

DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN DE *Opuntia ficus indica* “tuna” DEL INIA

Paula García-Godos Alcázar

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Biológicas
Programa de Investigación en Biodiversidad y Gestión Ambiental-Sub Programa de Biodiversidad
E-mail: paulagga30@hotmail.com

RESUMEN

La tuna, es un cultivo originario de los Andes que fue domesticada y en la actualidad existe una gran variabilidad genética, producto de la intervención del hombre y del medio ambiente. Las colecciones de recursos fitogenéticos han sido desarrolladas para ser utilizadas en el mejoramiento genético, y no simplemente para ser conservadas en los bancos de germoplasma, para la caracterización pueden utilizarse características morfológicas, fenológicas y de adaptación, además de los marcadores moleculares o bioquímicos. El estudio tuvo como objetivo determinar la variabilidad genética de *Opuntia ficus indica* “tuna”, de 40 colecciones del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria de Ayacucho, estas fueron caracterizadas a nivel molecular desarrollándose el análisis de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares AFLP. La calidad del ADN extraído mediante el protocolo Doyle & Doyle modificado, fue óptima para todas las muestras, obteniéndose concentraciones en un rango de 100 – 400 ng/μl. Un total de 5 combinaciones de primers generaron 233 bandas de ADN, siendo 208 *loci* polimórficos. Se encontró que la variación genética promedio fue de 0,276, con un índice de información de Shannon de 0,426. De acuerdo al dendrograma del agrupamiento de accesiones, se puede observar un árbol con grados de diferenciación entre las muestras analizadas utilizando el coeficiente Simple Matching. La correlación cofenética fue de 0.99354 (sig., p= 1.000) Indicando una muy buena representación del dendrograma con respecto a la matriz de distancia. Y a una distancia ultramétrica de 0.752 se distingue cuatro grupos. El grupo I incluye 23 accesiones de tuna y en el grupo II comprende 9 accesiones, así como los grupos III y IV con cuatro accesiones cada uno. Por lo que en el análisis no se observaron accesiones duplicadas o repetidas, todas las accesiones muestran ser diferentes. La investigación permite conocer las relaciones entre las accesiones y el grado de influencia del ambiente en la estructura genética, lo que aporta criterios para la elección de germoplasma en futuros programas de mejoramiento.

Palabras clave: Variabilidad genética, marcador molecular, AFLP, Accesiones, tuna.

GENETIC DIVERSITY OF *Opuntia ficus indica* “tuna” COLLECTION OF INIA

ABSTRACT

The prickly pear, is a native culture of the Andes that was domesticated and nowadays there is a great genetic variability, product of the intervention of man and the environment. The collections of plant genetic resources have been developed to be used in genetic improvement, and not simply to be conserved in the germplasm banks, for the characterization morphological, phenological and adaptation characteristics can be used, in addition to the molecular or biochemical markers. The objective of the study was to determine the genetic variability of *Opuntia ficus indica* "tuna", from 40 collections of the tuna germplasm bank of the National Institute of Agrarian Innovation of Ayacucho. These were characterized at the molecular level, developing the analysis of genetic variability using markers molecular AFLP. The quality of DNA extracted by the modified Doyle & Doyle protocol was optimal for all samples, obtaining concentrations in a range of 100-400 ng / μl. A total of 5 combinations of primers generated 233 DNA bands, with 208 polymorphic loci. The average genetic variation between the accessions and the degree of influence of the environment on the genetic structure, which provides criteria for the choice of germplasm in future breeding programs.

Key words: Genetic variability, molecular marker, AFLP, Accessions, tuna.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, surge cada vez con más fuerza la demanda de productos naturales, uno de ellos es *Opuntia ficus indica* “tuna” que se ha convertido en cultivo alternativo para producir fruta y forraje en zonas semiáridas. En años recientes, el consumo de tuna, se ha incrementado paulatinamente, al igual que la posibilidad de ampliar sus exportaciones como fruta exótica, lo cual ha incentivado su desarrollo como cultivo comercial. En este contexto la tuna es valorada por sus potencialidades nutraceuticas y se hace necesaria conocer la diversidad existente en nuestro país. El

conocimiento de las descripciones detalladas es necesaria en la utilización del germoplasma, debido a que en dicho germoplasma puede haber genes valiosos para utilizarse en los programas de mejoramiento. La colección extensiva y el mantenimiento de germoplasma son costosos, siendo uno de los problemas más importantes de las colecciones *in vivo*, agravándose cuando se trata de especies perennes. (Kresovich *et al.*, 1993).

