

Caracterización molecular de cactáceas del desierto chihuahuense

Isidro Humberto Almeyda León, E. Edith Villavicencio
Gutiérrez, Alberto Arredondo Gómez y Víctor Pecina Quintero



**GOBIERNO
FEDERAL**

SAGARPA

inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias



Centro de Investigación Regional Noreste
Campo Experimental General Terán
General Terán, N. L. Noviembre de 2012
Folleto Técnico No. MX-0-310699-52-03-16-09-12
ISBN: 978-607-425-904-9



Vivir Mejor

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural,
Pesca y Alimentación

Lic. Francisco Javier Mayorga Castañeda
Secretario

M.Sc. Mariano Ruiz-Funes Macedo
Subsecretario de Agricultura

Ing. Ignacio Rivera Rodríguez
Subsecretario de Desarrollo Rural

Ing. Ernesto Fernández Arias
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

M.Sc. Jesús Antonio Berumen Preciado
Oficial Mayor

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dr. Pedro Brajcich Gallegos
Director General

Dr. Salvador Fernández Rivera
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M.Sc. Arturo Cruz Vázquez
Coordinador de Planeación y Desarrollo

Lic. Marcial A. García Morteo
Coordinador de Administración y Sistemas

Centro de Investigación Regional del Noreste

Dr. Sebastián Acosta Núñez
Director Regional

Dr. Jorge Elizondo Barrón
Director de Investigación, Innovación y Vinculación

Dr. Isidro Humberto Almeyda León
Director de Planeación y Desarrollo

DBA. José Luis Cornejo Enciso
Director de Administración

Dr. Guillermo J. García Dessommes
Encargado del Despacho de la Dirección de
Coordinación y Vinculación en Nuevo León

Caracterización molecular de cactáceas del desierto chihuahuense

Isidro Humberto ALMEYDA LEÓN¹
E. Edith VILLAVICENCIO GUTIÉRREZ²
Alberto ARREDONDO GÓMEZ³
Víctor PECINA QUINTERO⁴

¹Investigador del Campo Experimental General Terán

²Investigador del Campo Experimental Saltillo

³Investigador del Campo Experimental San Luis Potosí hasta diciembre de 2011

⁴Investigador del Campo Experimental Bajío

**Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias**

Progreso 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán, C.P. 04010 México, D. F.
Teléfono (55) 3871-8700

Caracterización molecular de cactáceas del desierto chihuahuense

ISBN: 978-607-425-904-9

Primera Edición 2012

Clave: INIFAP/CIRNE/F-98

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de la Institución.

CONTENIDO

	Página
ANTECEDENTES	1
UTILIZACIÓN DE MARCADORES	
MOLECULARES	5
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Genotipos	8
Extracción del DNA	10
Análisis mediante Secuencias Simples	
Repetidas (SSR) o microsatélites	12
Análisis estadísticos	13
RESULTADOS	16
CONCLUSIONES	22
LITERATURA CITADA	23
AGRADECIMIENTOS	29

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Especies de cactáceas colectadas en diferentes localidades y/o Estados del desierto chihuahuense.	9
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de 30 colectas de cactáceas, mediante la técnica de SSR.	13
Cuadro 3. Atributos calculados de los marcadores SSR y diversidad genética de 30 accesiones de cactáceas.	17
Cuadro 4. Fragmentos amplificados, fragmentos polimórficos y porcentaje de polimorfismo obtenido en las 30 accesiones de cactáceas caracterizadas mediante la técnica de SSR.	17
Cuadro 5. Colectas de cactáceas que presentan alelos SSR únicos.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dendograma generado mediante los datos obtenidos con las 30 accesiones caracterizadas con marcadores SSR o microsatélites.	20
Figura 2. Dispersión de 30 accesiones de cactáceas con base en el análisis de componentes principales de datos SSR.	21

Caracterización molecular de cactáceas del desierto chihuahuense

Isidro Humberto ALMEYDA LEÓN
E. Edith VILLAVICENCIO GUTIÉRREZ
Alberto ARREDONDO GÓMEZ
Víctor PECINA QUINTERO

ANTECEDENTES

El desierto Chihuahuense es el más grande de México, alberga la mayor diversidad de cactáceas en el mundo (329 especies), pero se ubica entre los menos estudiados. Las cactáceas del desierto Chihuahuense se caracterizan por sus tamaños, que van desde pequeños hasta medianos, su distribución geográfica restringida y su lenta tasa de crecimiento. La gran demanda nacional e internacional de ejemplares de estas especies con fines horticulturales y ornamentales, aunada a sus características biológicas, las colocan como una de las familias botánicas más amenazadas del planeta (Bárcenas, 2006).

La protección oficial de las cactáceas en México como recurso natural tiene cerca de 66 años, periodo en el cual, instancias federales, estatales, municipales, organizaciones no gubernamentales, académicos y personas interesadas en las cactáceas, han colaborado para perfeccionar un marco teórico y práctico para conservar y aprovechar estos recursos (Bárcenas, 2003).

La legislación mexicana en materia de recursos naturales prohíbe el comercio de ejemplares, partes o sus derivados colectados directamente de sus hábitats para su venta o comercialización, pero permite, con las autorizaciones adecuadas, la colecta de un reducido número de ejemplares para su propagación y posterior comercialización (Hernández y Bárcenas, 1995).

