P. W.; Thome, J.; Duque, M. C. Pedraza, F.; Nienhuis, J. 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop Science*. 40 (1): 264-273.

Bravo-Hollis, E. 1978. Las Cactáceas de México. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D.F., México. 743 p.

Britton, N. L. & J. N. Rose. 1963. The cactaceae descriptions and illustrations of plant of cactus family. Vol. I Dover Publications, Inc. New York. USA. 241 p.

Corrales, G. J.; J. Andrade R.; E. Bernabé, C. 1997. Responses of six cultivars of tuna fruits to cold storage. *Journal Professional Association of the Cactus Development*. 2: 160-168.

Cota, J. H. y R. S. Wallace, 1996. La citología y la sistemática molecular en la familia cactaceae. *Cactáceas y succulentas mexicanas* 41 (2): 27-46.

Fernández, M., A. Figueiras and C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic

diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104 (5): 845-851.

Flores, F. J. L. y R. I. Yeaton. 2000. La importancia de la competencia en la organización de las comunidades vegetales en el altiplano mexicano. *Interciencia*. 23. 365-371.

Fuentes R., J. M.; López G., J. J. 2004. El nopal forrajero en el norte de México. *In: El nopal tópicos de actualidad*. Eds. Esparza F., G.; Valdéz C., R. D.; Méndez G., S. de J. Universidad Autónoma Chapingo (Centro Regional Universitario Centro Norte), Colegio de Postgraduados (Campus San Luis Potosí). 303 p.

Gallegos, V. C. y S. J. Méndez. 2000. La tuna, criterios y técnicas para su producción comercial. Universidad Autónoma Chapingo, Colegio de Postgraduados y Fundación Produce Zacatecas. Chapingo, México. 164 p.

Gallegos, V. C.; A. F. Barrientos P.; J. Cervantes H. 2005. Manual gráfico para la descripción varietal de nopal tunero y xoconostle (*Opuntia* spp.). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca, Pesca y Alimentación. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 116 p.

González, D. A.; Riojas, L. M. E.; Arreola, N. H. J. 2001. El género *Opuntia* en Jalisco. Guía de campo. Universidad de Guadalajara. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 135 p.

Griffiths, P. M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany 91: 1911-1921.

Guerrero, M. P.; H. A. Zavaleta, M.; A. F. Barrientos, P.; C. Gallegos, V.; C. A. Nuñez, C. y E. Valadez, M., J. A. Cuevas, S. 2006. Técnica para el estudio de la micromorfología interna de semillas duras en *Opuntia*. Revista Fitotecnia Mexicana. 29 (2): 37-43.

Guzmán, U.; Arias, S.; Dávila, P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 315 p.

Iruela, M., J. Rubio, J. I. Cubero, J. Gil and T. Millán. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104 (4): 643-651.

Martins, M., R. Tenreiro and M. M. Oliveira. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 22 (1): 71-78.

Moxon, R. and C. Wills. 1999. DNA Microsatellites: Agents of evolution?. Scientific American 280 (1): 72-77.

Muñoz, U. A. 1994. Variación fenotípica, aislamiento reproductivo y ecofisiología de poblaciones silvestres de especies de *Opuntia* en la porción sur del Desierto Chihuahuense. Tesis Postgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México D. F. 115 p.

Nerd, A. and Mizrahi, Y. 1995. Reproductive biology. *In*: Barbera, G., Inglese, P., Pimienta, B. E., Arias, J. E. de J. (Eds.), Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. FAO. Rome, Italy. pp. 49-58.

Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121 (1): 9-18.

Pimienta, B. E. 1990. El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. 246 p.

Pimienta, B. E. y Engleman, E. M. 1985. Desarrollo de la pulpa y proporción, en volumen de los componentes del lóbulo maduro en tuna (*Opuntia ficus-indica* [L]. Miller). *Agrociencia*. 62: 51-56.

Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath, 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44 (5): 763-772.

Reyes, A. J. A., J. R. Aguirre R., y J. L. Flores F. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia* 30 (8): 476-484.

Sáenz H., C. 2004. Compuestos funcionales y alimentos derivados de *Opuntia* spp. *In*: El nopal tópicos de actualidad. Eds. Esparza F., G.; Valdéz C., R. D.; Méndez G., S. de J. Universidad Autónoma Chapingo (Centro Regional Universitario Centro Norte), Colegio de Postgraduados (Campus San Luis Potosí). 303 p.

Scarano, M. T., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and N. Tusa. 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Reports* 20 (12): 1162-1166.

Valadez M., E.; Günter K.; Ramser, J.; Hüttel, B. y Rubluo, I. A. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol 24 (1): 103-120.

Valadez, M. E. y G. Kahl. 2000. Huellas Genómicas de ADN de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. D. F., México. 147 p.

Wang, X., P. Felker, D. M. Burow and H. A. Paterson. 1998. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 3-14.

CAPITULO 3

III. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES ELECTROFORETICAS PARA ANALISIS DE FRAGMENTOS RAPDs DE VARIEDADES DE *OPUNTIA* SPP¹

RESUMEN

La caracterización molecular rápida y precisa de *Opuntia* spp., es de gran utilidad cuando se requiere diferenciar genotipos que exhiben pocos caracteres morfológicos contrastantes entre sí. El uso de marcadores moleculares detectados con la tecnología de PCR son una herramienta eficiente para tales propósitos; sin embargo su implementación requiere de estandarización de procedimientos y uno muy importante es el sistema de separación electroforética de los productos amplificados. En este trabajo se comparó la eficiencia de dos sistemas de electroforesis, geles de agarosa y poliacrilamida (PAGE) para separar productos RAPDs obtenidos con cinco iniciadores. En ambos sistemas se observaron polimorfismos pero PAGE 8% (29:1) resultó más eficiente por que permitió detectar un total de 141 bandas, 54 de ellas polimórficas, mientras que en agarosa se detectaron 48 bandas de las cuales 22 fueron polimórficas. Los datos obtenidos en PAGE permitieron diferenciar con más precisión los genotipos utilizados tomando como referencia la clasificación taxonómica actual.

Palabras clave: Nopal, Poliacrilamida, Agarosa, Polimorfismos, Diferenciación, Genotipos.¹

¹ Luna, P. A.; Valadez, M. E.; Barrientos, P. A.F.; Gallegos, V. C.

IV. OPTIMIZATION OF ELECTROPHORETIC CONDITIONS FOR THE ANALYSIS OF RAPDs FRAGMENTS OF *Opuntia* spp VARIETIES²

ABSTRACT

A rapid and precise characterization of *Opuntia* spp. is of great utility when it is required to differentiate genotypes that exhibit few contrasting morphological characters between them. The use of molecular markers detected with PCR technique is an efficient tool for such purposes; however, its implementation requires standardization of the procedures, and one very important is the system of electrophoretic separation of the amplified products. In this work the efficiency of two electrophoresis systems, agarose and polyacrylamide (PAGE) gels, to separate RAPDs fragments obtained with five primers were compared. In both systems were observed polymorphisms but PAGE 8% (29:1) was more efficient, allowing to detect 141 bands, 54 of them polymorphics, while in agarose 48 bands were detected, of which 22 were polymorphics. The data obtained in PAGE differentiated with more precision the genotypes analyzed, taking as reference the current taxonomic classification.

Key words: Prickly pear, Polyacrylamide, Agarose, Polymorphisms, Differentiation, Genotypes.²

² Luna, P. A.; Valadez, M. E.; Barrientos, P. A. F.; Gallegos, V. C.

3.1 INTRODUCCIÓN

En México existen Bancos de Germoplasma del género *Opuntia* que salvaguardan colectas con valor agronómico. Normalmente estas colectas solo presentan descripciones morfológicas y etnobotánicas que refieren su fenotipo y el valor comercial o agronómico (Pimienta y Muñoz, 1995; (García *et al*, 2003)). Pero en ocasiones esas caracterizaciones no permiten diferenciar variantes por lo que es conveniente utilizar otras estrategias.

Las caracterizaciones genómicas permiten detectar cambios en el DNA que no son influidos por el ambiente, favoreciendo el estudio de la diversidad o variabilidad genética. Estos cambios conocidos como polimorfismos de DNA o marcadores moleculares utilizan normalmente electroforesis para su visualización; ya que como es bien sabido, la electroforesis permite la separación de moléculas en función de su peso molecular a través de una matriz semisólida expuestas a un campo eléctrico transmitido por un amortiguador de corrimiento (Sharp *et al.*, 1973; Sambrook, J. *et al.*, 1989; Osorio *et al.*, 2005). La tecnología de PCR generalmente se apoya en este sistema para la separación de fragmentos de DNA, y aunque existen otras técnicas de separación, la electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida son las más frecuentes, cada una con ventajas y desventajas que pueden ser aprovechadas en función de los objetivos del trabajo y la resolución deseada de los perfiles de DNA (García, 2000). Por ejemplo, las huellas de DNA separadas en agarosa presentan una resolución pobre, pocas bandas, bandas gruesas y en algunas ocasiones difusas, lo que puede llevar a interpretaciones imprecisas

en los resultados. Sin embargo, la utilización de geles no desnaturalizantes de poliacrilamida para la separación de los mismos productos, detecta perfiles de DNA definidos pero sobre todo abundantes, lo que optimiza el uso de las técnicas de PCR (Valadez y Kahl, 2000).

El proceso de electroforesis demanda cierta práctica para llevar a cabo la separación de productos, ya que los resultados pueden verse afectados por la temperatura durante la polimerización y durante el corrimiento, dando como resultado la deformación de las bandas. El tiempo es otro factor que influye ya que cuando el tiempo de corrimiento es corto se limita la separación dando lugar a la visualización de fragmentos gruesos y poco definidos. Otra fuente de error es la cantidad de catalizador que se utiliza para el sistema PAGE, por que un exceso ocasiona polimerización no uniforme. De acuerdo con García, 2000 el método de tinción utilizado también es importante; por ejemplo la tinción con plata es muy sensible y puede provocarse sobretinción dando como resultado coloraciones muy oscuras o tinción discontinua, pero en las concentraciones y tiempo apropiados los resultados obtenidos son excelentes.

La técnica de RAPDs es una herramienta ampliamente utilizada y eficiente para análisis genómicos porque los productos que se comparan representan diferentes loci dado el polimorfismo de su longitud (Scott y del Tufo, 1993; Becerra y Paredes, 2000); sin embargo, no siempre se explotan sus resultados satisfactoriamente, porque la mayoría de los estudios los analizan en geles de agarosa y los resultados pueden ser poco informativos por las razones expuestas previamente. En este reporte se compara la eficiencia de dos

técnicas que se utilizaron para la separación de productos RAPDs en diferentes accesiones de *Opuntia* spp.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 accesiones de *Opuntia* spp del banco de germoplasma del CRUCEN Zacatecas de la Universidad Autónoma Chapingo referidas en el cuadro siguiente:

Cuadro 3.1 Accesiones de *Opuntia* spp incluidas en este estudio.

No.	Accesión	Clave*	Nombre científico	No.	Accesión	Clave*	Nombre científico
1	Rubí Reyna	RR	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	26	Tuna Mansa	TM	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar
2	Copena F-1	CF1	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L). Miller.	27	Bola de Masa	BM	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar
3	Cascarón	Cas	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	28	Chapeada	Cha	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar
4	Pico Chulo	PCH	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	29	Tapona Mayo	de TMY	<i>Opuntia robusta</i> Wendland. Ex Pfeiffer.
5	Amarilla Oro	AMO	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	30	Charola Tardía	CHT	<i>Opuntia hyptiacantha</i> F. A. C. Weber.
6	Oreja de Elefante (Bolañera)	OE	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths	31	Tapón Aguanoso	TAG	<i>Opuntia robusta</i> Wendland. Ex Pfeiffer.
7	Copena Z-1 (Vaquera)	CZ1	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	32	San Juanera	SJ	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiffer.
8	Memelo	Mem	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	33	Cardona	Car	<i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire.

Continuación cuadro 3.1 Accesiones de *Opuntia* spp., incluidas en este estudio.

9	Rojo Pelón	RP	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L). Miller.	34	Pabellón	Pab	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L). Miller.
10	Reyna	Rey	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	35	Camuezo	Cmz	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck
11	Milpa alta	MA	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L). Miller.	36	Esmeralda	Esm	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L). Miller.
12	Copena V-1	CV1	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L). Miller.	37	Blanca Gavia	la BGA	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar
13	Mango	Man	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	38	Amarilla Miquihuana	AMQ	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiffer.
14	Rojo Lirio	RL	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	39	Rojo Azteca	Raz	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck
15	Alfajayucan	Alf	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	40	Xoconostle Colorado	XCO	<i>Opuntia joconostle</i> F. A. C. Weber
16	Cristalina	Cris	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	41	Xoconostle Chivo	XCH	<i>Opuntia joconostle</i> F. A. C. Weber
17	Rosa de Castilla	RC	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	42	Xoconostle Cuaresmeño	XCU	<i>Opuntia matudae</i> Scheinvar.
18	Tuna Rosa	TR	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	43	Blanca José	San BSJ	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar
19	Atlixco	Atl	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	44	Duraznillo Rojo	DR	<i>N. l.</i>
20	Cardón de Castilla	CC	<i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire.	45	Cacalote	Cac	<i>Opuntia cochinera</i> Griffiths
21	Morada T-10	MT	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	46	Tapón Blanco	TBL	<i>Opuntia robusta</i> Wendland. Ex Pfeiffer.

Continuación cuadro 3.1 Accesiones de *Opuntia* spp., incluidas en este estudio.

22	Fafayuca	Faf	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	47	Copena T-3	CT3	<i>Opuntia indica</i> Miller.	<i>figus-</i> (L).
23	Burrona	Bur	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	48	Amarilla Nicolás	San ASN	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck	
24	Villanueva	Vill	<i>Opuntia indica</i> (L). Miller.	49	San Pedreña	SPE	<i>Opuntia indica</i> Miller.	<i>figus-</i> (L).
25	Rojo Vigor	RV	<i>Opuntia indica</i> (L). Miller.	50	Pabellón Amarillo	PAM	<i>Opuntia indica</i> Miller.	<i>figus-</i> (L).

***Clave referida en este estudio**

3.2.1 Extracción de DNA genómico

Se consideraron muestras de cladodio de tres plantas independientes pertenecientes a la misma accesión. La extracción del DNA se realizó de acuerdo al procedimiento CTAB modificado por De la Cruz, *et al.*, 1997 y estandarizado para nuestras condiciones.

Se partió de 0.3 g de tejido fresco de cladodio de cada una de las tres plantas de la misma variedad. El amortiguador de extracción utilizado fue CTAB 4%, PVP 2% y 0.4% de β -mercaptoetanol, cuando se obtuvo la pastilla de DNA se disolvió en 200 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA, pH 8) + NaCl 1.5 M, las muestras se fenolizaron y finalmente el DNA se conservó en amortiguador TE a -20 °C.

El DNA genómico se cuantificó con espectrofotometría a 260 nm y se estimó su calidad en geles de agarosa al 1% y amortiguador TAE 1X (Stock 50X: Tris base 242 g, ácido acético glacial 57.1 mL, EDTA 0.5 M pH 8 100 mL,

(Sambrook *et.al.*, 1989), el gel se tiñó con bromuro de etidio $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se documentó con el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

Para los RAPDs se utilizaron 5 moléculas iniciadores de Carl Roth GMBH + Co., el K01 (5' >CAT TCG AGC C < 3'), K04 (5' > CCG CCC AAA C < 3'), K07 (5' > AGC GAG CAA G < 3') y K17 (5' > CCC AGC TGT G < 3'). La mezcla de reacción para PCR fue de 25 μL que contenía agua, 500 μM de dNTPs, amortiguador Taq 1X, 25 mM de MgCl_2 , 20 pmol de iniciador, 1.5 U de DNATaq-polimerasa y 100 ng de DNA molde. Las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo de predesnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30s; 40 °C, 30s, 72 °C, 1.5 min] y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 2.5 min. Se consideraron 40 °C de alineamiento para los iniciadores, porque este es un factor que puede influir en la reproducibilidad de resultados entre los experimentos (Becerra y Paredes, 2000; Valadez y Kahl, 2000).

3.2.2 Separación de productos

Los productos RAPDs se separaron en geles de agarosa 1.2% que permite la migración de moléculas de 3 a 10 nm (Buzás y Chrambach, 1982; Sewer, 1983). Se utilizaron 5 μL de los productos amplificados mezclados con 3 μL de amortiguador SGB 5X (Tris base 50 mM pH 8, EDTA 5 mM pH 8, sacarosa 25%, azul de bromofenol $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, xilen cianol $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para cargar en el gel, el cual se corrió a 78 voltios durante 2.5 h en amortiguador TAE 1X. Posteriormente el DNA se tiñó con bromuro de etidio. Como referencia se utilizó el marcador de peso molecular de 1 kb DNA Ladder de Promega.

Se analizaron 50 variedades con las tres repeticiones como se mencionó anteriormente. Simultáneamente las muestras también se separaron en geles de poliacrilamida 8% cuyos componentes fueron: poliacrilamida 40% (29:1), amortiguador TBE 1X (Stock 5X: Tris base 54 g, ácido bórico 27.5 g, EDTA 0.5 M pH 8 20 mL, Sambrook *et. al.*, 1989), H₂O destilada, persulfato de amonio 25% y TEMED 60 µL. La polimerización se llevó a cabo aproximadamente durante 40 min. Los productos de reacción se mezclaron con 6 µL de amortiguador SGB 5X y en cada pozo se cargaron 2.0 µL de esa mezcla. Se utilizó el mismo marcador de 1 kb en los extremos y en la parte media del gel. El gel de poliacrilamida se corrió a 280 voltios durante 3 h en amortiguador TBE 1X y se tiñó el DNA con sales de plata de acuerdo al protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2000).

Ambos tipos de geles con los perfiles electroforéticos de cada iniciador se analizaron con el programa Kodak Digital Science, asignando el peso molecular correspondiente a cada banda detectada; de esta manera se determinaron las bandas comunes y las bandas polimórficas. Con los datos se elaboró una matriz binaria codificando con el dígito 1 las bandas presentes y con 0 a las bandas ausentes. Con el fin de establecer grupos genómicos con los patrones electroforéticos RAPDs, se elaboró un árbol con el programa Free Tree versión 0.9.1.50 con el coeficiente Jaccard, mediante el método de agrupamiento Neighbort-joinig y el remuestreo “bootstrapping” con 1000 repeticiones; para visualizar el árbol obtenido se utilizó el programa Tree View 1.6.6.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El DNA obtenido con el protocolo utilizado se muestra en la Figura 3.1, se observa que este se mantiene en la parte superior del gel como una banda compacta debido al tamaño de la molécula y conformación de la misma.