La identificación del germoplasma y el análisis de los esfuerzos futuros de colección son facilitados si se entiende la naturaleza de la variabilidad. Por lo que en la investigación

se caracterizó molecularmente mediante AFLP las diferentes colectas de “tuna” del banco de germoplasma del INIA-Ayacucho.

La investigación se planteó los siguientes objetivos: General: Caracterizar la diversidad genética de las poblaciones de tuna del departamento de Ayacucho y los específicos: a) Determinar la variabilidad genética de las poblaciones de tuna mediante marcadores AFLP y b) Determinar la distancia genética entre diferentes accesiones y poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recolección de la muestra

Las muestras fueron recolectadas del Banco de germoplasma de tuna del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Ayacucho, en un número de 40, las cuales fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología de la UNSCH, para la caracterización molecular.

2. Caracterización molecular

Se empleó los marcadores AFLP. La extracción del ADN se realizó por el protocolo de Doyle & Doyle (1987) adaptado por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

2.1. Extracción del ADN:

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de extracción que contiene CTAB. (Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio) de Doyle & Doyle (1987), adaptado por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria La Molina.)

- a. Se procedió a obtener aproximadamente entre 3 a 4 g de tejido foliar en buen estado y se trituró utilizando 700 µl de buffer CTAB 2X- 2ul mercaptoetanol. Luego, el material triturado se transfirió a un tubo eppendorf. Se homogenizó las muestras por inversión y se colocó a 60-65°C en Baño María por 45 minutos, mezclando ocasionalmente cada 15 minutos.
- b. Seguidamente a cada tubo se le agregó 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) se mezcló por inversión y luego se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm.
- c. El sobrenadante fue removido a un tubo eppendorf estéril. Luego se añadió 50 µl de CTAB 10% - NaCl 7M, y se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por 15 minutos. Al mismo tubo Eppendorf se añadió 700 µl cloroformo - alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló hasta lograr una disolución total, para centrifugarlo por 10 minutos a 14000 rpm.
- d. Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos y se agregó 200 µl NaCl 5 N, el tubo fue agitado suavemente, y se le añadió 500 µl cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) luego se mezcló y centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm.
- e. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al cual se

le agregó 500 µl de isopropanol frío. Mezclándolo suavemente hasta que se observó la formación de la medusa de ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm apreciándose la formación del pellet de ADN.

- f. El sobrenadante se descartó y el pellet de ADN obtenido se lavó dos veces con 700 µl de etanol al 70% y centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm. Y una tercera vez con etanol al 90% y centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm. Finalmente se descartó el etanol y se invirtió los tubos abiertos para secar el pellet de ADN a temperatura ambiente durante toda la noche.
- g. Para diluir el ADN se resuspendió el pellet en 60- 80 µl de buffer T₁₀E₁ (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1mM), se trató con y 2 µl de RNAsa y se incubó a 37 °C durante 3 horas. Las muestras se almacenaron a -20°C.

2.2. Calidad y Cuantificación de ADN

La calidad y cuantificación del ADN genómico se determinó en geles de agarosa al 1%. Para ello, se tomó 1 µl del stock de ADN extraído y 9 µl de tampón de corrida 1X, y la mezcla se colocó en gel que previamente se había tratado con bromuro de etidio. También se cargó 6 µl del marcador de peso molecular λ ADN digerido con *Pst* I (representando la primera banda 280 ng/µl que representa 14000 pb). Se realizó la corrida electroforética con el equipo horizontal Electronyx Maxi Model EH20, Nyxtechnik a una carga de 90 voltios durante 60 minutos, usando como tampón de corrida TBE 1X. La cuantificación se realizó comparando la intensidad de fluorescencia del ADN de cada muestra con la intensidad fluorescente del marcador λ ADN, lo cual permitió estimar la concentración de ADN de las muestras.