La posición de México en el comercio internacional de cactáceas es muy bajo si se considera la diversidad de especies que posee. Más de 300 especies de cactáceas del desierto chihuahuense, incluyendo sus zonas de influencia, se comercializan en forma estable fuera del país. Los líderes del comercio de cactáceas en orden de importancia son los Estados Unidos, el Reino Unido y Alemania seguidos de Suecia, México, España, Italia y Canadá. Es interesante destacar que además de la posición hegemónica de los Estados Unidos en el número de especies de cactáceas comercializadas, 17% de éstas sólo pueden adquirirse en el comercio establecido dentro de ese país. El segundo lugar en diversidad de especies en el comercio establecido lo tiene el Reino Unido, con 197 especies, de las cuales tres solamente se comercializan en las Islas Británicas. Alemania posee números similares a los del Reino Unido, con 185 especies totales y cuatro especies exclusivas (Barcenás, 2006).

En resumen, en Estados Unidos se pueden encontrar casi la totalidad de las especies nativas de la porción mexicana de éste

desierto, mientras que en el comercio nacional solamente existen unas pocas. Un problema de difícil solución es determinar el origen de las plantas madre. La respuesta a la sencilla pregunta ¿de dónde provienen estas plantas? es muy complicada o prácticamente imposible de obtener con las técnicas tradicionales de inspección de ejemplares. Los certificados de origen que acompañan las plantas pueden ser falsificados o las plantas cambiadas por otras colectadas directamente de sus hábitats naturales, en lo que se ha denominado como "lavado de especies".

En busca de solventar esta importante deficiencia, la Iniciativa Darwin del gobierno de la Gran Bretaña aprobó el proyecto piloto binacional de "Certificación de Cactáceas Mexicanas Amenazadas de Zonas Áridas". Este proyecto apoya la conservación y el uso sustentable de las especies de cactáceas mexicanas de las zonas áridas del país, y plantea el desarrollo de un esquema de certificación molecular para cactáceas basado en las huellas moleculares de sus microsátélites en apego a los objetivos de la Comisión sobre la Diversidad Biológica, la Comisión Internacional para el Tráfico de Flora y Fauna Silvestres (CITES) y la legislación nacional en materia de recursos naturales. Uno de los problemas más importantes en el país es la ausencia de un esquema de certificación de ejemplares producidos artificialmente, así como la gran oferta de especies colectadas ilegalmente de sus hábitats naturales (Hernández y Bárcenas 1995).

Estos inconvenientes crean condiciones injustas de competencia para los productores legalmente establecidos; además, pone en riesgo a las poblaciones naturales por medio de saqueo y el robo a la nación. Aunado a ello, la normatividad sobre recursos naturales puede eludirse significativamente por las dificultades en la correcta identificación de las especies, el intercambio de ejemplares o el lavado de especies en un permiso de exportación o de extracción. El mecanismo de certificación propuesto, resultaría de gran utilidad en los casos donde se requiera la identificación certera de los ejemplares que van a comercializarse o exportarse, pues a diferencia de otros proyectos, como la inclusión de microchips en las plantas o las inspecciones visuales de los ejemplares, el DNA no puede extraerse o "borrarse" de los individuos, como tampoco se puede falsificar. Por ello, el uso del DNA como parte del mecanismo de certificación es de particular relevancia en el caso de México pues alberga la mayor cantidad de especies de cactáceas en el mundo y cerca de 78% de ellas solamente crecen en el país (Hernández y Bárcenas, 1996).

La certificación podría impulsar de manera importante la incipiente industria de la producción de cactáceas en el país, al asegurarle al productor, comercializador y consumidor final la legalidad del producto. De la misma manera, daría al productor una herramienta útil y certera para exportar sus productos sin desconfianzas o sospechas de ninguno de los participantes en la cadena de comercialización de sus ejemplares.

Por otra parte, el almacenamiento de cientos de ejemplares decomisados en el país dejaría de ser un problema para las autoridades. Comparando las huellas moleculares de esos ejemplares contra una base de datos de individuos y poblaciones conocidas se podrían realizar actividades de reintroducción de las plantas a sus hábitats naturales. Paralelamente, se podrán exportar legalmente plantas con genotipos registrados y con denominación de origen; es decir, asegurar al comprador que determinada planta fue producida en México, que contiene "genes mexicanos" y que así contribuye a la protección de las poblaciones naturales y a la preservación de un recurso para disfrute y admiración de futuras generaciones.

UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES

Históricamente los estudios de diversidad genética se relacionan con datos de anatomía comparativa, morfología, embriología y fisiología. Sin embargo, la influencia ambiental y el reducido número de genes involucrados en características consideradas en estos tipos de estudios, han limitado el uso de éstos como marcadores. La colección y caracterización de germoplasma se ha basado tradicionalmente en caracteres fenotípicos, de comportamiento y de desarrollo.

Las descripciones detalladas son necesarias para la utilización del germoplasma, debido a que en dicho germoplasma puede haber

genes valiosos para ser utilizados en programas de mejoramiento genético. La colección extensiva y el mantenimiento del germoplasma son costosos. Kresovich *et al* (1993), señalaron que este es uno de los problemas más importantes de las colecciones *in vivo*. Estos problemas se agravan cuando se trata de especies perennes. La identificación del germoplasma y el análisis de los esfuerzos futuros de colección son facilitados si se entiende la naturaleza de la variabilidad (Tatikonda *et al*, 2009).