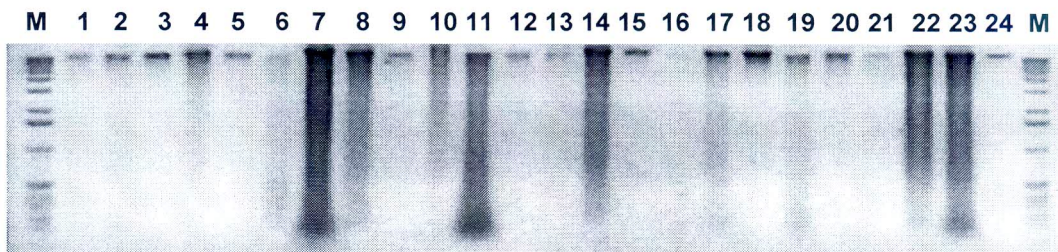
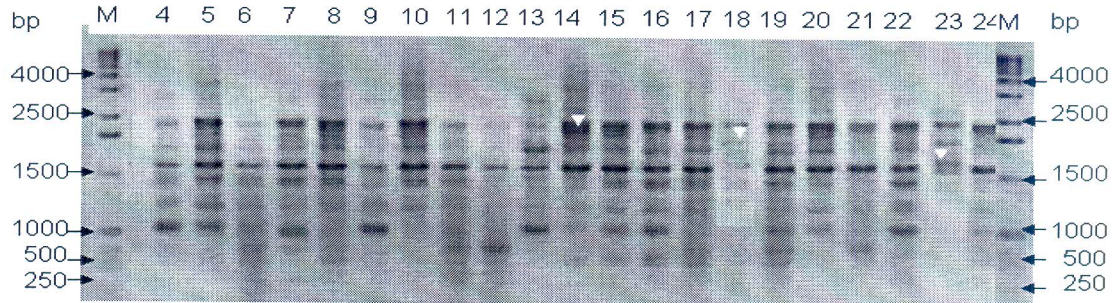


Figura 3.1 Gel de agarosa 1% muestra la calidad de DNA, M: marcador de 1 kb DNA Ladder de Promega, carril 1-24 DNA de 24 muestras de nopal.

Los iniciadores seleccionados para llevar a cabo la PCR amplificaron bandas compactas y bien definidas pero que al separarlos en dos tipos de geles, proporcionaron perfiles distintos con polimorfismos claramente definidos. Al comparar los perfiles de DNA entre las repeticiones consideradas en el estudio no se encontraron diferencias entre ellos, esto se puede explicar si se considera que en realidad las tres plantas son clones, por lo que la información genética es la misma debido a su sistema de propagación y las condiciones uniformes de crecimiento y desarrollo a las que están sometidas en el banco de germoplasma.

Un ejemplo de los perfiles electroforéticos obtenidos se muestran en la Figura

3.2



Panel A separación en agarosa.



Panel B separación en acrilamida.

Figura 3.2 Perfil electroforético de DNA genómico de *Opuntia* spp generado con el iniciador RAPD Carl Roth K-17 separado en agarosa (panel A) y en poliacrilamida (panel B). Carril M corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb DNA Ladder de Promega. Las flechas blancas señalan algunos polimorfismos claramente observados.

Como puede apreciarse en la figura 3.2 panel A, los fragmentos amplificados visualizados en geles de agarosa, se encuentran en un rango de 2500 a 250 pb,

sin embargo muchos fragmentos que presentan longitudes similares se concentran en pequeño espacio y no se percibe la separación de los fragmentos con peso molecular similar. En cambio en los geles de poliacrilamida se observó un rango similar de separación (panel B), pero revelando polimorfismos entre bandas muy cercanas lo cual representó una mayor cantidad de bandas apreciadas.

Los geles de agarosa en general permiten la separación de fragmentos con pesos moleculares desde 200 pb hasta 30 kb, pero la concentración de agarosa utilizada en este trabajo (1.2%) permite la resolución de fragmentos de 7kb hasta 400 pb peso molecular.

La electroforesis en poliacrilamida, introducida por Raymond y Weintraub (1959), es una técnica apropiada para caracterizar mezclas complejas de moléculas. La conveniencia de su uso se debe a que aún cuando el tiempo de corrimiento es relativamente mayor, el volumen de muestra requerida es menor, el poder de resolución significativamente mayor, así como su capacidad de discriminación entre moléculas de DNA de similar tamaño, algunos autores señalan una capacidad de discriminación de 1 bp en 500 bp (Maniatis *et al.*, 1975; Fisher y Lerman, 1983). En nuestro estudio con la concentración de poliacrilamida utilizada (8%) permitió separar fácilmente los fragmentos considerados que fueron de 2.5 kb hasta 200 pb de peso molecular (Valadez y Kahl, 2000).

Combs, *et al.*, (2004) señalan que el sistema PAGE es preferido para la identificación de variedades, mientras que los geles de agarosa son

preferentemente utilizados para identificar líneas. Osorio *et al.*, (2005) observaron que la agarosa permite la separación de manera práctica y reproducible en materiales de papa. Nosotros encontramos que cada sistema tuvo diferente capacidad de resolución, porque obtuvimos diferente número de fragmentos (amplicones) para cada sistema, observándose que en agarosa se apreciaron pocas bandas y muy marcadas haciendo un total de 48 fragmentos con los 5 iniciadores de los cuales 22 (45.8%) fueron polimórficos; mientras que la separación de la misma muestra amplificada en geles de poliacrilamida, se detectaron significativamente mayor número de fragmentos, encontrando un total de 141 fragmentos con los 5 iniciadores de los cuales 54 (38.3%) fueron polimórficos.

El agrupamiento RAPDs (Figura 3.3) obtenido con la matriz de datos de los perfiles generados en agarosa, permitieron la diferenciación de las variedades (García *et al*, 2003) no obstante la poca cantidad de bandas, algunas de las cuales fueron monomórficas, pero éstas fueron fácilmente distinguibles y reproducibles.

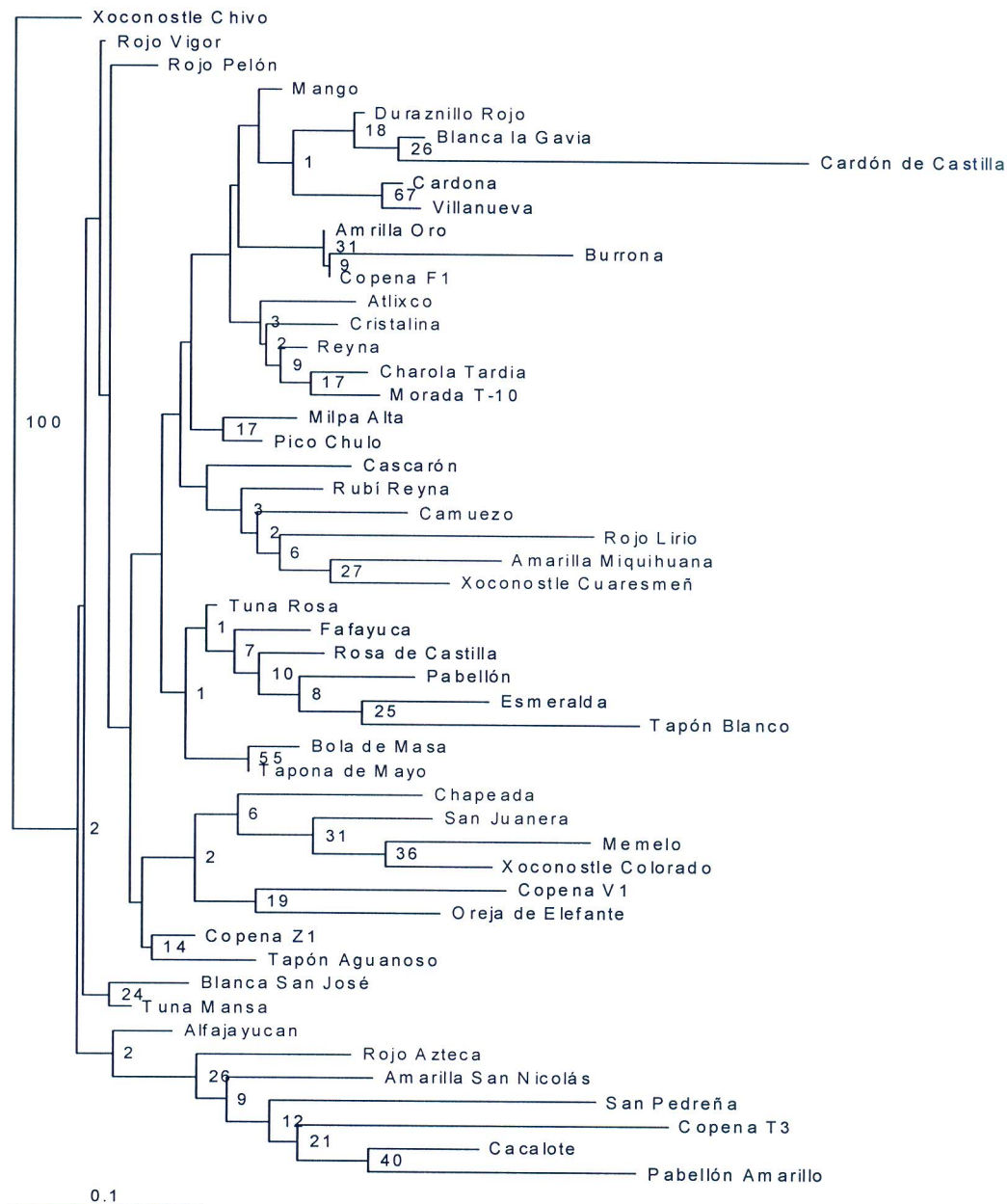


Figura 3.3 Agrupamiento RAPDs con fragmentos separados en agarosa de 50 variedades de *Opuntia* spp. obtenido con el coeficiente JACCARD y el análisis de agrupamiento Neighbort-joinig y el remuestreo “bootstrapping” con 1000 repeticiones.

Como puede observarse en este árbol generado, los agrupamientos no reflejan una asociación clara entre las variedades que pertenecen a una misma especie, encontrándose entremezcladas variedades de diferentes especies. Esto indica que la separación en agarosa refleja información muy superficial, que aún cuando es posible diferenciar entre las variedades, este sistema de separación no genera polimorfismos suficientes que permitan concluir respecto a la asociación de las variedades de una misma especie.

Por otra parte, los perfiles obtenidos en PAGE permitieron diferenciar, por los polimorfismos detectados, a cada una de las variedades utilizadas para este estudio (Fig 3.4).

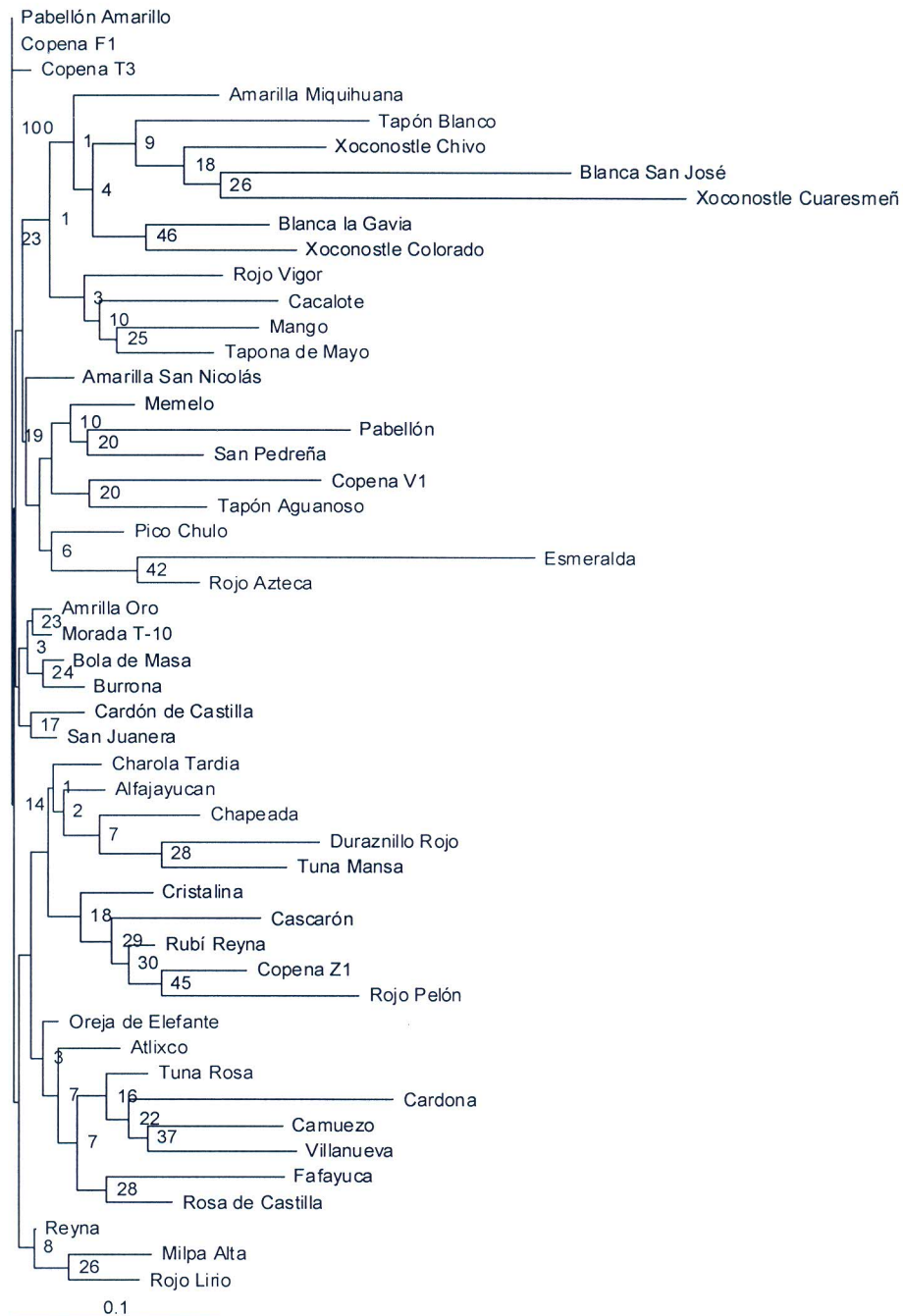


Figura 3.4 Agrupamiento RAPDs, fragmentos separados en PAGE de 50 variedades de *Opuntia* spp. Coeficiente JACCARD, agrupamiento Neighbort-joinig y “bootstrapping” con 1000 repeticiones.

El dendrograma obtenido utilizando la matriz binaria generada con PAGE diferencia a todos los materiales analizados. Sin embargo, tampoco con este método es posible conformar grupos de similitud que asocien a las variedades pertenecientes de una misma especie. Esto permite suponer varias cosas, una de ellas es que las condiciones intrínsecas del procedimiento están influyendo negativamente para poder llevar a cabo la óptima amplificación de polimorfismos y la separación de fragmentos en los geles de agarosa y también en PAGE; pero otra suposición y respaldada por la controversia que actualmente existe en la taxonomía del género de *Opuntia*, es que las variedades en estudio se agrupan de acuerdo a diferencias y similitudes en la longitud de los fragmentos amplificados y debido a que estos experimentos se realizaron al menos en tres ocasiones independientes, es factible reconsiderar estos resultados como un indicio en el apoyo que brinda el análisis de DNA (Reyes *et al*, 2005; Luna *et al*, 2007).

Al comparar los grupos conformados de ambos dendrogramas no necesariamente son coincidentes, estas diferencias observadas son atribuibles nuevamente a las propiedades intrínsecas de los ambos sistemas electroforéticos y no por experimentos realizados independientemente.

El significativo número de marcadores polimórficos obtenido con tan solo los 5 iniciadores es consistente y puede deberse a que las variedades de *Opuntia* analizadas pertenecen a especies altamente polimórficas en sus características morfológicas.

3.4 CONCLUSIONES

La electroforesis mediante geles de agarosa, es una técnica simple y rápida para separar fragmentos de ácidos nucleicos y la migración de éstos depende principalmente del tamaño de la molécula y de la concentración de la matriz semisólida; sin embargo los geles de poliacrilamida presentaron mayor resolución y la separación de fragmentos es más sensible permitiendo observar diferencias sutiles entre materiales relacionados.

El sistema PAGE resultó más eficaz para apreciar con más claridad el perfil de bandas de DNA.

Los marcadores RAPDs permitieron la diferenciación entre las accesiones en estudio.

3.5 LITERATURA CONSULTADA

Becerra, V. V. y M. Paredes C. 2000. Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. *Agric. Tec.* 60 (83): 270-281.

Buzás, Z. y Chrambach, A. 1982. Un-supercoiled agarose with a degree of molecular sieving similar to that of crosslinked polyacrylamide. *Electrophoresis* 3:130-134.

Coombs, J. J., Frank, L. M., Douches, D. S. 2004. An applied fingerprinting system for cultivated potato using simple sequence repeats. *American Journal of Potato Research* 81 (4): 243-250.

De la Cruz, M., F. Ramírez and H. Hernández. 1997. DNA Isolation and Amplified from Cacti. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15: 319-325.

Fisher, S. G., Lerman, L. S. 1983. DNA fragments differing by single base pair substitutions separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1579-1583.

García, P. H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG.* 1 (2): 31-41.

García Z., E. A., G. E. García S., E. Cárdenas C., R. E. Vázquez A., F. Zavala G. y A. Gutiérrez D. 2003. Clasificación y estimación de la diversidad genética de nopal (*Opuntia* spp.) en base a descriptores fenotípicos y marcadores genético moleculares. En: G. Esparza F., M. A. Salas L., J. Mena C. y R. d. Valdez C. Memorias del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre el Cocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Zacatecas, Zac. pp 95-100.

Luna-Paez, A., Valadez-Moctezuma, E., Barrientos-Priego, A. F., y Gallegos-Vázquez C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp., mediante semilla con marcadores RAPD e ISSR y su posible uso para diferenciación. *Journal of the Professional Association for Cactus Development.* (9) 43-81.