2.3. Análisis de AFLP

El análisis de AFLP, se realizó según el procedimiento descrito por Vos *et al.* en el manual del Kit AFLP de Invitrogen, adaptado por el CIP con algunas modificaciones.

a) Digestión del ADN Genómico

El ADN extraído de las muestras de colectas de tuna se llevó a una concentración final de 50, 100, 200, 300 y 400 ng/ul para la estandarización de la técnica, las cuales se digirió con dos enzimas de restricción, una de corte raro *EcoR* I y otra de corte frecuente *Mse* I. Se preparó una mezcla de reacción conteniendo H₂O libre de nucleasas (9.5 µl), *Mse* I NEB 5U (0.5µl), *EcoR* I NEB 10 U (1 µl), buffer 10X (2.0 µl), BSA 1mg/ml (2.0) y ADN (5 µl) obteniéndose un volumen de 20 µl, luego esta mezcla de reacción de digestión fue incubada a 37°C hasta el día siguiente. Finalizado el proceso de digestión del ADN de las muestras de tuna, se conservaron a -20 °C.

Se verificó la digestión del ADN genómico, realizando electroforesis de 5 µl de muestra de ADN digerido en geles de agarosa 1 %, en el cual se visualizó un barrido de ADN muy tenue en el transiluminador UV.

b) Ligación de adaptadores

a. Preparación de adaptador *EcoR* I:

Se mezcló 10 µl de la cadena *EcoR* I adapter1 y 10 µl de la

cadena de *EcoR* I adapter2, y se adicionó agua milli Q hasta un volumen final de 100 µl. Los adaptadores *EcoR* I se prepararon bajo condiciones de PCR. La concentración del adaptador *EcoR* I será de 10 µM. A continuación se muestra la secuencia de las cadenas *EcoR* I adapter1 y *EcoR* I adapter2:

EcoR I adapter1 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
EcoR I adapter2 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'

b. Preparación de adaptador *Mse* I:

Se mezcló 33.3 µl de la cadena *Mse* I adapter1 y 33.3 µl de la cadena de *Mse* I adapter2, y se adicionó agua hasta un volumen final de 100 µl. Los adaptadores *Mse* I se prepararon bajo condiciones de PCR. La concentración del adaptador *Mse* I fue de 100 µM.

A continuación se muestra la secuencia de las cadenas *Mse* I adapter1 y *Mse* I adapter2:

Mse I adapter1 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
Mse I adapter2 5'-TACTCAGGACTCATC-3'

Las condiciones de la PCR para la preparación de adaptadores fueron, 95 °C x 2 min, 65 °C x 10min, 37 °C x 10min, 25 °C x 10 min, 4 °C x 25 min. Luego de la preparación de los adaptadores se conservaron a -20 °C.

c) Ligación

Para realizar la ligación de adaptadores complementarios a los cortes de cada una de las enzimas de restricción, se prepararon mezclas de reacción de ligación con los siguientes componentes: ADN genómico digerido (21 µl), H₂O libre de nucleasas (0.2 µl), adaptador *EcoR* I 10 µM (1 µl), adaptador *Mse* I 100 µM (1 µl), Buffer de ligasa NEB (2.5 µl) y T4 ADN ligasa (0.3 µl). Una vez obtenido la mezcla de ligación se agregó a 21 µl de ADN genómico digerido. Luego esta mezcla de reacción de digestión/ligación (DL) se mezcló, centrifugó y se incubó a 16 °C por toda la noche. Finalizada la incubación, se realizó una dilución de 1:3 de la mezcla digestión/ligación (DL) con solución tampón TE (10Mm, Tris-HCL (pH 8.0), 0.1 mM EDTA).

d) Preamplificación (00/00)

Para la preamplificación (00/00) se utilizó strips para PCR y se les adicionó los siguientes componentes: 14.05 µl de H₂O libre de nucleasas, 2.5 µl de Buffer 10X PCR, 1.25 µl de mezcla de dNTPs 5 mM, 1 µl de iniciador *EcoRI*+1 (50 ng/µl), 1 µl de iniciador *Mse* I+1 (50 ng/µl), 0.2 µl de Taq polimerasa y 5 µl la dilución 1:3 de ADN digerido/ligado. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler. Finalizada la preamplificación, se realizó diluciones del PCR 0/0 con H₂O libre de nucleasas.