La identificación de cultivares puede ser realizada con las huellas de DNA, especialmente en especies con baja variación genética (Nelson *et al.*, 1994). Actualmente, los avances de la biología molecular ha permitido el uso de técnicas que permiten detectar cambios en el genotipo mediante la caracterización del DNA (González-Chavira y Simpson, 1997).

Los marcadores moleculares son moléculas que pueden ser utilizadas para etiquetar un gen deseado en genotipos evaluados (Ovesná *et al.*, 2002). De hecho una pieza de DNA o una proteína pueden ser utilizadas como marcadores. En estudios donde se ha realizado selección para caracteres específicos, las evaluaciones se han basado en caracteres morfológicos (Staub *et al.*, 1996), isozimas (Stuber y Khana, 1991), y proteínas que codifican para pequeños caracteres (Metakovski, 1991; Shariflou *et al.*, 2001; Vapa y Radovic, 1998).

Sin embargo, los marcadores de DNA han mostrado ser la mejor

herramienta para la evaluación y selección eficiente de materiales de plantas. Los marcadores de DNA segregan junto con los genes y no son afectados por el ambiente. Los fragmentos polimórficos se heredan en forma mendeliana y pueden ser obtenidos de cualquier especie aún sin contar con información de la secuencia del DNA (Williams *et al.*, 1993). El DNA es fácilmente extraído de genotipos de plantas y su análisis puede tener bajo costo y su labores muy efectiva.

Kochieva (2000) menciona que el desarrollo de técnicas para análisis y cuantificación de polimorfismo del DNA ha generado una variedad de nuevas aplicaciones que pueden ser usadas para complementar las técnicas clásicas de mejoramiento de plantas. También señala que la fácil identificación de variedades y la obtención de nuevos marcadores moleculares de DNA en variedades y especies es extremadamente importante no solo para la protección de derechos de los mejoradores sino también para acelerar los programas de mejoramiento.

Se han descrito diversos tipos de marcadores de DNA, pero los más importantes utilizados en los estudios son: el Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) que son "huellas genéticas"; DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD) y Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) (Samuels y Seifert, 1995).

Rhode y Becker (1999) mencionan que en la actualidad se han

desarrollado otras técnicas sobre marcadores moleculares como el análisis de Repeticiones Marcadas de Secuencia Inversa (ISTR) y Simple Secuencias Repetidas (SSR) también conocidas como microsatélites (Russel, 1999).

El desarrollo de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es muy utilizada en el análisis de genomas (Saiki *et al.*, 1988; Schutzbank *et al.*, 1993; White *et al.*, 1992). En años recientes, varios ensayos han revelado el polimorfismo del DNA en loci multialélicos que han sido desarrollados por PCR. Las ventajas considerables de los métodos basados en PCR son simplicidad, especificidad y rapidez (Mullis y Fallona, 1987).

En este trabajo se utilizaron los marcadores SSR o microsatélites para caracterizar a especies de cactáceas del desierto chihuahuense en peligro de extinción, con la finalidad de conocer sus relaciones genéticas y determinar el posible uso de estos marcadores para definir la identidad de cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipos

Las especies de cactáceas utilizadas para su caracterización molecular fueron colectadas en diferentes localidades de los estados de Aguascalientes, Coahuila, Nuevo León y San Luis Potosí (Cuadro 1), los cuales pertenecen al desierto chihuahuense.

Cuadro 1. Especies de cactáceas colectadas en diferentes localidades y/o Estados del desierto chihuahuense.

Especie	Lugar de colecta
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Villa de Guadalupe, Cerro Prieto, San Luis Potosí
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Guadalcázar, San Luis Potosí
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Cultivada <i>in vitro</i> , San Luis Potosí
<i>Astrophytum myriostigma</i>	San Luis Potosí
<i>Astrophytum myriostigma</i>	San Luis Potosí
<i>Astrophytum myriostigma</i>	Saltillo, Coah.
<i>Astrophytum capricorne</i>	Saltillo, Coah.
<i>Astrophytum capricorne</i>	Pilar de Richardson, Parras, Coahuila
<i>Ariocarpus retusus</i>	San Luis Potosí
<i>Ariocarpus retusus</i>	San Luis Potosí
<i>Ariocarpus retusus</i>	Coahuila
<i>Ariocarpus trigonus</i>	San Luis Potosí
<i>Coryphantha maíz-tablasensis</i>	Villa Juárez, San Luis Potosí
<i>Mammillaria bocasana</i> var. <i>bocasana</i>	San Luis Potosí
<i>Mammillaria bocasana</i> var. <i>bocasana</i>	San Luis Potosí
<i>Epithelantha micromeris</i>	El Angelito, Ejido Presa Verde, Cedral, San Luis Potosí
<i>Epithelantha micromeris</i>	Cultivada <i>in vitro</i>
<i>Epithelantha micromeris</i>	Pilar de Richardson, Parras, Coahuila