Maniatis, T., Jeffrey, A., Kleid, D. G. B. 1975. Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 1184.

- Osorio, M.; Vegas, A. y Márquez, A. 2005. Estandarización de las condiciones para la separación electroforética de productos amplificados por microsatélites en materiales de papa. Revista Digital CENIAP HOY Número 8 2005. Maracay, Aragua, Venezuela.
- Pimienta, B. E. y Muñoz, U. A. 1995. Domestications of opuntias and cultivated varieties. In: Barbera, G., P. Inlgese, E. Pimienta-Barrios (eds.). Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO publications, Rome. pp: 58-61.
- Raymond, S., Weintraub, L. 1959. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. Science. Sep. 18: 130:711.
- Reyes, A. J. A., J. R. Aguirre R., y J. L. Flores F. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. Interciencia 30 (8): 476-484.
- Rohlf, F.J. 1992. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and multivariate analysis system, version 2.0. Department of Ecology and Evolution, State University of New York. 31p.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Gel electrophoresis of DNA. pp. 6.0-6.62. In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol I. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenza* using analytical agarose. *Biochemistry*, 12: 3055.

Scott, V. T. and J. P del Tufo. 1993. Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology*. 101: 249-352.

Sewer, P. 1983. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *Electrophoresis* 4: 375-382.

Valadez, E. y G. Kahl. 2000. Huellas genómicas de ADN de plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A.

CAPITULO 4

IV. ANÁLISIS DEL DNA DE SEMILLAS DE *Opuntia* spp CON MARCADORES RAPDs E ISSRs Y SU POSIBLE USO PARA DIFERENCIACIÓN

RESUMEN

Utilizar métodos precisos para caracterizar y diferenciar plantas en los bancos de germoplasma ahorra tiempo en la selección de genotipos elite. En ocasiones esta tarea no resulta fácil, porque dependiendo de las especies, los descriptores morfológicos pueden resultar insuficientes para separar las accesiones o especies cercanas, como es el caso de algunas variedades comerciales y accesiones locales de nopal (*Opuntia* spp.) presentes en México. El uso de marcadores de DNA también se ha limitado por el exceso de polisacáridos que se obtienen simultáneamente con esta molécula, dificultando los análisis con PCR. El DNA obtenido de semilla carece de estos metabolitos; y además de la caracterización respectiva puede aportar información relacionada con la variabilidad genética. En este estudio se caracterizaron 22 variedades de nopal con marcadores RAPDs e ISSRs utilizando DNA de semilla y separados en geles de poliacrilamida. Tanto los perfiles RAPDs como ISSRs revelaron diferencias entre las variedades y especies consideradas. Los diferentes agrupamientos mostraron concordancia entre sí, y en su mayoría se relacionaron con los grupos taxonómicos actualmente descritos con excepción de 'Burrona' y 'Camuezo' que se ubicaron en grupos genómicos no esperados. Particularmente en 'Burrona' se detectaron polimorfismos entre las repeticiones, a diferencia del resto de las variedades donde no se presentaron.

Palabras clave: nopal, variabilidad genética, distinción interespecífica, PCR, huellas de DNA, análisis multivariado.³

³ Luna, P. A.; Valadez, M. E.; Barrientos, P. A. F.; Gallegos, V. C. Publicado por Journal Professional Association for Cactus Development. 06/09/2007

DNA ANALYSIS OF SEEDS OF *Opuntia* spp WITH RAPDs AND ISSRs

MARKERS AND ITS POSSIBLE USE FOR DIFFERENTIATION

ABSTRACT

To use precise methods for characterization and to differentiate plants in the germoplasm banks saves time in the selection of elite genotypes. In occasions this work is not easy, because depending on the species, the morphological descriptors can be insufficient to separate related accessions or species, like in the case of some commercial varieties and local accessions of cactus pear (*Opuntia* spp.) native of Mexico. The use of markers of DNA has also been limited by the excess of polysaccharides that are obtained simultaneously with this molecule that makes difficult the analyses with PCR. The obtained DNA of seed lacks of these compounds and besides the characterization of seeds can contribute with information related to the genetic variability. In this study 22 cactus pear varieties were characterized with markers RAPDs and ISSRs using DNA from seeds and were separated in polyacrylamide gels. The RAPDs as ISSRs profiles revealed differences between the considered varieties and species. The different clusters showed agreement to each other, and in their majority they were related with the current taxonomic groups described except for 'Burrona' and 'Camuezo' that were located in a unrelated genomic group. Particularly in 'Burrona' polymorphism was detected among the replications, contrary to the rest of the varieties that didn't show it.

Key words: Cactus pear, genetic variability, interspecific distinction, PCR, DNA fingerprinting, multivariate analysis.⁴

⁴ Luna, P. A.; Valadez, M. E.; Barrientos, P. A. F.; Gallegos, V. C. Published by Journal Professional Association for Cactus Development. 06/09/2007

4.1 INTRODUCCIÓN

El nopal ha desempeñado un papel muy importante en el desarrollo de las culturas prehispánicas de México, debido a los usos en los que se le ha involucrado, considerando desde la alimentación para consumo humano hasta su utilidad en el ámbito religioso (Granados y Castañeda, 1991). Aún cuando su distribución se presenta desde Canadá hasta Argentina, en México se concentra una amplia diversidad genética, por lo que se ha considerado el centro de origen y diversificación más importante del género *Opuntia* (Bravo, 1978; Bravo y Scheinvar, 1999). Diferentes especies de nopal han evolucionado particularmente en las zonas áridas de América donde el aprovechamiento se realizaba por recolección, para luego establecer plantaciones de tipos sobresalientes y seleccionando los ejemplares más sobresalientes favoreciendo el origen de híbridos (Granados y Castañeda, 1991; Griffiths, 2004).

A la fecha se reconocen 189 especies, de las cuales 83 se localizan en nuestro país; pero se han documentado alrededor de 144 variantes nuevas con características agronómicamente apreciadas, pero que no se han clasificado por falta de descriptores morfológicos distintivos (Reyes *et al.*, 2005). La taxonomía del género se ha reportado complicada debido a que existe una gran sinonimia y porque en la actualidad estas plantas continúan evolucionando y por lo tanto en proceso de diferenciación; esto repercute en la semejanza de caracteres entre genotipos que interfieren en la separación adecuada de las especies (Bravo, 1978).

Reconociendo la importancia del nopal como recurso natural mexicano, se salvaguardan en bancos de germoplasma colecciones de valor comercial o agronómico que se describen desde un punto de vista morfológico y antropocéntrico. El fortalecimiento de la caracterización del nopal mexicano con herramientas alternativas permitirá conocer de forma más eficiente la diversidad fenética y genética existente en el país, apoyar su correcta ubicación taxonómica y en un momento dado contribuir en programas de mejoramiento genético para la creación de nuevas variedades que demanda el productor; así como el enriquecimiento de los bancos de germoplasma.

Los análisis con DNA se han utilizado con éxito en diferentes especies para los propósitos referidos, permitiendo conocer la relación genética e identificación de híbridos, entre otras variadas aplicaciones. Las técnicas basadas en PCR se han preferido dada su facilidad de implementación y calidad informativa. Particularmente los RAPDs se utilizan para diferenciar especies o poblaciones con variabilidad genética amplia (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002); pero para conocer el grado de parentesco genético, normalmente se recurre a marcadores conservados entre las especies tales como los SSRs y algunas variantes de la técnica. Sin embargo, aun cuando los SSRs tienen la capacidad de diferenciar a dos individuos de la misma especie, su implementación es costosa y solo funcionan para aquella sobre la cual se diseñaron (Moxon y Wills, 1999; Valadez y Kahl, 2000).

Como técnica alternativa a los SSRs pero con diferente capacidad informativa, existen los ISSRs; estos marcadores detectan regiones de DNA comprendidas

entre dos microsatélites con núcleos que comparten la misma secuencia de bases. Esta técnica, al igual que los RAPDs requiere de un iniciador dirigido y en posición invertida a los núcleos de dos microsatélites adyacentes, de manera que se amplifica la región comprendida entre ambos evidenciando posibles polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (ISSRs). Estos polimorfismos evidencian mutaciones ocurridas en esa particular región del DNA, de manera que los individuos que se comparan tenderán a agruparse en función de esas diferencias, lo que denota cierto valor en distancia genética. Tanto las técnicas de RAPDs como ISSRs se han utilizado ampliamente y de manera complementaria con fines de genotipificación; y generalmente los fragmentos detectados, tienden a ser monomórficos cuando la variabilidad genética de los organismos que se comparan es reducida, por lo que se infiere mayor relación entre ellos; sin embargo, altos índices polimórficos permiten presuponer lo contrario (Patzak, 2001; Iruela *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2003). Otra ventaja que han mostrado ambas técnicas es que los agrupamientos logrados con los datos moleculares generalmente han mostrando congruencia con aquellos establecidos con descriptores morfológicos (Wang *et al.*, 1998; Scarano *et al.*, 2002).

En el género *Opuntia* los análisis de DNA han sido escasos. Una de las razones principales es la presencia de mucílago asociado al DNA cuando se obtiene de cladodios, aún cuando se han utilizado métodos alternativos para eliminarlo. Este metabolito interfiere con la PCR (De la Cruz *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Mondragón *et al.*, 2000; Arnholdt *et al.*, 2001); la segunda razón, es el uso de

geles de agarosa para separar los productos amplificados, lo que limita marcadamente su apreciación tal como se mencionó en el capítulo 3. Sin embargo, Mondragón (2003) diferenció especies de *Opuntia* utilizando RAPDs y las agrupó por características comunes, además de sugerir posibles relaciones genéticas entre ellas. Wang *et al.*, (1998) al comparar perfiles RAPDs con datos morfológicos y fisiológicos también en accesiones de *Opuntia* spp lograron separarlas con base en diferentes usos; pero indicaron que las diferencias entre cultivares para producción de fruta fueron muy estrechas; y de acuerdo a los estudios de cruzamiento y compatibilidad entre ellas, sugirieron reconsiderar su taxonomía.

Como alternativa y para caracterización genómica del nopal es posible utilizar DNA de semilla; en primer lugar, porque carece de mucílago y además permitiría explorar el grado de variabilidad genética intra específica y posiblemente la derivada de cruzamientos entre individuos; o bien, detectar los casos de apomixis y cleistogamia que han sido reportados en *Opuntia* (Mondragón y Bordelon, 2002; Pimienta, 1990). Estas características de su reproducción han sido indicadas para *O. robusta*, *O. streptacantha*, *O. cochinera*, *O. joconostle* y *O. ficus-indica*; pero la presencia de cleistogamia ha sido reconocida en *O. robusta*, *O. cochinera* y *O. ficus-indica*; mientras que especies capaces de entrecruzarse son *O. megacantha*, *O. cochinera*, *O. robusta* y *O. streptacantha*, entre otras (Granados y Castañeda, 1991; Reyes *et al.*, 2006).

El presente estudio se centró en la búsqueda de polimorfismos de DNA de semilla de nopal utilizando las técnicas ISSRs y RAPDs, con el objetivo de caracterizar 22 accesiones pertenecientes a 10 especies del género *Opuntia*, y explorar la posibilidad de su uso para diferenciación. Se pretende que esta genotipificación sirva como eje de referencia para comparar y analizar molecularmente otros especímenes de interés para México.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material vegetal

Un total de 22 variedades de *Opuntia* (Cuadro 4.1) fueron utilizadas en el estudio procedentes del banco de germoplasma del CRUCEN Zacatecas, México.

Cuadro 4.1 Variedades de *Opuntia* analizadas con RAPDs e ISSRs.

Núm.	Accesión	Clave ¹	Especie	Núm.	Accesión	Clave ¹	Especie
1	'Camuezo'	Cmz	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	12	'Xoconostle Cuaresmero'	Xcu	<i>Opuntia matudae</i> Scheinvar.
2	'Milpa Alta'	MA	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	13	'Burrona'	Burr	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
3	'Rojo Pelón'	RP	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	14	'Cardona'	Car	<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.
4	'Vaquera'	Vaq	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	15	'Cardona de Castilla'	CC	<i>Opuntia streptacantha</i> Lem.
5	'Cristalina'	Cri	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	16	'Tapón Aguanoso'	Tag	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendl.
6	'Mango'	Man	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	17	'Tapon de Mayo'	Tmy	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendl.
7	'Morada T-10'	MT	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	18	'Zaponopal Blanco'	ZNB	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendl.

Continuación cuadro 4.1 Variedades de *Opuntia* evaluadas con RAPDs e ISSRs.

8	'Naranjón Legítimo'	NL	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	19	'Charola Tardía'	Cht	<i>Opuntia hyptiacantha</i> F.A.C. Weber
9	'Pico Chulo'	Pch	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	20	'San Juanera'	SJ	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiff
10	'Xoconostle Blanco'	Xbl	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	21	'Bolañera'	Bol	<i>Opuntia undulata</i> Griffith
11	'Xoconostle Colorado'	Xco	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	22	'Cacalote'	Cac	<i>Opuntia cochinera</i> Griffith

¹Clave referida en este estudio

4.2.2 Aislamiento de DNA

El DNA fue extraído de semillas de tres frutos maduros de plantas independientes de la misma variedad de nopal. Las muestras utilizadas consistieron de la mezcla del total de semillas de los frutos; las cuales se pulverizaron en un molino para café. El DNA se obtuvo con el procedimiento CTAB modificado por De la Cruz *et al.* (1997) y estandarizado para nuestras condiciones. Se utilizaron 0.3 g de la harina de las semillas, que fue homogenizada con 800 µL del buffer de aislamiento precalentado a 60 °C [CTAB (cetil trimetil amonio bromuro) 4 % p:v, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, 0.4 % de β-mercaptoetanol, PVP (polivinilpirrolidona) 2 %] en tubos Eppendorf. Las muestras se incubaron por 60 min a 60 °C en baño María, mezclando ocasionalmente. El DNA se extrajo adicionando un volumen proporcional (800 µL) de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) al volumen utilizado de CTAB. Después se centrifugaron por 10 min a 5000 x g y la fase acuosa se transfirió a un tubo y se trató con RNasa 100 µg·mL⁻¹ a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente se fenolizaron las muestras con 0.15 vol

de NaCl 1.5 M, 0.7 vol de fenol equilibrado y 0.3 vol de cloroformo (respecto al volumen obtenido al recobrar la fase acuosa inmediata previa), se mezcló y se centrifugó por 20 min a 5000 x g a 4 °C. Cuando fue necesario se hizo una reextracción con 1 vol de cloroformo, proporcional al volumen, obtenido después de fenolizar. El sobrenadante se transfirió nuevamente a otro tubo y se adicionó 0.6 vol de isopropanol frío con respecto al sobrenadante recuperado. Se precipitó el DNA toda la noche a -20 °C y posteriormente se recolectó por centrifugación (10 min a 8000 x g, 4 °C). El DNA condensado se lavó con 200 µL de solución de lavado (etanol 76 % y acetato de amonio 10 mM) y se recolectó por centrifugación (10 min, 5000 x g, 4 °C). Finalmente el contenido de DNA se secó por inversión del tubo y se resuspendió en 60 µL de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA, pH 8). Se almacenó a 4 °C.

La cuantificación del DNA se realizó con espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS Lambda Bio (Perkin Elmer), y su calidad se estimó en geles de agarosa 1 % en amortiguador TAE 1X (Tris-base, ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8.0). El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg·ml⁻¹ y se documentó en un transiluminador Dual Intensity UVP de luz UV TS-20 con el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

4.2.3 Amplificación con PCR y electroforesis

Los análisis RAPDs se realizaron con cinco iniciadores de la serie K (Carl Roth GMBH + Co) que detectaron huellas genómicas informativas (Cuadro 4.2), aunque previamente se habían evaluado las series A, C, E, H, y L (120 secuencias de primer), pero sin lograr información suficiente para los objetivos

del estudio. La mezcla de reacción de PCR fue de 25 μL y contenía agua bidestilada, dNTPs 500 μM , amortiguador Taq 1X, MgCl_2 25 mM, iniciador 10 pmol, DNA Taq-polimerasa (Promega) 1.5 U y DNA molde 100 ng. Las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo de pre desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 2.5 min. El paso de alineamiento se realizó a 40 °C, porque la temperatura es un factor que puede afectar la reproducibilidad de resultados en experimentos entre laboratorios, dependiendo del iniciador (Valadez y Kahl, 2000).

Cuadro 4.2 Mezcla de reacción, concentración inicial, concentración final y volumen final, cantidades para una muestra.

Reactivos	Conc. Inicial	Conc. Final	1X μL
Agua bidestilada			3.85
dNTP's	500 μM	200 μM	10
Amortiguador	10X	1X	2.5
MgCl_2	25 mM	1.5 mM	0.75
Iniciadores*	20 pmol	10 pmol	2.5
Taq-polimerasa	5 U μL	1.5 U reacción	0.3
DNA		20 ng/ μL^{-1}	5
Total			25

*Los iniciadores se adicionaron al final uno a uno en el tubo correspondiente depositando 2.5 μL de cada uno.

Los análisis ISSRs se realizaron con cinco iniciadores anclados (Cuadro 4.2) de SIGMA Co., aunque previamente también se habían evaluado otras cinco secuencias: tres ancladas BDB(CA)₇, (GACA)₄GT y (TCC)₅RY y dos sin ancla (GACA)₄, (GGAT)₄, pero cuyos productos resultaron poco informativos. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para RAPDs, excepto que se utilizaron 50 ng de DNA molde. El termociclaje utilizado consistió de 1 ciclo de pre desnaturalización a 94 °C durante 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30 s; 48 °C por 30 s para el iniciador (CA)₈ RT y 56 °C para el resto de los iniciadores; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida (29:1) 8 % (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando 2.0 µl de la mezcla de reacción con 6 µL de amortiguador de carga con formamida. Como referencia se utilizó el marcador GeneRuler de 1 kb DNA Ladder de MBI Fermentas. Los geles se corrieron a 280 voltios aproximadamente por 2.5 h en amortiguador TBE 1X y se tiñeron con AgNO₃ 0.2 % de acuerdo al protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2000). Para la documentación de las huellas de DNA se utilizó el sistema Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

4.2.4 Toma de datos y análisis

Cada banda RAPDs o ISSRs fue considerada como un carácter o locus independiente, se codificaron visualmente como polimórficas ausentes ("0") o presentes ("1") en cada uno de los genotipos. Las diferencias cualitativas entre bandas no se consideraron. Se realizaron tres repeticiones independientes incluyendo desde las reacciones de PCR, y solo aquellas bandas consistentes

se utilizaron para los análisis respectivos. La matriz básica de datos se generó con la información molecular de cada método; pero además, se realizó un análisis conjunto de combinando ambos grupos de datos (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002; Patzak, 2001). La similitud genética se estimó mediante el coeficiente de Jaccard y para la aglomeración se utilizó el método Neighbor-joining recomendado para generar agrupamientos por similitud (Sokal y Sneath, 1963). Para elaborar el árbol se utilizó el programa FreeTree Versión 0.9.1.50, considerando el método de remuestreo (“bootstrapping”) con 1000 repeticiones, obteniendo el árbol consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir *et al.*, 2001), para visualizar el árbol obtenido se utilizó el programa Tree View 1.6.6.