e) Amplificación Selectiva

Para la amplificación selectiva (+3/+3) se adicionó los siguientes componentes a la mezcla de reacción: 0.9 µl de H₂O libre de nucleasas, 1.1 µl de Buffer 10X PCR, 0.6 µl de mezcla de dNTPs 5 mM, 2 µl de iniciador *EcoR* I +3 (50 ng/µl), 0.3 µl de iniciador *Mse* I+3 (50 ng/µl), 0.1 µl de Taq polimerasa y 5 µl de ADN preamplificado (se realizó diferentes diluciones 1:4, 1:6, 1:10, 1:20 para verificar cual es la adecuada). La mezcla obtenida se agitó suavemente, centrifugó y se amplificó en el

termociclador.

Para este estudio se realizó un tamizado de 12 combinaciones de iniciadores AFLP de las colectas de tuna escogidos al azar, y se eligió las mejores combinaciones por presentar buena resolución de bandas, buen nivel de polimorfismo y buena reproducibilidad.

f) Separación de los productos de AFLP en geles de poliacrilamida al 6 %

Los productos de la amplificación selectiva se separó con un equipo de electroforesis vertical Cleaver Scientific, model CSQ20 en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%.

Se mezcló el producto de la amplificación selectiva con 5 µl de amortiguador de carga.

g) Tinción y revelado de los geles de poliacrilamida

Se realizó el revelado de la corrida electroforética utilizando el método de tinción en nitrato de plata y el revelado con carbonato de sodio.

Como referencia se utilizó un marcador de 100 bp Plus DNA Ladder (*genbiotech*).

h) Lectura de geles

La lectura de las bandas de los geles se realizó registrando la presencia o ausencia de bandas para cada accesoión, lo cual se expresó en una matriz binaria como “1” para indicar presencia y “0” para indicar ausencia de una banda específica. Los fragmentos del mismo peso molecular se consideraron el mismo locus. Una vez hecha la lectura de las bandas, cada gel se registró digitalmente para almacenar su perfil de bandas de ADN.

2.4. Análisis Estadístico

Para este análisis, previamente se eligió como OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas) a las muestras correspondientes a las colectas de tuna, y como caracteres, al dato doble-estado (presencia o ausencia del marcador molecular AFLP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de ADN: Calidad y Concentración

En la extracción de ADN de tuna, las concentraciones obtenidas se encontraron en un rango de 100 – 400 ng/µl (Figura 1). La calidad del ADN extraído fue óptima para todas las muestras, obteniéndose un ADN genómico no degradado ya que se observaron bandas de buena resolución sin la presencia de un barrido que indica degradación mecánica o química del ADN. El uso de la RNAsa fue adecuado ya que permitió la degradación del RNA eliminando así cualquier interferencia en el procedimiento. La técnica utilizada en la cuantificación de ADN fue el análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa. La estimación se realizó con facilidad, ya que la fluorescencia emitida es proporcional al total de la masa de ADN o RNA.

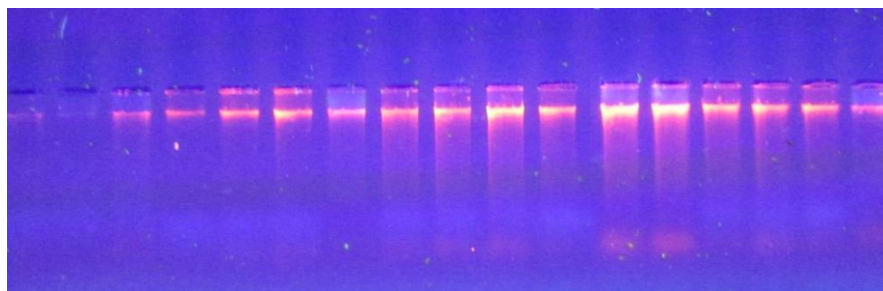


Figura 1. Análisis electroforético de la calidad y cantidad de ADN extraído de colectas de tuna.

2. Selección de combinaciones de iniciadores AFLP

Se utilizaron 12 combinaciones de iniciadores AFLP (E32M61, E38M60, E38M47, E45M61, E38M32, E38M61, E45M32, E32M60, E33M48, E33M61) de los cuales fueron seleccionados 5 combinaciones en base al

polimorfismo y buena resolución de bandas. Estas fueron E38M60, E45M61, E33M48, E38M61, E32M61. Se muestran bandas polimórficas y monomórficas producidas con los marcadores AFLP.