<i>Epithelantha micromeris</i>	La Rosa, General Cepeda, Coahuila
<i>Epithelantha micromeris</i>	Estación Marte, Parras, Coahuila
<i>Epithelantha micromeris</i>	Cerro Bola, Parras, Coahuila
<i>Echinofossulocactus multicostatus</i>	Pablillo, Galeana, Nuevo León
<i>Echinocereus pulchellus</i>	Villa de Arriaga, San Luis Potosí
<i>Echinocereus pulchellus</i>	Aguascalientes
<i>Turbincarpus knuthianus</i>	Guadalcázar, San Luis Potosí
<i>Turbincarpus knuthianus</i>	Cerritos, San Luis Potosí
<i>Turbincarpus viereckii</i> var. <i>mayor</i>	San Luis Potosí
<i>Turbincarpus valdezianus</i>	San Luis Potosí
<i>Turbincarpus klinkerianus</i>	San Luis Potosí
<i>Thelocactus rinconensis</i>	La Rinconada, García, Nuevo León

Extracción del DNA

Se estandarizó la extracción del DNA de las diferentes especies de cactáceas, tanto de las estructuras vegetativas como de las reproductivas (flores), a partir de la metodología reportada por Almeyda y colaboradores (2001). El principal factor de estandarización fue el incremento en la concentración del CTAB, que es el compuesto que actúa rompiendo las paredes celulares, así como reducir la precipitación de los polisacáridos que se encuentran en alta concentración en el material vegetativo de las cactáceas y de esta manera obtener DNA de buena calidad y evitar

la presencia de inhibidores de la enzima Taq-Polimerasa durante los ciclos de amplificación en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa.

El protocolo general de extracción del DNA optimizado es el siguiente: Se trituraron 250 mg de tejido en 2 ml de solución de extracción 2-ME/CTAB precalentada a 65 °C (3 % p/v CTAB, 100 mM Tris – HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1 % p/v polivinilpirrolidona 40,000), con 2-ME a una concentración final de 0.2 %. Alrededor de 750 µL de la muestra macerada se transfirió a un tubo para centrifuga de 1.5 mL estéril y se incubó durante 45 minutos a 65 °C. Posteriormente se le agregó un volumen (considerando el volumen de la muestra recuperada) de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (parte superior) y se le agregó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó 0.5 volumen de acetato de amonio (7.5 M), dejándolo 10 min en hielo y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Para precipitar el DNA, al volumen recuperado se le agregó 0.6 volumen de isopropanol y se dejó precipitar durante 30 min. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% frío (centrifugando a 10,000 rpm durante 15 min), el precipitado se

secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μL de agua ultrapura estéril y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Análisis mediante Secuencias Simples Repetidas (SSR) o microsatélites

Para la identificación de marcadores microsatélites se utilizaron 5 pares de iniciadores específicos para la caracterización de cactáceas que se muestran en el Cuadro 2 (Otero *et al.*, 2005).

Las reacciones de PCR se conformaron en un volumen final de 25 μL conteniendo 12.55 μL de agua grado MQ estéril, 2 μL de DNA (50 ng), 2.5 μL de solución amortiguadora (1X), 1.25 μL de MgCl_2 (2.5 mM), 2.5 μL de dNTPs (250 μM), 2 μL de cada primer (0.5 μM) y 0.2 μL de la enzima Taq DNA polimerasa (1.0 Unidades). Las PCR's se realizaron bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 4 min a 94 °C; 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de alineamiento a 55 °C para los iniciadores Pchi9, Pchi21 y Pchi54, para los iniciadores Pchi20 y Pchi50 la temperatura de alineamiento fue de 56 °C y 2.0 min de polimerización a 72 °C; y un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR se fraccionaron en geles de poliacrilamida al 2 % y se tiñeron con nitrato de plata y/o bromuro de etidio para ser fotografiados y su posterior análisis.

Cuadro2. Iniciadores utilizados en la caracterización molecular de 30 colectas de cactáceas, mediante la técnica de SSR.

Nombre del iniciador	Primer sequence (5' - 3')	Número de Alelos n
Pchi9	GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG AAAGGCCCAAATCATAAGCA	6
Pchi21	CGTTTAGCCCCTCTTTCTCC GTTCCCAACTGACCGACAAC	8
Pchi54	CCTTGAGCTTTGACATTGAGA GGAAGGTTTTTCATTGGATGAG	11
Pchi20	GTGGCCGAGAAAGAAGTTTG AAAGGCCCAAATCATAAGCA	9
Pchi50	CCTGGGCAAACCTCTGTTTA GTTCCCAACTGACCGACAAC	8

Análisis estadísticos.

Los geles se analizaron y se contabilizaron las bandas monomórficas y polimórficas. Se asumió que bandas del mismo peso molecular en diferentes individuos son similares. La presencia de una banda fue indicado por un uno (1) y la ausencia como cero (0).

Con el fin de determinar cuáles marcadores SSR fueron más informativos, se calcularon algunos parámetros propuestos por Laurentini y Karlovsky (2007) como: Contenido de Información Polimórfica (PIC), el índice de marcador (MI) y el poder de resolución (PR).