Se realizó un análisis factorial de correspondencias simples mediante la distancia de X^2 , que es uno de los métodos que describen el comportamiento de un conjunto de datos respecto a una serie de variables mediante la representación gráfica de los individuos en un espacio, considerando la menor cantidad (2-3) de las “n” variables. Una ventaja de este tipo de análisis, es que parte de la definición de proximidades y no considera *a priori* la pertenencia a grupos (Segura, 2003); además de que es posible obtener la varianza acumulada atribuida a los factores o variables obtenidos con los marcadores RAPDs e ISSRs, para esto se utilizó el programa NTSYSpc versión 2.10p (Applied Biostatistics, Inc.).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El DNA de semilla obtenido con las modificaciones referidas en el protocolo de extracción resultó en cantidad suficiente y con calidad óptima para los análisis con PCR. El incremento de la concentración del CTAB y el PVP adicionados al amortiguador de extracción, favorecieron tanto la lisis de las células de la semilla contenidas en 0.3 g de harina, así como la prevención de los procesos de oxidación que se pudieran presentar en las mismas (Handa *et al.*, 2005).

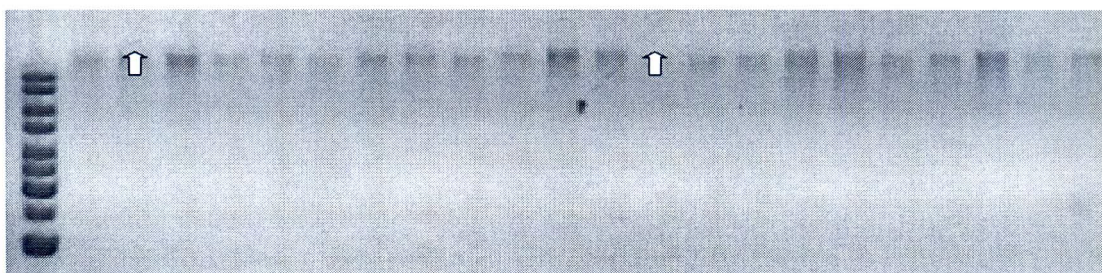


Figura 4.1 Gel de agarosa 1% donde se muestra la calidad e integridad del DNA de alto peso molecular de las 22 variedades estudiadas, se observa una banda compacta en la parte superior del gel (ver flechas). El primer carril corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de fermentas.

Los iniciadores seleccionados para PCR mostraron perfiles RAPDs e ISSRs informativos y claros; además su separación en geles de poliacrilamida revelaron mayor cantidad de huellas comparadas con las detectadas en geles de agarosa. Ambos tipos de huellas diferenciaron totalmente las 22 variedades de *Opuntia* consideradas (Figura 4.1), por lo que su utilidad para establecer diferencias inter e intra específicas fue exitosa, tal como lo refieren estudios realizados con otras especies (Nagaoka y Ogiwara 1997; Huang y Sun 2000).

La cantidad de fragmentos seleccionados para realizar los análisis estadísticos fueron en total 317, de los cuales 150 se obtuvieron con RAPDs y 167 fragmentos con ISSRs, observándose que los pesos moleculares oscilaron entre 250 pb a 3500 pb (Cuadro 4.3). Con estos datos y el método de agrupamiento utilizado se separaron tanto las accesiones como las especies, que mantuvieron concordancia con la clasificación taxonómica actual (Reyes-Agüero *et al.*, 2005), a excepción de 'Burrona' y 'Camuezo' que se agruparon en forma distinta a lo esperado (Figura 4.1 y 4.2); ya que la primera está clasificada como *O. albicarpa*, pero en nuestro estudio se relacionaron con el grupo representados *O. streptacantha*, así como 'Camuezo' clasificada como *O. megacantha* se agrupó respectivamente con 'Burrona' y aún más cercana a *O. streptacantha*. Granados y Castañeda (1991) refieren que comportamientos como lo presentado en las dos variedades mencionadas, han sido también apreciados de manera general entre especies de la familia de las cactáceas, lo cual ha complicado su taxonomía. Diferentes taxónomos han considerado que esta familia de plantas continúa en proceso activo de evolución y diferenciación dando lugar a la intergradación de caracteres, lo que dificulta la delimitación de especies y géneros dentro de la familia. De hecho, Wang *et al.* (1998) han propuesto la reclasificación de algunas accesiones de las especies *O. ficus-indica* y *O. hyptiacantha*, ya que las distancias genéticas fueron mínimas basados en los marcadores RAPDs que ellos exploraron. Por otra parte, Barrientos *et al.* (1993) al obtener 550,000 plantas derivadas de la cruce de dos genotipos de *O. amyclaea* Tenore (actualmente *O. albicarpa* Schienvvar) observó la amplia segregación de características, esto sugirió el origen híbrido

interespecífico de los progenitores, ya que se encontraron individuos con características de *O. megacantha*, *O. ficus-indica* y *O. streptacantha*, lo cual hace suponer la participaron de *O. amyclaea* Tenore (actualmente *O. albicarpa* Schienvvar) en la evolución. Estas situaciones requieren que los estudios con fines de caracterización, al menos para las especies de nopal, se complementen con otras herramientas que proporcionen mejores elementos para su taxonomía.

Cuadro 4.3 Iniciadores RAPDs e ISSRs utilizados para el análisis de genotipos de *Opuntia* spp.

Sistema	Iniciador	Secuencia	Fragmentos detectados	Fragmentos polimórficos
RAPD	K01 ¹	5'-CAT TCG AGC C-3'	25	20
	K04	5'-CCG CCC AAA C-3'	31	16
	K07	5'-AGC GAG CAA G-3'	35	15
	K-12	5'-TGG CCC TCA C-3'	33	27
	K17	5'-CCC AGC TGT G-3'	26	12
ISSR	IS01 ²	5'-AC(GACA) ₄ -3'	37	13
	IS02	5'-(AC) ₈ YG-3'	30	13
	IS03	5'-(AGAC) ₄ GC-3'	32	6
	IS05	5'-(CA) ₈ RT-3'	34	15
	IS06	5'-(GA) ₈ YC-3'	34	23

¹ Productos de Carl Roth Co.

² Productos de SIGMA Co. 'Y' sustituye residuos 'C' (citosina) y 'T' (timina); 'R' sustituye 'G' (guanina) y 'A' (adenina).

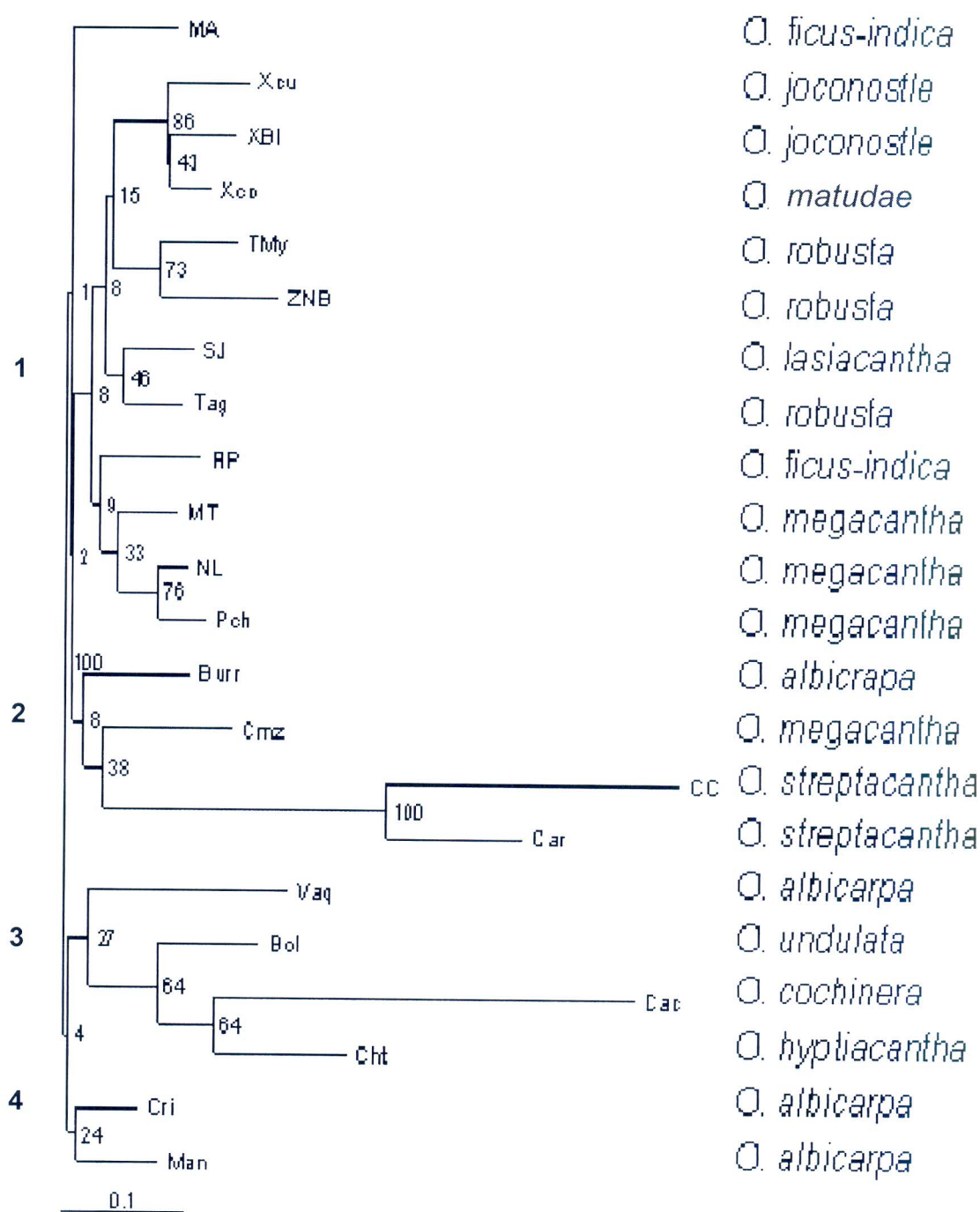


Figura 4.2 Árbol consenso conformado con datos RAPDs de 22 variedades de nopal (*Opuntia* spp). Agrupamiento realizado con el coeficiente Jaccard y el método Neighbor-Joining con 1000 remuestreos.

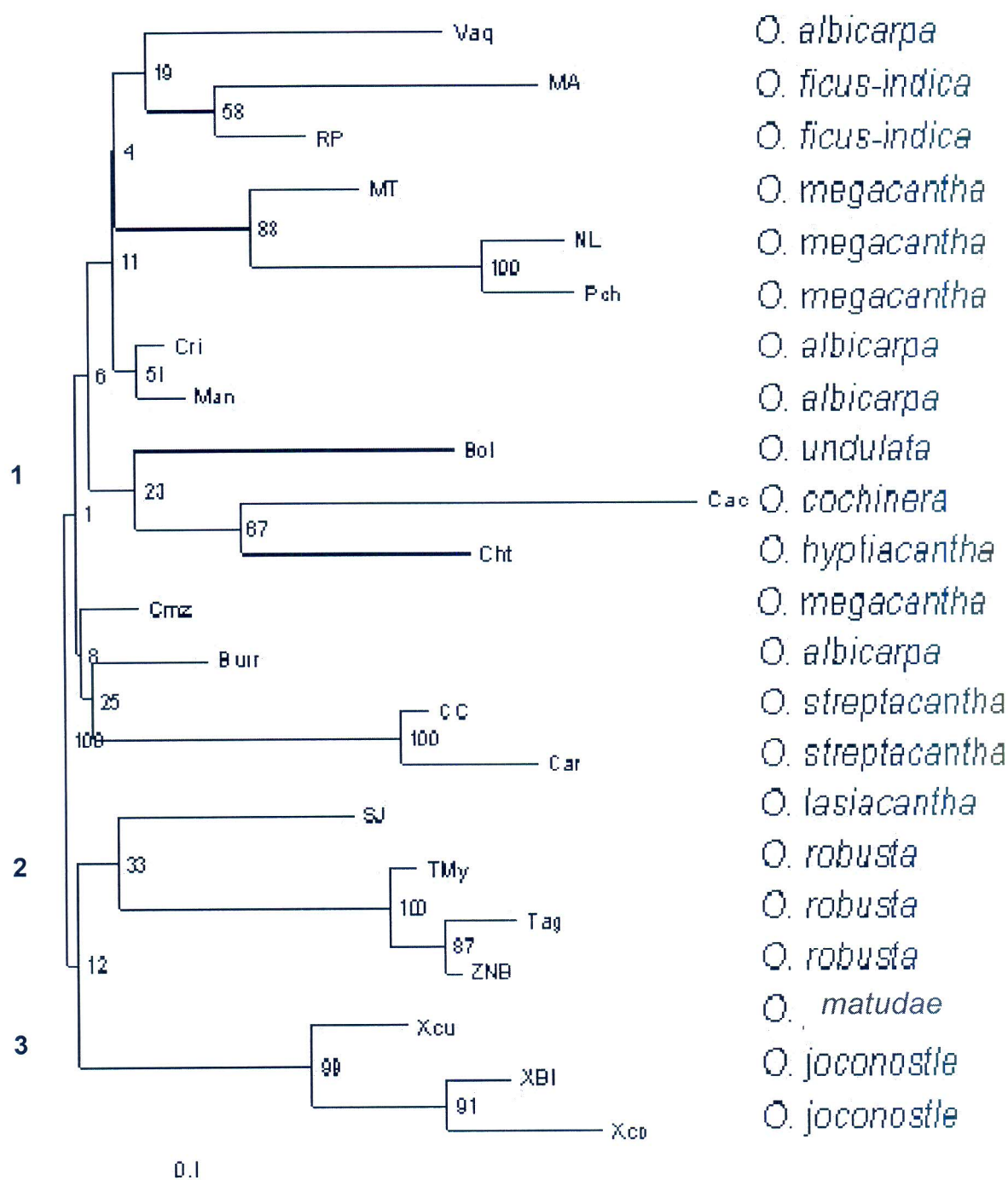


Figura 4.3 Árbol consenso conformado con datos ISSRs de 22 variedades de nopal (*Opuntia* spp). Agrupamiento realizado con el coeficiente Jaccard y el método Neighbor-Joining con 1000 remuestreos.

Los árboles de relaciones genómicas de las variedades de nopal utilizadas (Figuras 4.2 y 4.3) comparten algunos agrupamientos similares. En la Figura 4.2 se conformaron 4 grupos principales, en donde el grupo 1 mantiene juntas a las variedades de las especies *O. robusta* y *O. megacantha* y a los xoconostles; el grupo 2 contiene las variedades de *O. streptacantha*, pero además a un representante de *O. albicarpa* y otro de *O. megacantha* ('Burrona' y 'Camuezo'); el grupo 3 que contiene 3 especies diferentes representadas con un solo ejemplar, además 'Vaquera' clasificada como *O. albicarpa* y el grupo 4 que mantiene juntas a 'Cristalina' y 'Mango' de *O. albicarpa*. 'Milpa Alta' se mantuvo como grupo independiente aún cuando se esperaba su agrupamiento con las variedades 'Rojo Pelón' y 'Camuezo' clasificadas en *O. megacantha*. Cabe hacer notar que estas tres variedades se mantuvieron dispersas en el árbol, lo que sugiere que entre ellas existen pocos rasgos genómicos que impidieron su cercanía. En la Figura 4.3 que representa el árbol conformado con datos ISSRs se aprecian tres grupos principales y varios subgrupos generalmente definidos, los cuales además de mantener relación con la taxonomía basada en aspectos morfológicos, permite apreciar una relación genética más estrecha entre las variedades que conforman las especies, dados los fragmentos que se compararon. El grupo 1 contiene juntas a las tres variedades de *O. megacantha*, a dos de *O. ficus-indica* y dos de *O. albicarpa*, además de las especies representadas por un solo ejemplar (*O. undulada*, *O. cochinera* y *O. hyptiacantha*); sin embargo, 'Vaquera' se agrupó con variedades de *O. ficus-indica* en lugar del grupo de *O. albicarpa*. El agrupamiento 2 está representado por las variedades de *O. streptacantha*, pero además contiene a las 'Camuezo'

y 'Burrona', aunque el nivel de relación genómica es más estrecho entre estas dos últimas. El grupo 3 mantiene juntas a las variedades de *O. robusta* incluyendo a 'San Juanera' y los xoconostles. El comportamiento genómico que mantuvieron en ambos análisis a 'Vaquera', 'Burrona' y 'Camuezo,' sugiere que deben compartir ciertos rasgos fenotípicos comunes a *O. albicarpa*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica* que les han permitido ubicarlas en esas especies, por ejemplo, tal como se observó en el agrupamiento por su morfología de semilla (Guerrero *et al.*, 2006), pero las huellas genómicas, que no son influidas por el ambiente indicaron diferencias. Otras posibles explicaciones que se podrían considerar en el comportamiento de estas tres variedades, es la posibilidad de recombinación genética; o bien representar individuos atípicos que no representen a las variedades referidas, que estén mal clasificadas en el banco de germoplasma, incluso que se requiera su reclasificación, tal como en otros casos se ha sugerido con otras accesiones (Wang *et al.*, 1998).

Con los datos moleculares de RAPDs y de ISSRs integrados se construyó un árbol en el que los agrupamientos de las dos ramas principales se distribuyeron en lo general por el grado de domesticación de las variedades consideradas. En el grupo A se encuentran las variedades cultivadas ('Burrona' *O. albicarpa* y 'Camuezo' *O. megacantha*) relacionadas con algunas poco domesticadas (*O. streptacantha*, *O. undulada*, *O. cochinera* y *O. hyptiacantha*). En el agrupamiento B se ubicaron especies consideradas como silvestres (*O. lasiacantha* y *O. robusta*) además de los xoconostles (*O. joconostle*) y *O. megacantha* que se caracterizan por tener mayor grado de domesticación.

También se observó que la relación de similitud entre las variedades de las especies del grupo B es más estrecha; inclusive, se encuentran en este grupo 'Naranjón Legítimo' y 'Pico Chulo' (*O. megacantha*) que mantienen la menor distancia genética (0.06429). En el grupo A se encuentran las variedades con la mayor distancia genética (0.66216) 'Cacalote' y 'Cardona' (*O. cochinera* y *O. streptacantha*). Sin embargo, la relación entre los dos grupos mayores (A y B) es estrecha, dado que la separación ocurre a poca distancia del origen. Este comportamiento entre las variedades de nopal en estudio, se considera lo suficientemente sólido debido al análisis aplicado de remuestreo ("bootstrapping"). La relación que han mostrado en nuestros análisis 'Burrona' (*O. albicarpa*) y 'Camuezo' (*O. megacantha*) sugiere considerar la posibilidad de entrecruzamiento entre especies del género *Opuntia* (Pimienta 1995; Reyes *et al.*, 2005) o su reclasificación.

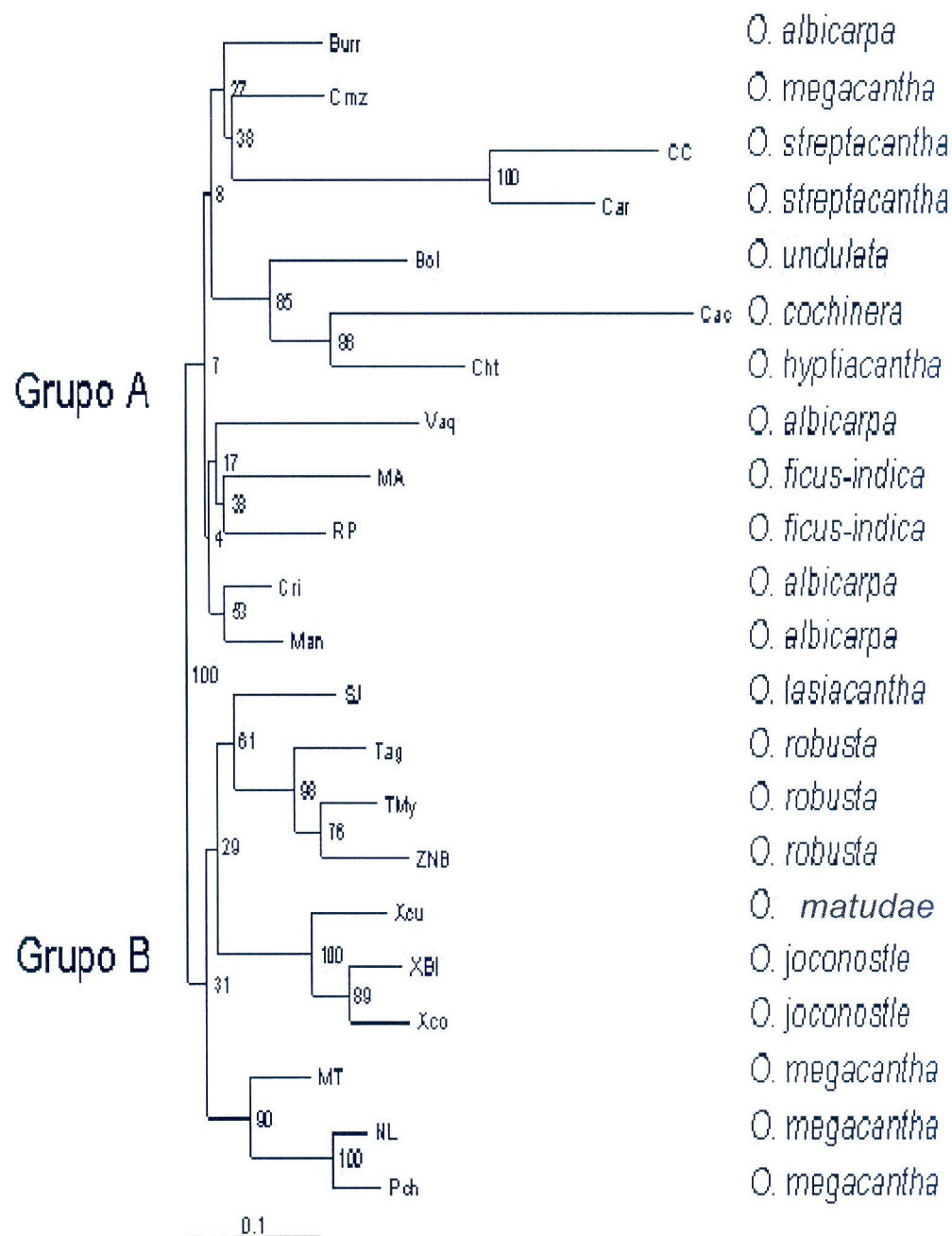


Figura 4.4 Árbol consenso obtenido a partir de los datos RAPDs e ISSRs de 22 variedades de *Opuntia* utilizando el coeficiente Jaccard y el método de agrupamiento Neighbor-Joining con 1000 remuestreos.

El resultado del análisis de correspondencias simples (Figura 4.5) basado en la distancia de X^2 permitió observar las tendencias de los individuos respecto a la serie de variables (huellas de DNA) consideradas. Además, permitió analizar la contribución de factores a la varianza, manifestando que el 54.79 % se puede explicar con los primeros cuatro factores (Cuadro 4.3). Por otro lado, se aprecia la asociación de las variedades y los vectores que generaron a cada grupo. Esta representación tridimensional revela la concordancia, con el árbol de consenso (Figura 4.4), donde se mantienen los agrupamientos por especie y la generación de un grupo para las variedades con un solo ejemplar que representan especies diferentes pero con cierto grado de asociación. También se guarda la asociación de 'San Juanera' con *O. robusta* y se advierte la aglomeración de las accesiones de *O. albicarpa* y *O. ficus-indica* en el origen de los vectores, señalando el grado de similitud entre estas dos especies.

De estos dos grupos formados en el árbol consenso (Figura 4.4), se observa que en el grupo B se asocian los xoconostles, *O. lasiacantha*, *O. megacantha*. Mientras que en el grupo A están especies de *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha*, *O. megacantha*, *O. ficus-indica*, *O. albicarpa*, *O. undulata* y *O. cochinera*.

En el árbol generado se encontró que las especies estudiadas son octaploides (8x), con excepción de *O. robusta* que puede tener individuos tetraploides (4x) (Segura *et al.*, 2006) y diploides (2x) (Barrientos *et al.*, 1993), sin embargo tampoco se encontró asociación con este aspecto entre las variedades estudiadas ya que no se observó ninguna tendencia de asociación entre las variedades que poseen la misma carga cromosómica. Observándose en el

grupo A todos las variedades integrantes son 8x, en tanto que en el grupo B se encuentran variedades 8x y 4x inclusive la especie *O. megacantha* esta presente en ambos agrupamientos A y B. Este comportamiento nos hace suponer que el nivel de ploidía no representa un factor que influya directamente en la generación de perfiles electroforéticos, ni tampoco en la conformación de agrupamientos.

Cuadro 4.4 Eigenvalores y la contribución en porcentaje derivado del análisis de correspondencia de 22 accesiones de *Opuntia* spp utilizando marcadores RAPDs e ISSRs.

	Eigenvalor	Porcentaje (%)	Porcentaje acumulado (%)
1	0.0390	18.49	18.49
2	0.0360	17.07	35.55
3	0.0232	10.99	46.54
4	0.0174	8.24	54.79
5	0.0158	7.52	62.30
6	0.0125	5.94	68.24
7	0.0085	4.06	72.30
8	0.0076	3.59	75.89
9	0.0074	3.50	79.39
10	0.0065	3.10	82.49
11	0.0063	3.00	85.49
12	0.0049	2.31	87.81
13	0.0044	2.08	89.89
14	0.0038	1.81	91.69
15	0.0035	1.65	93.34

Continuación cuadro 4.4 Eigenvalores y la contribución en porcentaje derivado del análisis de correspondencia de 22 accesiones de *Opuntia* spp utilizando marcadores RAPDs e ISSRs.

16	0.0033	1.58	94.92
17	0.0030	1.43	96.35
18	0.0027	1.26	97.61
19	0.0020	0.96	98.58
20	0.0016	0.77	99.35
21	0.0014	0.65	100.00

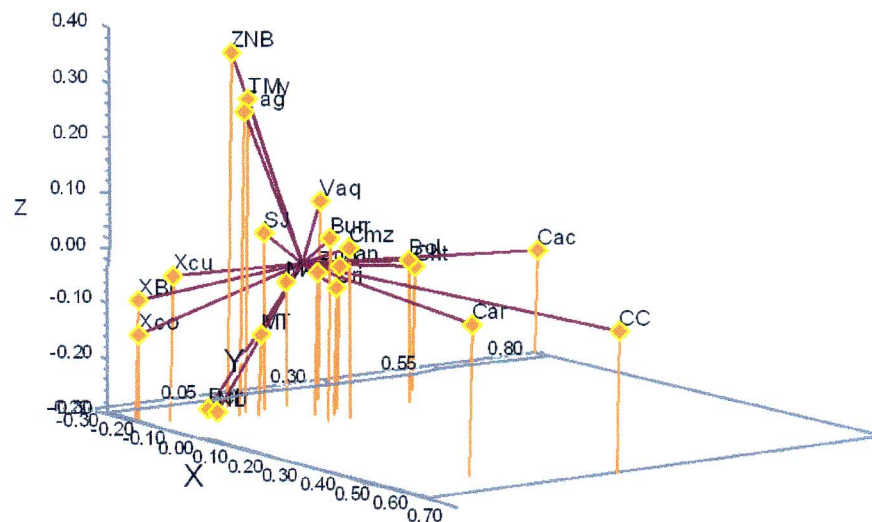


Figura 4.5 Proyección de 22 accesiones de *Opuntia* generado con tres factores obtenido por análisis de correspondencias simples, utilizando marcadores RAPDs e ISSRs.

Otro resultado interesante derivado de los análisis con DNA de semillas fue la posibilidad de detectar polimorfismos entre repeticiones, esta situación se

presentó solamente en 'Burrona' que pueden referir re-arreglos en el DNA provocados posiblemente por recombinación genética o efectos de mutación; sobre todo si se considera que esta variedad presenta poliploidía (Pimienta, 1990).

En la Figura 4.6 se muestran los perfiles independientes de DNA de tres repeticiones de la variedad 'Burrona' de las muestras de semilla analizadas (A, B y C son repeticiones). En este mismo sentido, y dado que no se detectaron diferencias en las huellas genómicas entre las repeticiones del resto de las variedades estudiadas, este comportamiento sugiere que el DNA proveniente de semilla no necesariamente es resultado de recombinación genética, sino que puede tener su origen en los fenómenos de cleistogamia lo cual puede derivar en homocigosis, o apartir de embriones asexuales generados por apomixis (Mondragón y Bordelon, 2002; Mondragón, 2004).

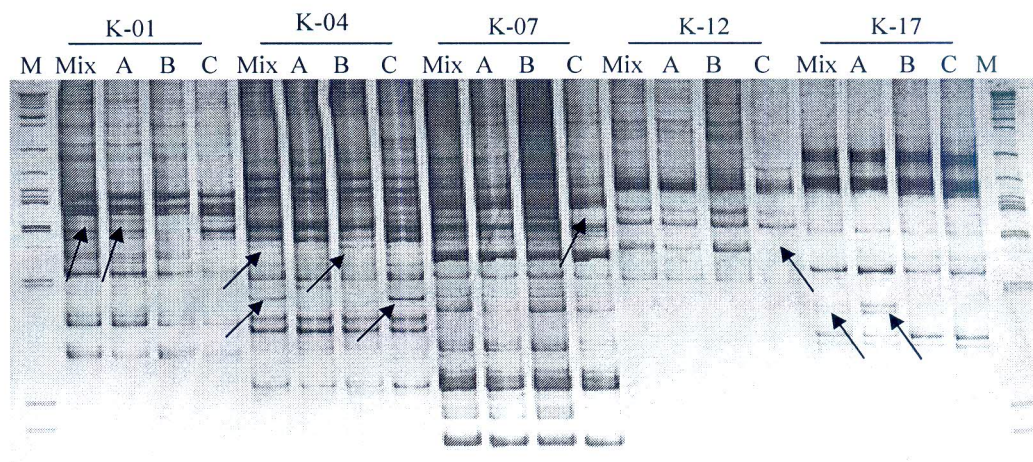


Figura 4.6 Perfiles RAPDs detectados con 5 iniciadores en la variedad 'Burrona' (*Opuntia albicarpa* Scheinvar). Repeticiones A, B y C de semillas de plantas independientes. (Mix: mezcla de semillas de las plantas A, B y C). Carril M

corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb de fermentas. Las flechas señalan algunos polimorfismos detectados entre repeticiones.

4.4 CONCLUSIONES

La utilización de semilla para realizar análisis genéticos en nopal permitió detectar perfiles de DNA reproducibles y nítidos.

Los perfiles de DNA detectados con RAPDs e ISSRs permitieron diferenciar las 22 accesiones de nopal consideradas en este estudio, de la misma forma que lo han logrado los caracteres morfológicos; así como observar la relación genómica entre las especies, con la excepción de 'Burrona' y 'Camuezo'.

Las técnicas RAPDs e ISSRs combinadas permiten separar en su mayoría las accesiones cultivadas de las poco domesticadas y las silvestres.

Los análisis con DNA aportan información valiosa para relacionar a especies de *Opuntia*, además de que complementa la caracterización realizada con otros tipos de variable.

4.5 LITERATURA CITADA

- Arnholdt, S. B.; G. L. Coe R.; M. Llamoca, Z. and A. P. F. Campos. 2001. Genome Characterization of *Opuntia ficus-indica*: A simple and efficient micromethod. Journal of the Professional Association for Cactus Development 4: 57-65.
- Barrientos, P. F.; A. Muratalla, L. and A. F. Barrientos, P. 1993. New hybrids of *Opuntia*, Chapter 18. pp. 243-251. In: Biotechnology for Aridland Plants. IC2 Institute The University of Texas at Austin. Austin, TX, USA.
- Bravo H., E. 1978. Las Cactáceas de México. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. D. F., México. 743 p.
- Bravo, H., H. y L. Scheinvar. 1999. El Interesante Mundo de las Cactáceas. 2da edición. Fondo de Cultura Económica. D. F., México. 233 p.
- De la Cruz, M., F. Ramírez and H. Hernández. 1997. DNA isolation and amplified from cacti. Plant Molecular Biology Reporter 15: 319-325.
- Fernández, M., A. Figueiras and C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics 104 (5): 845-851.
- Granados S., A. y A. D. Castañeda P. 1991. El Nopal. Historia, Fisiología, Genética e Importancia Frutícola. Editorial Trillas. D. F., México. 227 p.

Griffiths, P. M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany 91: 1911-1921.

Guerrero, M. P.; H. A. Zavaleta, M.; A. F. Barrientos, P.; C. Gallegos, V.; C. A. Nuñez, C. y E. Valadez, M., J. A. Cuevas, S. 2006. Técnica para el estudio de la micromorfología interna de semillas duras en *Opuntia*. Revista Fitotecnia Mexicana. 29 (2):37-43.

Handa, L., B. P. de T. Sampaio and R. C. Quisen. 2005. Cultura in vitro de embriões e de gemas de mudas de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke). Acta Amazonica 35 (1): 29-33.

Huang, J. C.; M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetics 100 (7): 1050-1060.

Iruela, M., J. Rubio, J. I. Cubero, J. Gil and T. Millán. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104 (4): 643-651.

Martins, M., R. Tenreiro and M. M. Oliveira. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 22 (1): 71-78.

Mondragón, J. C.; N. Doudareva and B. Bordelon, 2000. DNA extraction from several cacti. HortScience 35 (6): 1121-1126.

- Mondragón, J. C. y B. Bordelon. 2002. Presencia de apomixis en cruzas de nopales mexicanos y su identificación molecular preliminar. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25 (3): 247-252.
- Mondragón, J., C. 2003. Molecular characterization using RAPDs of a cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from central México as a basis for plant breeding. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9 (1): 97-114.
- Mondragón, J. C. 2004. Mejoramiento genético del nopal: Avances al 2003 y perspectivas, pp. 49-71. *In: El Nopal: Tópicos de Actualidad*. Esparza, F. G.; Valdez, C., R. D.; Méndez, G., S. J. (eds.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Moxon, R. and C. Wills. 1999. DNA Microsatellites: Agents of evolution?. *Scientific American* 280 (1): 72-77.
- Nagaoka, T. and Y. Ogiwara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94 (5): 597-602.
- Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121 (1): 9-18.
- Pimienta Barrios, E. 1990. El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. 246 p.

- Pimienta, B. E. and A. Muñoz, U. 1995. Domestication of *Opuntias* and cultivated varieties, pp. 58-61. *In*: Barbera, G.; Inlgese, P.; Pimienta-Barrios, E. (eds.). *Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*. International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. FAO publications. Rome, Italy.
- Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath, 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44 (5): 763-772.
- Reyes, A. J. A.; J. R. Aguirre R., and J. L. Flores F. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (*Cactaceae*) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia* 30 (8): 476-484.
- Reyes, A. J. A.; J. R. Aguirre R.; A. Valiente, B. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* 64: 549-585.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Gel electrophoresis of DNA. pp. 6.0-6.62. *In*: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol I. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Scarano, M. T., L. Abbate, S. Ferrante, S. Lucretti, and N. Tusa. 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Reports* 20 (12): 1162-1166.
- Segura L., S. D. 2003. Diversidad morfológica interespecífica del subgénero *Tacsonia* (*Passiflora*), pp. 79-84. *In*: *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. (eds.) Franco, T. L. e

Hidalgo, R. Boletín Técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia.

Segura L., S., L. Scheinvar, G. Olalde, S. Leblanc, S. Filardo, A. Muratalla, C. Gallegos, and C. Flores. 2006. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. Series *Stretacanthae* Britton *et* Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravonae* Schienvar and *Robustae* Britton *et* Rose. Genetic Resources and Crop Evolution (in press).

Sokal, R. R. and P. H. A. Sneath. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. H. Freeman & Company, San Francisco, Cal., USA. 359 p.