Contenido de Información polimórfica. Para cada combinación de iniciadores SSR se calculó el PIC según lo propuesto por Roldán-Ruiz *et al*, (2000):

$$PIC_i = 2f_i(1-f_i)$$

Donde: PIC es el contenido de información polimórfica del marcador i , f_i la frecuencia de los fragmentos del marcador, que estaban presentes y $1-f_i$ la frecuencia de los fragmentos del marcador, que estaban ausentes. El PIC fue un promedio de los fragmentos para cada combinación de iniciadores SSR. Para los valores de PIC tenemos que: Altamente informativo ($PIC > 0.5$), Aceptablemente informativo ($0.25 < PIC < 0.5$), Bajamente informativo ($0.25 > PIC$).

El índice del marcador (MI). Este se calculó como se indica en Varshney *et al*, (2007).

$$MI = PIC \times EMR$$

Donde: EMR es la proporción múltiple efectiva, (E) se define como el producto del número total de loci / fragmentos por iniciador (n) y la fracción de loci polimórficos / fragmentos (β), ($E = n \cdot \beta$).

El poder de resolución (PR). El valor de PR para cada iniciador se calculó de acuerdo a Prevost y Wilkinson (1999):

$$PR = \sum Ib$$

Donde Ib representa la informatividad del fragmento. La Ib se puede representar en una escala 0 - 1 por la siguiente fórmula:

$$Ib = 1 - [2 \times (0.5 - p)]$$

Donde p es la proporción de las 88 accesiones que contiene el fragmento.

Índice de Diversidad. El índice de diversidad genética de germoplasma se calculó sobre la base de la fórmula de Powell *et al.* (1996):

$$DI = 1 - \sum Pi^2$$

Donde Pi es la frecuencia del alelo i^n , cada alelo individual es considerado único en sí mismo y un fragmento de amplificación.

Relaciones genéticas. Con la matriz de datos presencia/ausencia se calculó el índice de similitud desarrollado por Dice (1945) y adaptado por Nei y Li (1979) para datos moleculares. Matrices de similitud por parejas-fueron generados utilizando la versión NTSYS-PC 2.11 (Rohlf, 2000). Se construyó un dendrograma utilizando el método de par-grupo no ponderado con la media aritmética (UPGMA) y el principal método de coordinar el análisis

se realizó utilizando la versión de PC NTSYS 2.11 (Bioestadística Aplicada Inc, Setauket, EE.UU.). Los datos también fueron analizados utilizando métodos multivariados para la realización de análisis de componente principales (ACP).

RESULTADOS

En el Cuadro 3 se muestran los atributos calculados para cada marcador SSR, así como el nivel de diversidad genética observado. Los marcadores microsatélites (SSR) han sido particularmente útiles en el estudio de la estructura de las poblaciones dado su alto nivel de polimorfismo en comparación con otros marcadores y a que tienen una mejor resolución en los estudios de diversidad (Díaz and Blair 2006; Blair *et al.*, 2007). En este estudio los marcadores SSR amplificaron un total de 136 fragmentos y todos fueron polimórficos (100% de polimorfismo) como se observa en el Cuadro 4. Por sus atributos y niveles de polimorfismos detectados en este estudio, estos marcadores pueden ser usados para muestrear un mayor número de poblaciones e individuos y tener una idea clara de la estructura de las poblaciones como se mencionan Blair *et al.* (2007). Los altos o bajos niveles de polimorfismo determinan el nivel de diversidad genética presente en un grupo de individuos, en este caso se observó cerca de un 100 % de diversidad genética, lo cual es normal ya que se trata de especies diferentes.

Cuadro 3. Atributos calculados de los marcadores SSR y diversidad genética de 30 accesiones de cactáceas.

Marcador	PIC ^a	EMR ^b	Mi ^c	Rp ^d	ID	Alelos Únicos
Pchi9	0.1235	32	3.952	4.46	0.99	16
Pchi21	0.1460	41	5.986	6.66	0.99	11
Pchi54	0.1755	22	3.861	4.53	0.98	8
Pchi20	0.1062	18	1.911	2.06	0.99	10
Pchi50	0.1263	23	2.904	3.20	0.99	10

^a Contenido de información polimórfica

^b Proporción múltiple efectiva

^c Índice de marcador

^d Poder de resolución

Cuadro 4. Fragmentos amplificados, fragmentos polimórficos y porcentaje de polimorfismo obtenido en las 30 accesiones de cactáceas caracterizadas mediante la técnica de SSR.

Marcador	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	% Polimorfismo
Pchi9	32	32	100
Pchi21	41	41	100
Pchi54	22	22	100
Pchi20	18	18	100
Pchi50	23	23	100
Total	136	136	100

Por otra parte se observó un gran número de alelos únicos SSR, donde *M. bocasana* var. *bocasana* S.L.P., exhibe quince alelos únicos, *A. myriostigma* S.L.P. nueve alelos, otras colectas presentan cinco alelos (*A. trigonus* S.L.P., y *T. rinconensis* R), seis colectas dos alelos y cinco solo un alelo SSR (Cuadro 5). La importancia de los alelos únicos o alelos raros (frecuencia menor a 0.05; Somers *et al.*, 2007; Casa *et al.*, 2005), radica en que son únicos y están vinculados con un genotipo en particular o una región del genoma y pueden servir en el diagnóstico para diferenciar un genotipo o una región específica del genoma (Agrama and Tuinstra, 2003). Por lo tanto, al tratarse de especies diferentes es normal que al comparar parte de su genoma se observen grandes diferencias en su genotipo, lo que ratificaría lo mencionado por Agrama and Tuinstra (2003).

Cuadro 5. Colectas de cactáceas que presentan alelos SSR únicos.

Colecta	No. de fragmentos únicos	Colecta	No. de fragmentos únicos
<i>A. trigonus</i> S.L.P., y <i>T. rinconensis</i> R.	5	<i>E. pulchellus</i> A., <i>M. bocasana</i> var. <i>bocasana</i> S.L.P., <i>T. valdezianus</i> S.L.P., <i>T. klinkerianus</i> , S.L.P.,	2
<i>A. myriostigma</i> S.L.P.	9	<i>A. census</i> C. M., y <i>E. multicastratus</i> P. <i>E. micromeris</i> C., <i>T.</i>	1
<i>M. bocasana</i> var. <i>bocasana</i> S.L.P.	15	<i>knuthianus</i> S.L.P., <i>A.</i> <i>myriostigma</i> cultivada <i>in vitro</i> , <i>A. capricorne</i> y <i>E. micromeris</i> C. B.	

En este estudio los genotipos con el mayor número de alelos únicos o raros SSR se localizan en el estado de San Luis Potosí, y uno en Coahuila, por lo que pueden servir de etiqueta y ser utilizados en la protección de este germoplasma.

Con los datos obtenidos mediante la técnica de SSR se generó un dendrograma y se formaron cinco grupos (Figura 1).

El uso de microsatélites permitió diferenciar a las 30 accesiones colectadas a pesar de la cercanía genética que existe entre ellas. Los grupos se conformaron de acuerdo a los géneros a los cuales pertenecen, excepto algunas especies de un mismo género que quedaron ubicadas en grupos diferentes, como es el caso de *Mammillaria bocasana* var. *bocasana*, *Astrophytum myriostigma*, *Astrophytum capricorne* y *Ariocarpus retusus*. Lo anterior sugiere que existe una posible confusión en la identificación de las accesiones enviadas o que dichas especies posiblemente no estén correctamente identificadas, por lo que sería conveniente hacer una verificación y contrastar los individuos analizados con sus descriptores, para descartar cualquier confusión y aclarar lo observado.

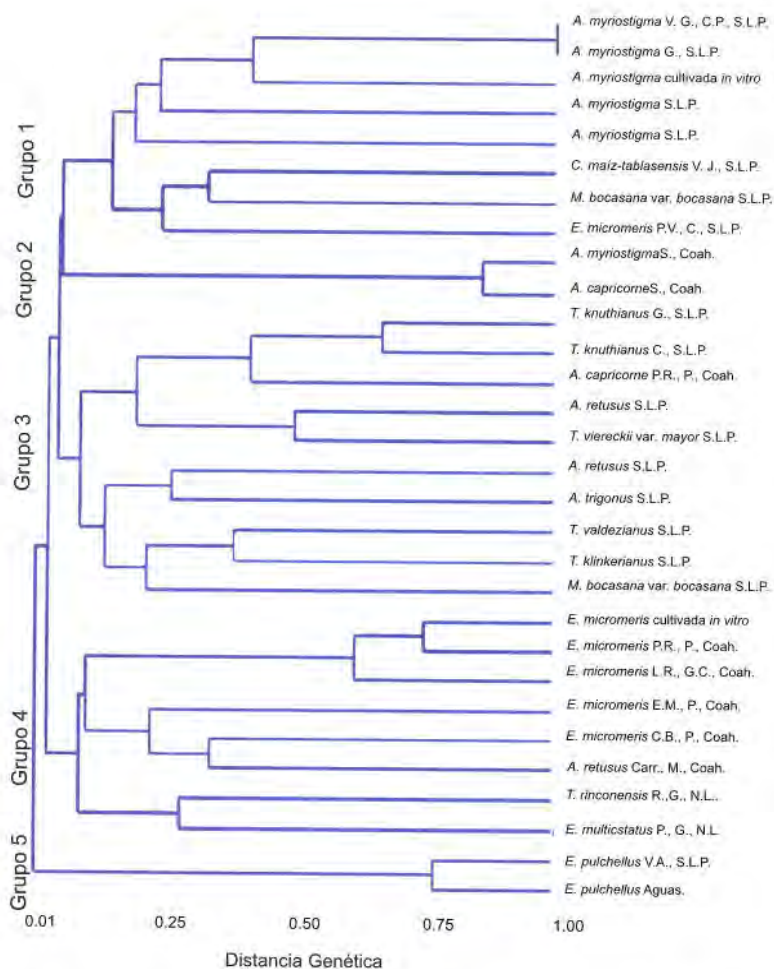


Figura 1. Dendrograma generado mediante los datos obtenidos con las 30 accesiones caracterizadas con marcadores SSR o microsatélites.

Con la matriz de datos obtenidos de las 30 accesiones colectadas, se realizó el análisis de componentes principales Figura 2.