Valadez, E. y G. Kahl. 2000. Huellas Genómicas de ADN de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. D. F., México. 147 p.

Vladimir, H., A. Pavlícek and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 731-735.

Wang, X., P. Felker, D. M. Burow and H. A. Paterson. 1998. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. Journal of the Professional Association for Cactus Development 3: 3-14.

CAPITULO 5

V. ESTIMACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN SEMILLAS DE ESPECIES DE *OPUNTIA* CON MARCADORES GENETICO MOLECULARES

RESUMEN

Se llevó a cabo la exploración de la diversidad y variación genética intra e interespecífica de poblaciones de semillas de 52 materiales *Opuntia* spp., utilizando cinco iniciadores RAPDs y cinco ISSRs. Se obtuvieron 94 fragmentos RAPDs polimórficos y 70 fragmentos ISSRs, los perfiles de DNA obtenidos presentaron nitidez y fueron reproducibles. Los resultados muestran que la información genómica explorada con estos iniciadores no presenta variación por efecto de recombinación genética, salvo en tres materiales ('Burrona', 'Blanca San José' y 'Blanca la Gavia'). Los agrupamientos estadísticos conformados reflejan en cierta manera la asociación de algunas de las variedades utilizadas, principalmente de las especies *O. sterptacantha*, *O.robusta*, y *O. megacantha* y en el grupo de los xoconostles.⁵

⁵ Luna, P. A.; Valadez, M. E.; Barrientos, P. A. F.; Gallegos, V. C. Será enviado a Journal Professional Association for Cactus Development.

GENETIC VARIATION ESTIMATE OF *OPUNTIA* SPECIES DETECTED IN SEEDS WITH MOLECULAR-GENETIC MARKERS

ABSTRACT

The exploration of the genetic diversity, and interspecific and intraspecific genetic variation of seed populations of 52 plant materials of *Opuntia* spp, using five primers RAPDs and ISSRs, was carried out. Ninety four polymorphic RAPD fragments and 70 ISSR polymorphic fragments were obtained; the DNA profiles obtained were clear and repeated faithfully. This results show that the genomic information explored with these primers does not present variation by effect of genetic recombination, except in three materials ('Burrona', 'Blanca San José' y 'Blanca la Gavia'). The conformed clusters reflect the association of species of some varieties studied, mainly the species *O. streptacantha*, *O. robusta*, *O. megacantha* and the *xoconostles* group.

Key words. Cactus pear, DNA, PCR, diversity, species, varieties.⁶

⁶ Luna, P. A.; Valadez, M. E.; Barrientos, P. A. F.; Gallegos, V. C. To be submitted to Journal Professional Association for Cactus Development.

5.1 INTRODUCCIÓN

La conservación y aprovechamiento de los recursos fitogenéticos se ha vuelto estratégica para cualquier nación y México cuenta con una enorme riqueza de estos recursos, entre los que figura el género *Opuntia* con gran cantidad de especies reportadas a la fecha, algunas de ellas endémicas (Bravo, 1978; Pimienta y Muñoz, 1995; Guzmán *et al.*, 2003).

El nopal se cultiva para diversos usos y en regímenes climáticos variados favorecido por su amplia base genética. Debido a la interacción con el ambiente en que se desarrollan las especies, se propicia la variabilidad de fenotipos adaptados a diferentes condiciones (Bravo y Scheinvar 1995). Además se genera variabilidad genética como respuesta a los procesos de mutación, manipulación humana y a la hibridación natural generando materiales aloploidos de progenie fértil (Pimienta y Muñoz 1995; Griffiths, 2004; Reyes *et al.*, 2006).

Actualmente se han establecido en México Bancos de Germoplasma del género *Opuntia* los cuales salvaguardan genotipos con valor agronómico, pero en ocasiones la organización genética y las relaciones entre las accesiones se desconoce limitando su utilidad (Mondragón, 2004).

La taxonómica del género *Opuntia* es ambigua debido a la amplia variabilidad morfológica de sus variantes. Se han reconocido 189 especies, de las cuales 83 se localizan en nuestro país; sin embargo existen otras que no es fácil ubicarlas en alguna especie considerando solamente sus caracteres morfológicos (Guzmán *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2005). Al respecto, algunos autores han

planteado que por razones prácticas se ha establecido la diferenciación entre algunas de ellas como es el caso de *O. ficus-indica*, *O. streptacantha*, *O. megacantha* y *O. amictae* (Kiesling, 1998); el mismo autor cita además que algunos otros autores consideran que *O. ficus-indica* es en realidad la forma hortícola sin espinas de la forma silvestre con espinas descrita como *O. megacantha* y que varios nombres específicos de las series *Streptacanthae* y *Ficus-indicae* corresponden a variaciones morfológicas menores de *O. megacantha*, por lo que estas dos especies son sinónimos pero se distinguen por presentar o no espinas. Estudios realizados con isoenzimas para evaluar ejemplares con este carácter, no distinguieron entre los materiales utilizados; sin embargo, por razones prácticas se prefiere seguir utilizando la presencia o ausencia de espinas aunque no sea el más adecuado para diferenciar formas o cultivares. Un aspecto adicional que expone Kiesling (1998) es referente a que la grana cochinilla *Dactilopus coccus* tiene preferencia por *O. ficus-indica* y a su vez por las especies *O. megacantha*, *O. streptacantha* y *O. cordobensis*, mismas que el autor sugiere como sinónimos.

La variabilidad a la que se hace referencia es la que se expresa y corresponde a características cualitativas (fenotipo) como se puede observar en la Figuras 2.1 y 2.2 del capítulo 2 de este trabajo; sin embargo la variabilidad no visible presente al interior del genoma de la planta (genotipo) es mayor aún y es por ello que se recurre a la detección de marcadores moleculares como un aporte a la comprensión de la evolución, parentesco y variabilidad genética.

Los análisis de DNA se han utilizado con éxito para diferenciación de genotipos, estimación de diversidad genética y filogenia (Huang y Sun, 2000; Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002) estos análisis permiten apoyar la taxonomía de organismos. Pero también son de gran utilidad para distinguir cultivares con poco contraste morfológico o reducida variación genética, como sucede en la mayoría de las plantas propagadas vegetativamente y este es el sistema de propagación típico del nopal.

Los estudios de DNA en nopal, tradicionalmente se han realizado a partir de cladodio, en correspondencia con los estudios de clasificación morfológica; sin embargo, como señala Bravo (1978) la clasificación de *Opuntia* ha sufrido reestructuración y es confusa, debido al proceso de evolución al que todavía están sometidas las especies y variedades que componen el género. Esto ha dificultando la delimitación de especies, incluso debido a la adaptación se han conformado ecotipos (Bravo, 1978; Granados y Castañeda, 1991).

Para el caso del género *Opuntia* el uso de cladodios es la vía tradicional de la que parten casi todos los estudios de descripción y caracterización de nopal y xoconostle, debido a que las guías técnicas para la descripción de variedades aprobadas por la UPOV (Internacional Union for the Protection of New Varieties of Plants) ha reconocido su importancia, y por eso demanda la utilización de cladodios para la descripción correspondiente, además de descriptores de flor y fruto. Sin embargo, el uso de DNA purificado de estas estructuras viene acompañado de mucílago que dificulta los análisis moleculares (De la Cruz *et al.*, 1997; Arnholdt *et al.*, 2001; Mondragón *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2007).

Muy pocos estudios se han realizado a partir de semilla de nopal con fines de caracterización y menos son los que han utilizado DNA de semilla para estudios de genotipificación, sesgando la importancia que tienen diversos fenómenos de reproducción que han sido reportados en *Opuntia*. De igual manera el análisis de DNA a partir de cladodio limita la posibilidad de inferir sobre dichos eventos (apomixis, cleistogamia o hibridación) que pueden explorarse mediante análisis de semilla. Estos eventos de reproducción poseen gran relevancia sobre todo cuando se desea analizar la variabilidad, ya que por la reducida base genética que el sistema de propagación clonal induce, es probable que no se pueda observar la diferenciación entre individuos, sesgando la importancia de los efectos de la recombinación genética que pueden observarse cuando se utiliza la semilla para caracterización en nopal. Además de que algunos de los fenómenos de reproducción entre accesiones de nopal solamente pueden ser inferidos utilizando el DNA de la semilla.

Varios sistemas de marcadores de DNA están asociados al análisis de huellas genómicas de germoplasma de plantas, pero su utilidad en cultivos particulares es limitada. No obstante la técnica RAPDs puede por si misma identificar cultivares o accesiones genéticamente relacionadas y organizar los recursos genéticos en apoyo del mejoramiento (Mondragón, 2003). Esto es posible debido a que los marcadores RAPDs generan huellas genómicas a partir de la exploración de la totalidad del genoma, favoreciendo la capacidad de evidenciar polimorfismos clave entre las especies o variedades y han sido de utilidad en una gama amplia de cultivos con fines de diferenciación, lo que los hace

pertinentes para establecer relaciones genéticas y detectar variabilidad (Fernández, 2002; Iruela, *et al.*, 2002; Raina *et al.*, 2001).

Debido a las cualidades intrínsecas de la técnica, no necesariamente se requieren demasiados análisis para establecer una caracterización genómica con fines de diferenciación. Los agrupamientos basados en similitud con marcadores RAPDs han mostrado congruencia con aquellos estudios realizados con descriptores morfológicos.

Particularmente el género *Opuntia*, ha sido poco estudiado mediante análisis de DNA pero algunos estudios reportados centran su interés en diferenciar algunos genotipos de *O. ficus-indica*. Mondragón, (2003) realizó una caracterización de algunos representantes de *Opuntia* mediante RAPDs y logró diferenciar y agrupar los individuos utilizados por características comunes, además de sugerir posibles relaciones de parentesco entre algunos de sus materiales analizados. Por otra lado, Wang *et al.*, (1998) al comparar perfiles RAPDs con datos morfológicos y fisiológicos en accesiones de *Opuntia* spp pudieron agruparlas por su uso, y lograron diferenciar las variedades ornamentales, de las de fruta y de las de verdura. Pero indicaron que las diferencias entre cultivares para fruta fueron muy estrechas y de acuerdo a los estudios de cruzamiento y compatibilidad entre ellos, sugieren que la designación de especies debería ser reconsiderada.

Otra técnica utilizada en estudios de caracterización son los ISSRs, estos marcadores detectan regiones de DNA comprendidas entre dos microsatélites con núcleos que comparten la misma secuencia de bases. Esta técnica es

similar a los RAPDs, requiere de un iniciador dirigido y en posición invertida a los núcleos de dos microsatélites adyacentes, de manera que se amplifica la región comprendida entre ambos evidenciando posibles polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (ISSRs). Estos polimorfismos evidencian mutaciones ocurridas en esa particular región del DNA, de manera que los individuos que se comparan tenderán a agruparse en función de esas diferencias, lo que denota cierto valor en distancia genética (Huang y Sun, 2000; Raina *et al.*, 2001).

Tanto la técnica de RAPDs como ISSRs se han utilizado ampliamente y de manera complementaria con fines de genotipificación (Fernández 2002; Huang y Sun, 2000; Raina *et al.*, 2001). Generalmente los fragmentos detectados, tienden a ser monomórficos cuando la variabilidad genética de los organismos que se comparan es reducida, por lo que se infiere mayor relación entre ellos; sin embargo, altos índices polimórficos permiten presuponer lo contrario (Patzak, 2001; Iruela *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2003). Otra ventaja que han mostrado ambas técnicas es que los agrupamientos logrados con los datos moleculares generalmente han mostrando congruencia con aquellos establecidos con descriptores morfológicos (Wang *et al.*, 1998; Scarano *et al.*, 2002).

Con la finalidad de evidenciar la variabilidad genética de variedades y especies de *Opuntia* se utilizaron semillas de 52 accesiones de nopal para obtener huellas de DNA con marcadores RAPDs e ISSRs y utilizarlas para agrupar aquellas accesiones y especies con mayor similitud genómica.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal. 52 variantes de *Opuntia* obtenidas del banco de germoplasma del CRUCEN Zacatecas de la Universidad Autónoma Chapingo se utilizaron en el presente estudio (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1 Accesiones de *Opuntia* spp incluidas en el estudio.

Núm.	Accesión	Clave ¹	Especie	Núm.	Accesión	Clave ¹	Especie
1	'Camuezo'	Cmz	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	27	'Rojo Lirio'	RL	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.
2	'Milpa Alta'	MA	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller.	28	'Amarilla Plátano'	Amp	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.
3	'Rojo Pelón'	RP	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller.	29	'Amarilla Montesa'	Amt	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.
4	'Vaquera'	Vaq	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	30	'Amarilla Jarro'	Ajr	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.
5	'Cristalina'	Cri	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	31	'Amarilla Miquihuana'	Amq	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiffer.
6	'Mango'	Man	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	32	'Amarilla Zacatecas'	Amz	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
7	'Morada T-10'	MT	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	33	'Bola de Masa'	BM	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
8	'Naranjón Legítimo'	NL	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	34	'Cascarón'	Cas	<i>Opuntia chaveña</i> .
9	'Pico Chulo'	Pch	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.	35	'Chapeada'	Cha	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
10	'Xoconostle Blanco'	Xbl	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	36	'Atlixco'	Atl	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Miller.

Continuación cuadro 5.1 Accesiones de *Opuntia* spp., incluidas en el estudio.

11	'Xoconostle Colorado'	Xco	<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	37	'Blanca San José'	BSJ	<i>O. albicarpa</i> Scheinvar.
12	'Xoconostle Cuaresmero'	Xcu	<i>Opuntia matudae</i> Scheinvar.	38	'Blanca la Gavia'	BG	<i>O. albicarpa</i> Scheinvar.
13	'Burrona'	Burr	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.	39	'Memelo'	Mem	<i>Opuntia (affinis) hyptiacantha</i> F.A.C. Weber
14	'Cardona'	Car	<i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire.	40	'Fafayuca'	Faf	<i>O. albicarpa</i> Scheinvar.
15	'Cardona de Castilla'	CC	<i>Opuntia streptacantha</i> Lemaire.	41	'Alfajayucan'	Alf	<i>O. albicarpa</i> Scheinvar.
16	'Tapón Aguanoso'	Tag	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendland.	42	'Torreoja'	Trr	<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck.
17	'Tapon de Mayo'	Tmy	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendland.	43	'Amarilla Jalpa'	Amj	<i>O. ficus-indica</i> (L.) Miller.
18	'Zaponopal Blanco'	ZNB	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendland.	44	'Tuna Rosa'	TR	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
19	'Charola Tardía'	Cht	<i>Opuntia hyptiacantha</i> F.A.C. Weber	45	'Amarilla Oro'	Amo	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
20	'San Juanera'	SJ	<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeiffer.	46	'Zaponopal Rojo'	ZNR	<i>Opuntia robusta</i> H.L. Wendland.
21	'Bolañera'	Bol	<i>Opuntia undulata</i> Griffiths.	47	'Rosa de Castilla'	RC	<i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.
22	'Roja San Martín'	RSM	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.	48	'Rubí Reyna'	RR	<i>O. albicarpa</i> Scheinvar.
23	'Pabellón'	Pab	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.	49	'Tuna Mansa'	TM	<i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar.
24	'Rojo Vigor'	RVi	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.	50	'Villanueva'	Vill	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.

Continuación cuadro 5.1 Accesiones de *Opuntia* spp., incluidas en el estudio.

25	'Copena F-1'	CF1	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.	51	'Rojo Azteca'	RAz	<i>Opuntia</i> <i>megacantha</i> Salm-Dyck.
26	'Copena V-1'	CV1	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.	52	'Rojo Chicle'	RCh	<i>O. ficus-indica</i> (L.). Miller.

^zClave referida en este estudio

5.2.2 Aislamiento de DNA genómico y cuantificación

Para extraer el DNA de semillas se utilizó una mezcla de semillas de tres frutos maduros procedentes de plantas independientes de la misma accesión de nopal, se lavaron y se secaron. Las muestras se pulverizaron en un molino para café. El DNA se obtuvo de acuerdo al procedimiento CTAB modificado por De la Cruz *et al.*, (1997). Además se incrementó la concentración de CTAB al 4 % y se incluyó al 2% PVP en el amortiguador de extracción, también se fenolizó el DNA (Luna *et al.*, 2007).

La cuantificación del DNA genómico se realizó con espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda Bio. La calidad de este DNA se determinó por electroforesis en agarosa 1 %, en amortiguador de corrimiento TAE 1X (Trisbase, ácido acético glacial, EDTA 0.5 M pH 8.0), la tinción del DNA se realizó con bromuro de etidio 0.5 µg·mL⁻¹ y se documentó en un transiluminador Dual Intensity UVP de luz ultravioleta TS-20 con el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

5.2.3 PCR y electroforesis

Los análisis RAPDs se realizaron con 5 iniciadores de la serie K (Carl Roth GMBH + Co) que revelaron huellas genómicas informativas (Cuadro 5.2) previamente evaluados por Luna *et al.*, (2007). La mezcla de reacción de PCR se llevó hasta 25 µL adicionando los siguientes reactivos agua doblemente estéril, 500 µM dNTPs, amortiguador Taq 1X, 25 mM de MgCl₂, 10 pmol de iniciador, 1.5 U de DNA Taq-polimerasa (Promega) y 100 ng de DNA molde. Las condiciones de termociclaje fueron: 1 ciclo de pre desnaturalización a 94 °C por 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 2.5 min. El paso de alineamiento se realizó a 40 °C, porque la temperatura es un factor que puede afectar la reproducibilidad de resultados entre los experimentos, dependiendo del iniciador (Valadez y Kahl, 2000).

Los análisis ISSRs se realizaron con cinco iniciadores anclados (Cuadro 2) de SIGMA Co., aunque previamente también se habían evaluado otras cinco secuencias, tres ancladas BDB(CA)₇, (GACA)₄GT y (TCC)₅RY y dos sin ancla (GACA)₄, (GGAT)₄, pero cuyos productos resultaron poco informativos. Las condiciones de reacción fueron las mismas que para RAPDs, excepto que se utilizaron 50 ng de DNA molde. El termociclaje utilizado consistió de 1 ciclo de pre desnaturalización a 94 °C durante 1 min, 35 ciclos [94 °C, 30 s; 48 °C por 30 s para el iniciador (CA)₈ RT y 56 °C para el resto de los iniciadores; 72 °C, 1.5 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Cuadro 5.2 Iniciadores RAPDs e ISSRs utilizados para el análisis de genotipos de *Opuntia* spp.