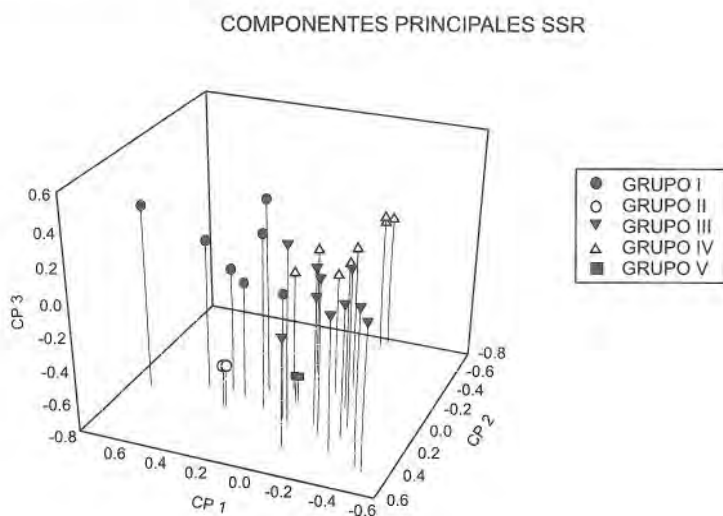


Figura 2. Dispersión de 30 accesiones de cactáceas con base en el análisis de componentes principales de datos SSR.

En esta figura se observa un mayor porcentaje de agregación entre las accesiones que pertenecen a los grupos I, II y V. Se observa mayor divergencia o dispersión entre las accesiones que conforman a los grupos III y IV, inclusive existe una mayor formación de subgrupos en ellos, tal vez lo anterior porque exista una mayor diversidad genética entre estas accesiones o simplemente porque esos grupos están constituidas por un mayor número de accesiones, lo que permite establecer una mayor divergencia entre ellos.

CONCLUSIONES

La técnica SSR o microsatélites permitió diferenciar a las 30 accesiones de cactáceas colectadas en el desierto chihuahuense.

Se encontraron 11 accesiones o colectas con fragmentos únicos, los cuales pueden ser utilizados como etiquetas génicas para ser utilizados en la protección de este germoplasma.

Se observa alta divergencia genética entre los materiales evaluados.

LITERATURA CITADA

1. Agrama, H.A. and Tuinstra, M.R., 2003. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal Biotechnology*, 2:334–340.
2. Almeyda, L., I.H., Rocha, P., M.A., Piña, R., J., Martínez, S., J.P. 2001. The use of polymerase chain reaction and molecular hybridization for detection of *Phytoplasma* sp. in different plant species in México. 2001. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:1-9.
3. Bárcenas, L., T. R. 2003. Chihuahuan desert cacti in Mexico: an assessment of trade, management, and conservation priorities, en: *Prickly trade: trade and conservation of Chihuahuan Desert cacti*. C. S. Robbins. Washington D. C. TRAFFIC North America, II:1-65. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación.
4. Bárcenas, L., T. R. 2006. Comercio de cactáceas mexicanas y perspectivas para su conservación. In: *Biodiversitas 68: Certificación de cactáceas mexicanas amenazadas en apoyo a la conservación de cactáceas desérticas*. 11-15 pp.
5. Blair, M.W., Diaz J.M., Hidalgo. R., Diaz, L.M. and Duque. M.C. 2007. Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 116:29–43
6. Casa, A.M., Mitchell, S.E., Hamblin, M.T., Sun, H., Bowers, J.E., Paterson, A.H., Aquadro, C.F. and Kresovich, S. 2005. Diversity and selection in sorghum: simultaneous analyses using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 111:23-30.

7. Díaz, L.M. and Blair, M.W. 2006. Race structure within the Mesoamerican gene pool of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as determined by microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 114:143–154.
8. Dice, L.R. 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology* 26:297–302.
9. González-Chavira, M., y Simpson, J. 1997. Diversidad genética en hongos (origen y análisis). pp. 4-23. En: *Tópicos Selectos de Fitopatología: Genética Molecular*. Martínez-Soriano, J. P., y Martínez-Espinoza, A. D. (Eds.). CINVESTAV. Unidad Irapuato. Guanajuato, México.
10. Hernández, H.M. y R.T. Bárcenas. 1995. Endagered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. *Conservation Biology* 9:1176-1188.
11. Hernández, H.M. y R.T. Bárcenas. 1996. Endagered cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and conservation. *Conservation Biology* 10:1200-1209.
12. Kochieva, E.Z. 2000. Molecular markers of potato and tomato species and cultivars Genome. N.I. Vavilov. Institute of General Genetics. Moscow, Russia. pp 14–23.
13. Kresovich, S., Williams, J. G.K., McFerson, J.R., Routman, E.J. and Schaal, B.A. 1993. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theoretical Applied Genetic* 85:1-7.
14. Laurentin, H., Karlovsky, P., 2007. AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP

- informativeness parameters. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54:1437–1446.
15. Metakovsky, E.V. 1991. Gliadin allele identification in common wheat II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *Journal Genetic Breeding* 45:325–344.
 16. Mullis, K.B., and Fallona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155:335–350.
 17. Nei, M. and Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 76:5269–5273.
 18. Nelson, R.J., Baraoidan, M.R., Vera, C. C.M., Yap, I.V., Leach, J.E. Mew, T.W. and Nyboon, H. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Applied Environmental Microbiology* 60:3275–3283.
 19. Otero, A.A., Casas, A., Hamrick, J.L., and Cruse, S.J.. 2005 . Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Molecular Ecology* 14:1603–1611.
 20. Ovesná, J., Polaková, K., and Leisová L. 2002. DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding. *Czech. Journal Genetic Plant Breeding* 38:29–40.
 21. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding* 2:119–122.