Sistema	Iniciador	Secuencia	Fragmentos detectados	Fragmentos polimórficos
RAPD	K01 ¹	5'-CAT TCG AGC C-3'	25	20
	K04	5'-CCG CCC AAA C-3'	31	16
	K07	5'-AGC GAG CAA G-3'	35	15
	K-12	5'-TGG CCC TCA C-3'	33	27
	K17	5'-CCC AGC TGT G-3'	26	12
ISSR	IS01 ²	5'-AC(GACA) ₄ -3'	37	13
	IS02	5'-(AC) ₈ YG-3'	30	13
	ISO3	5'-(AGAC) ₄ GC-3'	32	6
	IS05	5'-(CA) ₈ RT-3'	34	15
	IS06	5'-(GA) ₈ YC-3'	34	23

¹ Productos de Carl Roth Co.

² Productos de SIGMA Co. Y sustituye residuos C (citosa) y T (timina); R sustituye G (guanina) y A (adenina).

Los productos amplificados se mezclaron con 6 µL de amortiguador de carga con formamida. La separación de fragmentos se realizó en geles poliacrilamida 8 % (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando 2.0 µL de la mezcla de productos de reacción de PCR con el amortiguador de carga. Como referencia se utilizó el marcador Gene Ruler de 1 Kb DNA Ladder de MBI Fermentas. El voltaje aplicado fue de 240 voltios por 2.5 h en amortiguador TBE 1X. Las huellas de DNA se tiñieron con 0.2 % de nitrato de plata, siguiendo el protocolo convencional (Valadez y Kahl, 2000) y se documentaron en un transiluminador de luz blanca utilizando el programa Kodak Digital Science 1D V.2.0.3.

5.2.4 Registro de datos y análisis

Cada banda RAPDs e ISSRs fue considerada como un carácter o locus independiente y codificada visualmente como polimórfica ausente "0" o presente "1" en cada uno de los genotipos. Las diferencias cualitativas entre bandas no se consideraron. Se realizaron tres experimentos independientes incluyendo desde las reacciones de PCR y solo aquellas bandas consistentes se consideraron para los análisis respectivos.

La matriz básica de datos (MBD) se generó con la información molecular de cada grupo de marcadores. La similitud genética se estimó mediante el coeficiente de similitud Dice. El método de aglomeración utilizado fue Neighbor Joining. El árbol se elaboró mediante el programa FreeTree utilizando el método de remuestreo "bootstrapping" con 1000 repeticiones, obteniendo el árbol consenso con las frecuencias de cada uno de los agrupamientos (Vladimir, *et al.*, 2001).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El DNA obtenido de semilla fue de cantidad y calidad apropiada para los análisis moleculares con PCR. Este DNA careció de metabolitos lo cual facilitó la PCR y la reproducibilidad de resultados.

Los perfiles de RAPDs fueron altamente informativos, los cinco iniciadores seleccionados (K01, K04, K07, K12 y K17) proporcionaron datos que permitieron distinguir las 52 variedades de *Opuntia* incluidas en el estudio; registrando un total de 94 fragmentos RAPDs polimórficos y 70 con ISSRs. Los

fragmentos RAPDs e ISSRs seleccionados como informativos oscilaron entre 250 pb a 3500 pb. Los perfiles obtenidos de las tres repeticiones fueron muy similares entre cada una de las variedades, no se encontraron diferencias al comparar las repeticiones de una misma variedad, los perfiles fueron prácticamente iguales salvo pequeñas diferencias en los pesos moleculares de algunos amplicones; sin embargo las variedades 'Burrona', 'Blanca San José', y 'Blanca la Gavia' evidenciaron polimorfismos claramente observados entre cada una de sus tres repeticiones que pueden atribuirse a la variación en la información genómica amplificada.

La variabilidad genética observada por las huellas genómicas de nuestros ensayos, es suficiente para diferenciar a cada uno de las variedades mediante la técnica RAPDs, pero además esta herramienta también es capaz de señalar variabilidad intrínseca en tres de las 52 variedades estudiadas y esta variabilidad puede tener diferentes orígenes y uno de los más lógicos es atribuible a la recombinación genética, aunque otras causas pueden también estar interviniendo, por ejemplo el entrecruzamiento entre especies; sin embargo no lo podemos asegurar, solo suponemos e inferimos respuestas con base en los resultados obtenidos.

En la Figura 5.1 se muestra el agrupamiento consenso obtenido con la técnica RAPDs en donde se aprecia un considerable número de agrupamientos en los cuales algunas variedades estudiadas no se asocian en correspondencia a la especie en la que actualmente están clasificadas, pero otros agrupamientos se encuentran conformados por variedades que pertenecen a una misma especie;

por ejemplo las variedades del grupo de los xoconostles estrechamente relacionadas entre ellas, de igual manera las variedades de *O. megacantha* y *O. streptacantha*. Sin embargo las variedades de *O. ficus-indica* y las de *O. albicarpa* no se presentan en grupos claramente definidos, sino entremezclados en la mayoría de los agrupamientos. Este comportamiento sugiere que este tipo de datos moleculares revelan la variabilidad genómica existente de las especies *O. ficus-indica* y *O. albicarpa*.

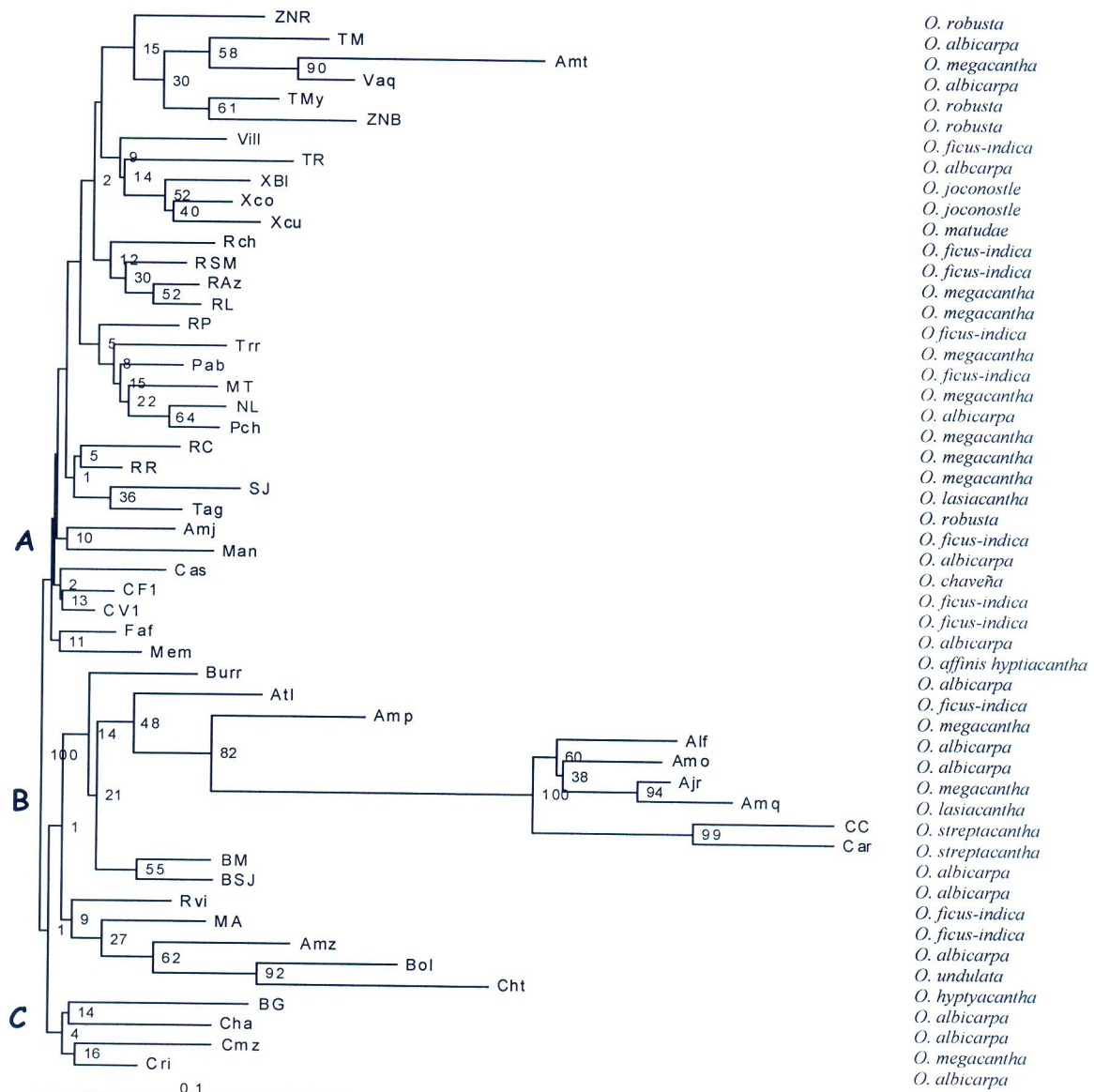


Figura 5.1 Arbol consenso generado a partir de información RAPDs.

Como puede observarse las especies analizadas de *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* manifiestan la mayor variabilidad, esto puede ser explicado si se considera que estas especies conforman el grupo de opuntias que ha sido mayormente manipulado por el hombre desde épocas antiguas, incluso se ha

reportado que estos dos grupos están conformados por colecciones que después de muchos años de selección a lo largo de la historia les permite converger en un grupo que presenta similitudes fenotípicas que les permite asociarse por compartir caracteres morfológicos (Kiesling, 1998). No obstante esas similitudes, también es claro que estas dos especies también comparten rasgos con otros grupos de *Opuntia* por esta razón puede observarse que las variedades de *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* se encuentran distribuidas asociadas a diversas especies.

En el agrupamiento conformado con ISSRs (Figura 5.2) al igual que el agrupamiento con RAPDs, se puede observar la estrecha relación entre las variedades y especies analizadas, tomando en cuenta la escala al pie de cada figura que permite inferir la distancia a la que se presentan las ramificaciones, evidenciando la estrecha relación entre las variedades analizadas.

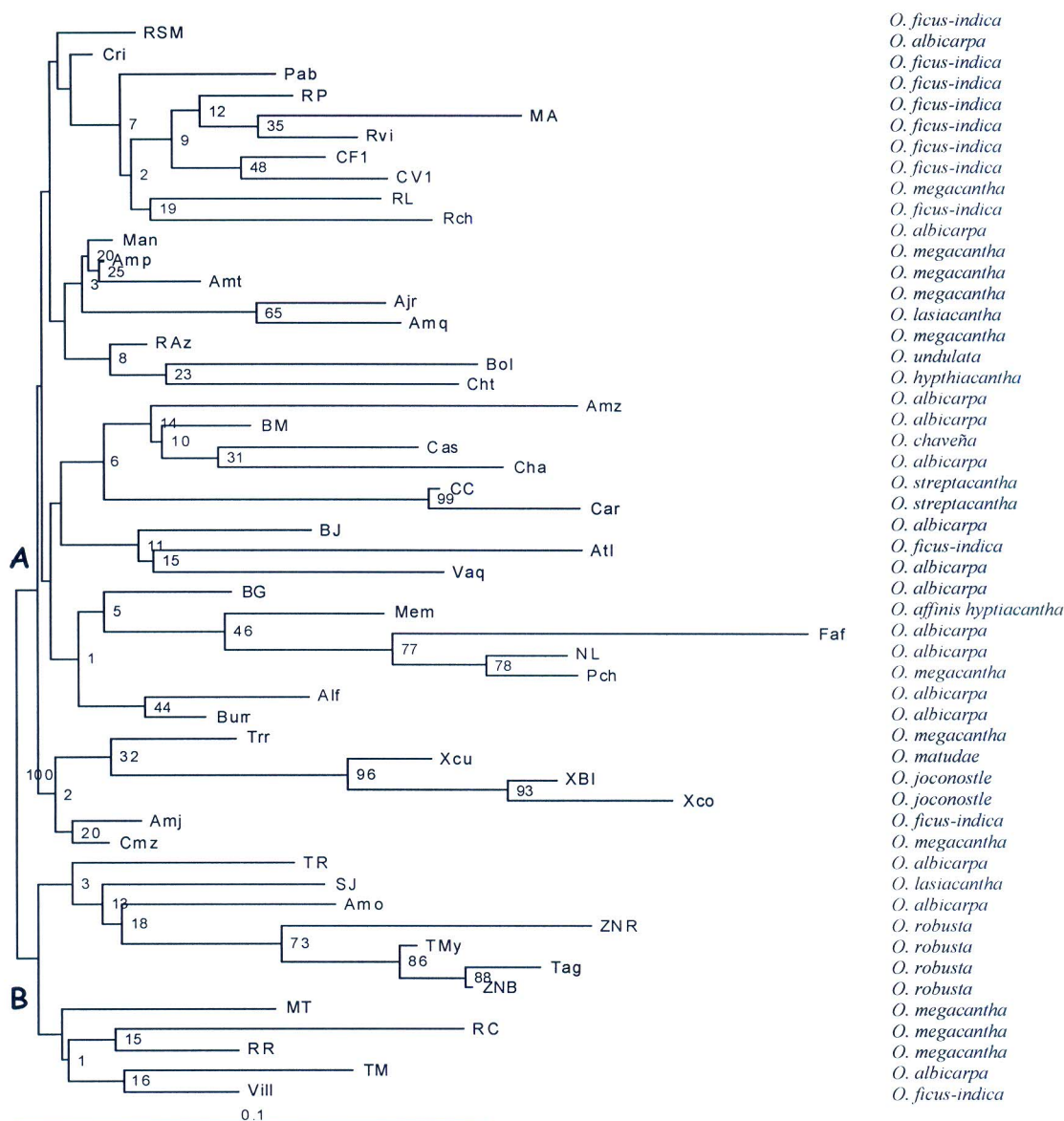


Figura 5.2 Arbol consenso generado con información de datos ISSRs.

El árbol generado con información de la técnica ISSR arrojó un grupo mayor (A) en el que se agrupan 40 de las 52 variedades estudiadas, en este agrupamiento se puede apreciar que están concentradas la mayoría de las variedades cultivadas, semicultivadas, incluyendo a los xoconostles. En este mismo agrupamiento se encuentra un subgrupo conformado casi exclusivamente por

variedades de *O. ficus-indica*, esto nos permite suponer que las variedades 'Roja san Martín', 'Pabellón', 'Rojo pelón', 'Milpa Alta', 'Rojo vigor', 'Copena F1', 'Copena V1', 'Rojo lirio' y 'Rojo chicle' están cercanamente emparentadas desde el punto de vista de la información generada con ISSRs.

En cuanto a las especies *O. albicarpa* y *O. megacantha* que también están representadas por más de dos variedades, podemos observar que estas variedades se encuentran distribuidas en todo el árbol sin conformar un agrupamiento, es este comportamiento lo que hace suponer que estas dos especies además de *O. ficus-indica* son sumamente variables y pueden provenir de origen polifilético como lo sugiere Kiesling (1998).

Al observar el agrupamiento conformado por los xoconostles, se presume que la técnica ISSR tiene la capacidad de diferenciar a *O. matudae* (X. cuaresmero) de *O. joconostle* (X. blanco y X. colorado) lo cual nos indica que efectivamente estas dos especies comparten muchas similitudes genómicas pero mantienen diferencias que las separan al interior del mismo grupo.

En el grupo B se encuentran asociadas variedades de especies poco cultivadas, aunque vuelven a entremezclarse algunas variedades de *O. ficus-indica*, *O. megacantha* y *O. albicarpa*.

Podemos observar que las ramificaciones del árbol ISSRs se presentan con mayor longitud, es decir que las líneas que separan a una variedad de otra son más largas al compararlas con las ramificaciones del árbol obtenido con RAPDs, esto sugiere los ISSRs son más eficientes para diferenciar entre variedades, inclusive entre materiales de una misma especie.

La técnica RAPDs y la técnica ISSRs proporcionan información diferente y no es posible hacer coincidir por completo los resultados de cada una de ellas, debido a la propia naturaleza de las técnicas. Como se sabe, los RAPDs generan información a partir de cualquier sitio donde encuentran complementariedad los iniciadores utilizados y de esta manera es posible comparar el genoma de los organismos y la variedad existente en una población siempre que se utilicen las mismas condiciones de amplificación y revelado de los productos de amplificación; es por ello que al analizar el árbol correspondiente a RAPDs, se observa la mayor cantidad de agrupamientos por efecto de una mayor cantidad de polimorfismos detectados los cuales tienen su origen en la amplia variabilidad que presentan las accesiones analizadas.

La variabilidad también esta en relación con el origen o procedencia diversa de los materiales, así como su uso y el grado de domesticación que ha guiado a la expresión de ciertos genes y al opacamiento de otros (Rebman y Pinkva, 2001), posiblemente causando por inversiones, translocaciones, delecciones o pérdida de información; además de la variación producida por el tipo de polinización recordando que algunas especies de *Opuntia* presentan un importante grado de alogamia, con lo cual se promueve el intercambio de genes lo que ayuda a mantener la variabilidad genética, incluso se reporta el entrecruzamiento entre especies diferentes generando híbridos interespecíficos o individuos con diferente nivel de ploidia dando como resultado rearreglos en la información genética. Estos fenómenos constituyen uno de los principales aspectos

responsables de la variabilidad que puede explicar la gran cantidad de polimorfismos encontrados con esta técnica RAPDs.

La técnica ISSRs también reproduce información de la mayor parte del genoma, pero no de forma aleatoria; la información que proporciona es más puntual, ya que los iniciadores empleados amplifican la información localizada entre dos microsatélites y reconocen sitios conservados permitiendo con ello establecer relaciones genómicas estrechas entre organismos que comparten al menos la misma longitud de los productos amplificados. Es por esto que son menos los agrupamientos generados puesto que con esta técnica al contrario de RAPDs, se tiende a detectar mayor cantidad de monomorfismos que de polimorfismos.

Por las características mencionadas de los ISSRs además de su capacidad para establecer relaciones genómicas, podemos suponer que las variedades que conforman un mismo agrupamiento es probable que posean un mismo origen y que incluso en el caso de la especie *O. ficus-indica*, por la variabilidad observada tanto con RAPDs e ISSRs en este estudio, posiblemente sea una especie que se originó a partir de diversos ancestros y que por su grado de domesticación ha acumulado características agronómicas que la hacen comportarse de manera mas o menos similar pero que en su genoma se siguen conservando diferencias que impide que las variedades clasificadas dentro de esta especie se agrupen al menos en este trabajo.