22. Prevost, A., Wilkinson, M.J., 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98:107-112.
23. Rhode, W., and Becker, D. 1999. Analysis of coconut germoplasm by DNA marker technologies and sequence data. III. International Workshop and Laboratory Course on "The Application of Biotechnology to Plant Breeding and Crop Protection in Coconut". Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
24. Rohlf, F.J., 2000. NTSYSpc.: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Exeter Software, Setauket, NY.
25. Roldán-Ruiz I., Dendaum J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose, M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding.* 6:125-134.
26. Russell J. 1999. Assessing genetic diversity in coconut germoplasm using molecular markers. III. International Workshop and Laboratory Course on "The Application of Biotechnology to Plant Breeding and Crop Protection in Coconut". Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
27. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., and Stoffel, S. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
28. Samuels G.J., and Seifert K.F. 1995. The impact of molecular characters on systematic of filamentous ascomycetes. *Annual Review Phytopathology* 33:37-67.

29. Schutzbank, T. E., and Stern, H.J. 1993. Principles and applications of the polymerase chain reaction. *JIFCC* 5:96–104.
30. Shariflou, M.R., Hassani, M.E., and Sharp, P. J. 2001. A PCR based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the Wx-D1 gene of wheat. *Plant Breeding* 120:121–124.
31. Somers, D.J., Banks, T., Depauw, R., Fox, S., Clarke, J., Pozniak, C. and McCartney, C. 2007. Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome* 50:557–67.
32. Staub, J.E., Serquen, F.C., and Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Horticulture Science* 31:729–741.
33. Stuber, C.W., and Khanna, K.R. 1991. Isozyme markers and their significance in crop improvement. *Biochemical aspects of crop improvement*. CRC Press. Boca Raton USA pp 59–77.
34. Tatikonda, L. Wani, S. P., Kannan, S, Beerelli, N., Sreedevi, t.K., Hoisington, D.A., Devi, P., Varshney, R.K. 2009. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. *Plant Science* 176:505–513.
35. Vapa, L., and Radovic, D. 1998. Genetics and molecular biology of barley hordeins. *Cereal Res. Comm.* 26:31–38.
36. Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Aggarwal, R.K. Graner, A., 2007. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barley. *Plant Sci.* 173, 638–649.

37. White, T.J., Madej, T., and Persing, D.H. 1992. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv. Clin. Chem.* 29:161–196.
38. Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218:705–740.

AGRADECIMIENTOS

Esta publicación es producto de los trabajos de investigación financiados por el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI), a través del proyecto No. 1496942F: Colecta, caracterización y producción de cactáceas ornamentales.

Centros Nacionales de Investigación Disciplinaria, Centros de Investigación Regional y Campos Experimentales



- Sede de Centro de Investigación Regional
- Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
- Campo Experimental

Revisión Técnica

Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez
Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Comité Editorial del CIR-Noreste

Presidente

Dr. Jorge Elizondo Barrón

Secretario

Ing. Hipólito Castillo Tovar

Vocales

M. C. Luis Mario Torres Espinosa
Dr. Isidro Humberto Almeyda León
Dr. Jesús Loera Gallardo
Dr. Raúl Rodríguez Guerra
Dr. Antonio Palemón Terán Vargas
Dr. Rubén Darío Garza Cedillo

Código INIFAP

MX-0-310699-52-03-16-09-12

Esta publicación se terminó de imprimir en el mes de febrero de 2012 en los talleres de CITY PIXEL, Sierra Tarahumara No. 911, Col. Las Puentes 10° Sector, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Su tiraje consta de 500 ejemplares

CAMPO EXPERIMENTAL GENERAL TERÁN

Guillermo J. García Dessommes

Encargado del Despacho de la Dirección de
Coordinación y Vinculación en Nuevo León

Juan E. Padrón Chávez

Jefe de Operación

Samuel González Martínez

Jefe Administrativo

INVESTIGADOR

HUMBERTO DE LA FUENTE SAUCEDO

JUAN FRANCISCO PINALEZ QUIROZ

EFRAÍN ACOSTA DÍAZ

ISMAEL HERNÁNDEZ TORRES

JUAN EUTIQUIO PADRÓN CHÁVEZ

GUILLERMO J. GARCÍA DESSOMMES

JOSÉ ISABEL LÓPEZ ARROYO

RAÚL RODRÍGUEZ GUERRA

REYNA IVONNE TORRES ACOSTA

JUAN MARTÍNEZ MEDINA

PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN

AGROMETEOROLOGÍA Y MODELAJE

FERTILIDAD DE SUELOS Y NUTRICIÓN
VEGETAL

FRIJOL Y GARBANZO

FRUTALES

FRUTALES

PASTIZALES Y CULTIVOS FORRAJEROS

SANIDAD FORESTAL Y AGRÍCOLA

SANIDAD FORESTAL Y AGRÍCOLA

SANIDAD FORESTAL Y AGRÍCOLA

TRIGO Y AVENA



Vivir Mejor

www.gobiernofederal.gob.mx

www.sagarpa.gob.mx

www.inifap.gob.mx