El árbol generado con la información combinada de ambas técnicas (RAPDs e ISSRs) se muestra en la Figura 5.3 y permite observar agrupamientos bien definidos por variedades de una misma especie, así encontramos al conjunto

los xoconostles, a las variedades de *O. streptacantha*, *O. megacantha*, *O. robusta* y a la mayoría de las especies *O. ficus-indica* y *O. albicarpa*, asociadas en subgrupos afines a una sola de estas especies. Sin embargo las dos últimas *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* manifiestan un comportamiento en el cual algunas de las variedades clasificadas en cualquiera de estas dos especies, se encuentran relacionadas con algún otro agrupamiento en el árbol.

Notable es que en este árbol el número de agrupamientos es menor que con cada una de las dos técnicas por separado, sin embargo la separación de grupos continua presentándose a relativa poca distancia comparada con la escala al pie de la figura. En este árbol generado con información de ambas técnicas las variedades más diferentes o alejadas del resto son 'Cardón de Castilla' y 'Cardona' en correspondencia con el agrupamiento RAPDs cuando se analizó por separado, indicando la pertinencia de esta técnica para discriminar por similitudes o disimilitudes entre las variedades analizadas en este estudio.

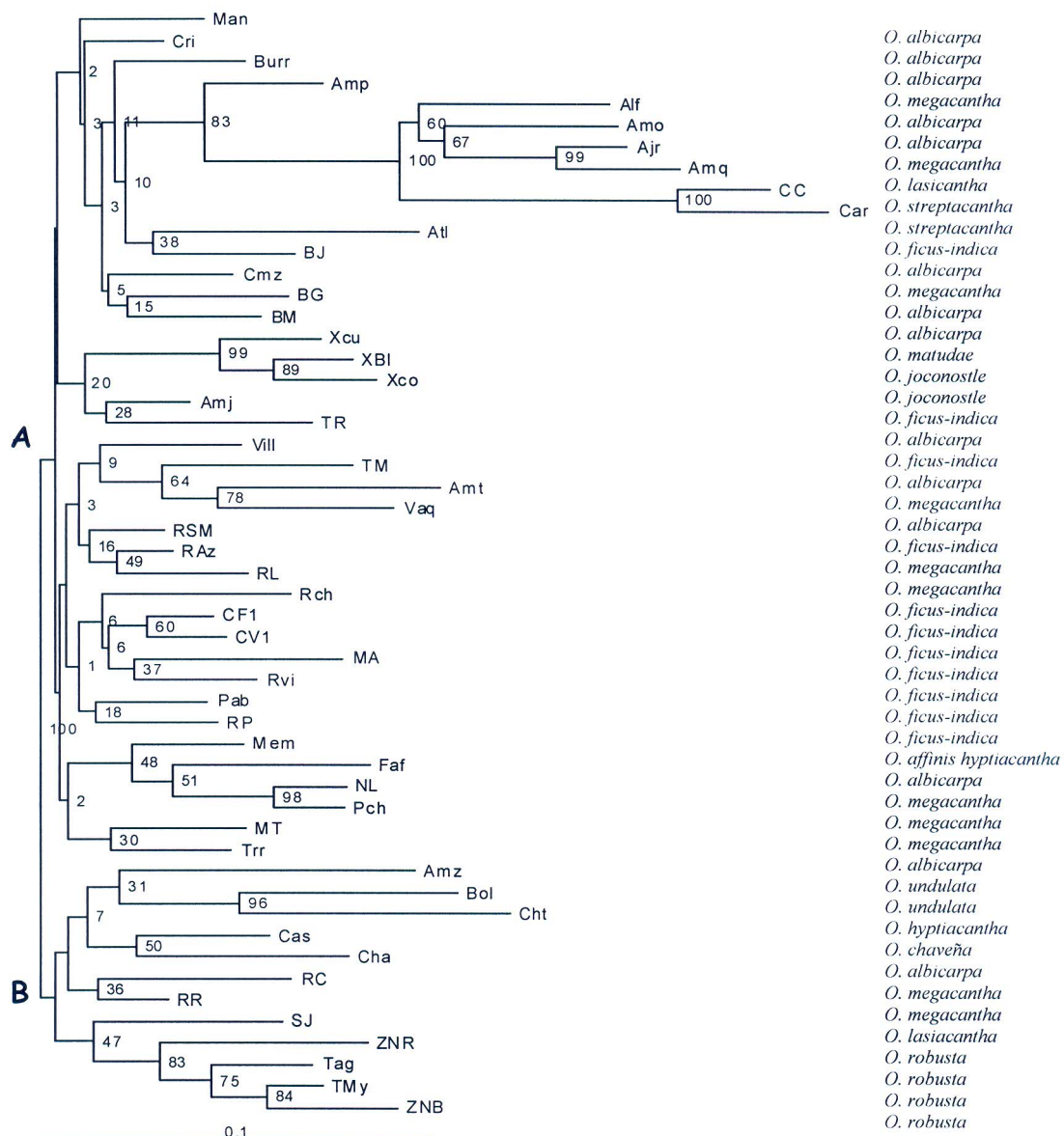


Figura 5.3 Arbol consenso obtenido con información conjunta de datos RAPDs e ISSRs.

El agrupamiento conjunto de ambas técnicas generó grupos en los que se encuentran asociadas variedades que pertenecen a una misma especie; así podemos observar subgrupos que asocian variedades de *O. albicarpa* subgrupo de *O. ficus-indica* y *O. robusta*; sin embargo algunas variedades de

estas mismas especies continúan fuera de grupo principalmente de *O. albicarpa*, *O. ficus-indica* y *O. megacantha* que se distribuyen en todo el árbol.

El árbol consenso obtenido con datos de ambas técnicas generó dos agrupamientos principales, un grupo mayor (A) que asocia 40 de las 52 variedades estudiadas y en este grupo se encuentran aquellas que mantienen similitud en el sentido de que se asocian variedades cultivadas de *O. ficus-indica*, *O. albicarpa*, *O. megacantha* y variedades subcultivadas, incluyendo los xoconostles; mientras que en el grupo B, se asocian variedades de especies poco cultivadas como *O. robusta* ó sin ningún manejo como ‘San juanera’ que esta clasificada como *O. lasiacantha*.

La inconsistencia para conformar los agrupamientos esperados de variedades que actualmente están ubicadas en una misma especie, se repite al comparar las secuencias de genes ITS reportados en la base de datos NCBI como aportación independiente al presente trabajo (comunicación personal de Dra. Ernestina Valadez-Moctezuma, 2008). Por ejemplo, el alineamiento de las secuencias de las variedades ‘Cardón de Castilla’ (DQ672548) *O. streptacantha*; Fafayuca (DQ672549) *O. albicarpa*; Amarilla Oro (DQ672550) *O. albicarpa*; Tuna Manza (EU428844) *O. albicarpa*; Milpa Alta (EU428845) *O. ficus-indica*; Pico Chulo (DQ672551) *O. ficus-indica* y Rojo Lirio (EU428846) *O. ficus-indica* no muestran diferencias en este gen conservado; lo que las agrupa juntas a todas ellas; sin embargo la variedad Morada T-10 (EU428843) considerada como *O. ficus-indica* se mantuvo independiente por presentar algunas diferencias a nivel secuencia. Estos primeros resultados (en proceso de

publicación) sugieren que las variedades seleccionadas para secuenciación de las regiones ITSs, aún cuando están clasificadas en diferentes especies pudieran corresponder a *O. ficus-indica*, tal como lo sugiere Kiesling, (1998). Sin embargo para apoyar esta idea es necesario incluir las secuencias de otros genes propuestos en la literatura que se consideran útiles y necesarios para estudios de taxonomía y filogenia.

Como observación adicional podemos señalar que las variedades para verdura de *O. ficus-indica*, son variedades que se encuentran dispersas en el árbol y no se asocian con las demás de su misma especie; sin embargo, 'Copena F-1' y 'Copena V-1' con ambas técnicas (RAPDs e ISSRs), se encuentran siempre estrechamente relacionadas. Los marcadores utilizados permitieron corroborar los agrupamientos de *O. robusta*, *O. streptacantha*, *O. joconostle* y *O. megacantha* ya que las variedades que los representan permanecen como grupo en una rama según la información obtenida con ambas técnicas, sugiriendo la cercana relación entre las variedades de cada especie.

5.4 CONCLUSIONES

Los resultados RAPDs e ISSRs muestran la diversidad genómica de los materiales analizados en este estudio, manifestado por la diferenciación de cada una de las variedades.

Debido a que la técnica RAPDs detecta polimorfismos de DNA de forma aleatoria a lo largo del genoma, proporciona mayor número de agrupamientos y bandas polimórficas comparada con la técnica ISSRs.

Las variedades de *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* se presentan como dos especies sumamente variables cuando se analiza su genoma con RAPDs e ISSRs demostrado por su amplia distribución en los agrupamientos generados.

Las variedades de cada una de las especies *O. robusta*, *O. streptacantha* y *O. megacantha* y los xoconostles involucrados en este estudio se comportan cada grupo como variedades altamente relacionadas, observándose asociaciones consistentes y congruentes en las especies en las que están clasificadas.

El árbol conjunto con ambas técnicas proporciona menor número de agrupamientos.

Los resultados de este trabajo sugieren información a considerar para una reclasificación del género *Opuntia*.

Las especies *O. ficus-indica*, *O. albicarpa* y *O. megacantha* son tres grupos que presentan la mayor variabilidad, se ubican en todo lo amplio de los árboles generados, sugiriendo la hipótesis de su origen polifilético, o simplemente como variantes de *O. ficus-indica*.

La variedad 'Amarilla miquihuana' se encuentra bastante distanciada de su pariente cercano, la variedad 'San Juanera', lo que nos sugiere reconsiderar en un futuro su clasificación.

Aunque los xoconostles representan a dos especies diferentes, las tres variedades estudiadas de estos, se asocian siempre como un grupo con las dos técnicas aplicadas y aún cuando se analizan de manera conjunta los datos de ambas técnicas.

5.5 LITERATURA CONSULTADA

- Arnholdt, S., B.; Coe, G. L.; Llamota, Z. R. M.; Campos, A. P. F. 2001. Genome Characterization of *Opuntia ficus-indica*: A simple and efficient micromethod. JPACD. 4: 57-65.
- Bravo, H. E. 1978. Las cactáceas de México. Vol I. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria. México, D.F. 743 p.
- Bravo, H. H.; Scheinvar, L. 1999. El interesante mundo de las cactáceas. 2da edición. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 233 p.
- De la Cruz, M.; Ramírez F.; Hernández H. 1997. DNA isolation and amplified from cacti. Plant Molecular Biology Reporter 15: 319-325.
- Fernández, M.; Figueiras, A.; Benito C. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics 104 (5): 845-851.
- Granados, S. A.; Castañeda, P. A. D. 1991. El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. México, D. F. 227 p.
- Griffiths, P. M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany 91: 1911-1921.
- Guzmán, U.; Arias, S.; Dávila, P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D. F. 315 pp.

- Huang, J. C.; Sun, M. 2000. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theoretical and Applied Genetics 100 (7): 1050-1060.
- Iruela, M.; Rubio, J.; Cubero, J. I.; Gil, J.; Millán, T. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104(4): 643-651.
- Kiesling, R. 1998. Origen, Domesticación y Distribución de *Opuntia ficus-indica*. Journal Professional Association for the Cactus Development. (3) 72-81
- Luna-Paez, A., Valadez-Moctezuma, E., Barrientos-Priego, A. F., y Gallegos-Vázquez C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp., mediante semilla con marcadores RAPD e ISSR y su posible uso para diferenciación. Journal of the Professional Association for Cactus Development. (9) 43-51.
- Martins, M.; Tenreiro, R.; Oliveira, M. M. 2003. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 22 (1): 71-78
- Mondragón, J. C. 2003. Molecular characterization using RAPDs of a cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from central México as a basis for plant breeding. Revista Chapingo Serie Horticultura 9 (1): 97-114.

Mondragón, J. C. 2004. Mejoramiento genético del nopal: Avances al 2003 y perspectivas, pp 49-71. *In*: El Nopal: Tópicos de Actualidad. Esparza-Frausto, G.; Valdez-Cepeda, R. D.; Méndez-Gallegos, S. J. (eds.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

Mondragón, J. C.; Doudareva, N.; Bordelon, B. 2000. DNA extraction from several cacti. *HortScience* 35(6): 1121-1126.

Patzak, J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.) *Euphytica* 121(1): 9-18

Pimienta, B. E.; Muñoz, U. A. 1995. Domestication of Opuntias and cultivated varieties pp 58-61. *In*: Barbera, G.; Ingese, P.; Pimienta, B. E. (eds.). Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. FAO publications. Rome, Italy.

Raina, S. N.; Rani, V.; Kojima, T.; Ogihara, Y.; Singh, K. P.; Devarumath, R. M.. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44 (5):763-772.

Rebman, P. J. and D. J. Pinkava. 2001. *Opuntia* Cacti of North America- An overview. *Florida Entomologist*. 84 (4) 474-483.

Reyes, A. J. A.; Aguirre, R. J. R.; Flores, F. J. L. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia* 30 (8): 476-484.

- Reyes, A. J. A.; Aguirre, R. J. R.; Valiente, B. A. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* 64: 549-585.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. Gel electrophoresis of DNA. pp. 6.0-6.62. *In*: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol I. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Scarano, M. T.; Abbate, L.; Ferrante, S.; Lucretti, S.; Tusa, N. 2002. ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Reports* 20 (12):1162-1166.
- Valadez, E.; Kahl, G. 2000. Huellas genómicas de ADN de plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Ed. Mundi-Prensa S. A. D. F., México. 147 p.
- Vladimir, H.; Pavlícek, A.; Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Wang, X.; Felker, P.; Burow, D. M.; Paterson, H. A. 1998. Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3: 3-14.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

Con la finalidad de solventar el problema de la calidad del DNA obtenido de las muestras de nopal en estudio, se realizaron modificaciones al protocolo CTAB en el presente trabajo, así como el paso adicional de fenolización de las muestras con lo cual se obtuvo DNA de calidad óptima y cantidad suficiente para llevar a cabo los análisis genómicos propuestos. Estas modificaciones al protocolo permitieron que la molécula de DNA se obtuviera libre de polisacáridos y proteínas.

La comparación de los sistemas de electroforesis para la separación de los fragmentos amplificados permitió corroborar que la resolución en geles de poliacrilamida (PAGE) es superior a la agarosa. Nuestros resultados nos permitieron comprobar ampliamente las ventajas que ofrece el sistema PAGE y cumplir los objetivos pretendidos; ya que este sistema resultó más apropiado para diferenciar y agrupar entre los individuos gracias a su abundante patrón de bandas; lo que no fue posible en el sistema de agarosa. Los productos de DNA amplificados con las técnicas RAPDs e ISSRs separadas en PAGE, permitieron diferenciar las accesiones de nopal consideradas en este estudio, de la misma forma que lo han logrado los caracteres morfológicos; pero además se pudo observar la relación genómica entre las accesiones y algunas de las especies.

Nuestros resultados nos indicaron que las accesiones utilizadas de las especies *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* presentan alta variabilidad en la información contenida en su genoma, demostrada por la amplia distribución en los diversos agrupamientos de los árboles conformados con los datos moleculares

obtenidos. Sin embargo, las variedades de las otras especies incluidas (*O. robusta*, *O. streptacantha*, *O. megacantha* y los xoconostles), aún cuando se encontraron relacionadas, presentaron caracteres genómicos distintivos que les permitieron mantenerse independientes entre sí en los árboles conformados; este comportamiento nos permitió concluir que las técnicas de genotipificación utilizadas fueron apropiadas para llevar a cabo la genotipificación y diferenciación de materiales de *Opuntia*.

Los resultados de este trabajo proporcionan información que puede ser complementaria para la consideración futura de la reclasificación del género *Opuntia*; sobre todo, nuestros resultados sugieren la revisión de la actual ubicación de algunas variedades tales como 'Cardón de Castilla' (*O. streptacantha*); Fafayuca (*O. albicarpa*); Amarilla Oro (*O. albicarpa*) y Tuna Manza (*O. albicarpa*) actualmente clasificadas en diferentes especies; pero que al menos en las secuencias de ITS todas ellas son iguales; mientras que la variedad Morada T-10 considerada actualmente como *O. ficus-indica* mostró diferencias en esta región, por lo que posiblemente no sea *O. ficus-indica*.

Por los resultados obtenidos con el uso de semilla como fuente para obtener DNA y realizar análisis genéticos, se pudo observar que la utilización de estas estructuras permitieron obtener DNA de calidad proporcionando perfiles reproducibles y nítidos. Pero además, con el uso de semilla es posible estimar el grado de variabilidad genética que pudiera presentarse en una población de la misma especie debido a recombinación genética, hibridación, autopolinización o apomixis; situación que en cladodio no se puede apreciar.

Es conveniente resaltar la utilidad de este tipo de análisis con DNA, ya que aportan información acerca de la relación genómica de las especies de *Opuntia*, lo que puede ayudar a discernir entre clones o biopiratería. Pero también, este tipo de información es la base para la búsqueda de caracteres cuantitativos que pueden ser de utilidad en el mejoramiento genético de la especie.

Lo anterior permite sugerir la revisión taxonómica y sus posibles cambios ya que desde hace pocos años, cuando se iniciaron los análisis moleculares, se detectaron incongruencias a ese nivel entre diferentes variedades y especies, señalando que la variación y la problemática en la taxonomía responde a diversas razones, entre ellas que los estudios morfológicos no parten de especímenes vivos o recorridos en campo, sino de materiales conservados en herbarios sin la debida preparación lo que conlleva a la pérdida o alteración de caracteres. Además de que la expresión fenotípica puede ser influida por factores ambientales, principalmente hábito de crecimiento, pubescencia, longitud y número de espinas por areola, todos ellos muy plásticos y cambian significativamente dependiendo de las condiciones de crecimiento.

Otro factor de sesgo en la caracterización morfológica, como lo señalan Rebman y Pinkava (2001), es la generación de híbridos con características intermedias que los ubican en los límites de las especies que intervienen en el híbrido, así que se hace necesario el uso de herramientas complementarias que coadyuven a la mejor interpretación de resultados y con ello guiar a conclusiones que reflejen mejor la realidad.