Tabla 1. Bandas monomórficas y polimórficas obtenidos con cinco combinaciones de iniciadores en el análisis de AFLPs de tuna.

Iniciadores	Total de bandas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas
E33M60	79	6	73
E45M61	10	3	7
E33M61	59	4	55
E33M48	41	7	34
E38M61	34	5	29
Total	233	25	208
Promedio	46,6	5,00	41,60
%	100	10,73	89,27

En la Tabla 1 se observa que las cinco combinaciones de iniciadores AFLP generaron un total de 233 bandas de ADN. La combinación de iniciador E33M60 generó mayor

cantidad de bandas (79 bandas), y la combinación E45M61 generó menor número de bandas (10 bandas), con un promedio de 46,6 bandas en total.

Tabla 2. Bandas polimórficas obtenidos con cinco combinaciones de iniciadores en el análisis de AFLPs de tuna.

Combinación de iniciadores	Bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas (%)
E33M60	73	35,10
E45M61	7	3,37
E33M61	55	26,44
E33M48	34	16,35
E38M61	39	18,75
Total	208	100,00

Además se observa en la Tabla 2, que la combinación de iniciadores que detectó un mayor porcentaje de bandas polimórficas fue la combinación E33M60, mostrando 73 bandas polimórficas con un 35,10 %, y la combinación que detectó menor porcentaje de bandas fue la E45M61, mostrando 7 bandas polimórficas con un 3,37. Se realizó el cálculo del contenido de información polimórfica (PIC) siendo éstas de 13,51, 0,98, 12,41, 9,42, 8,21 y 11,2 para la

combinación de iniciadores E33M60, E45M61, E33M48 Y E38M61 respectivamente. La combinación E33M60 Y E33M61 presentaron el Índice de combinación de iniciadores más alto, siendo esta 13,51 Y 12,41, por ello estas combinaciones se puede sugerir como una combinación de elección en futuras investigaciones a nivel de análisis con AFLPs para estudios en tuna.

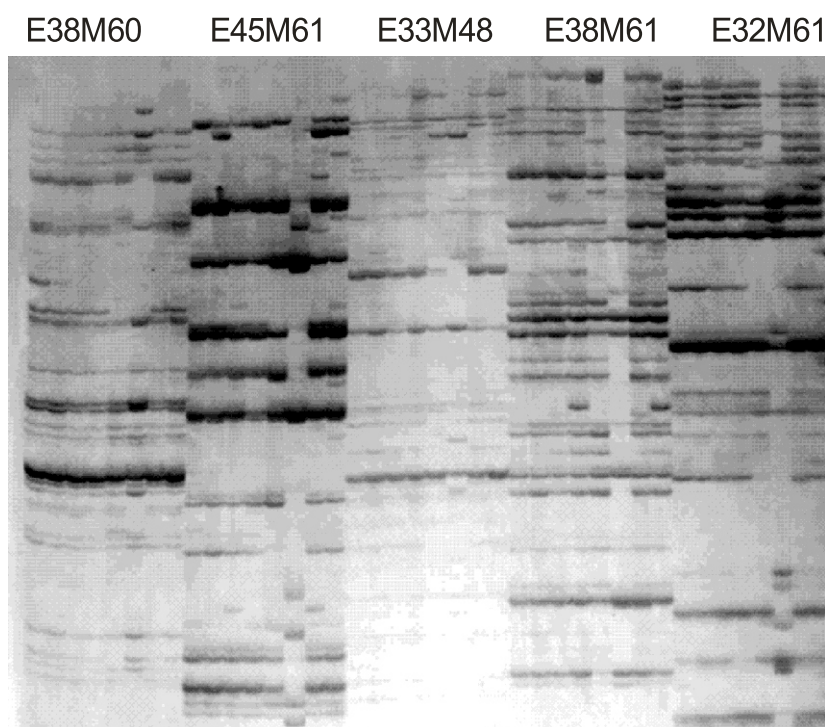


Figura 1. Patrón de bandas AFLP obtenido de cinco combinaciones de iniciadores en *Opuntia ficus indica* "tuna". Ayacucho 2018.

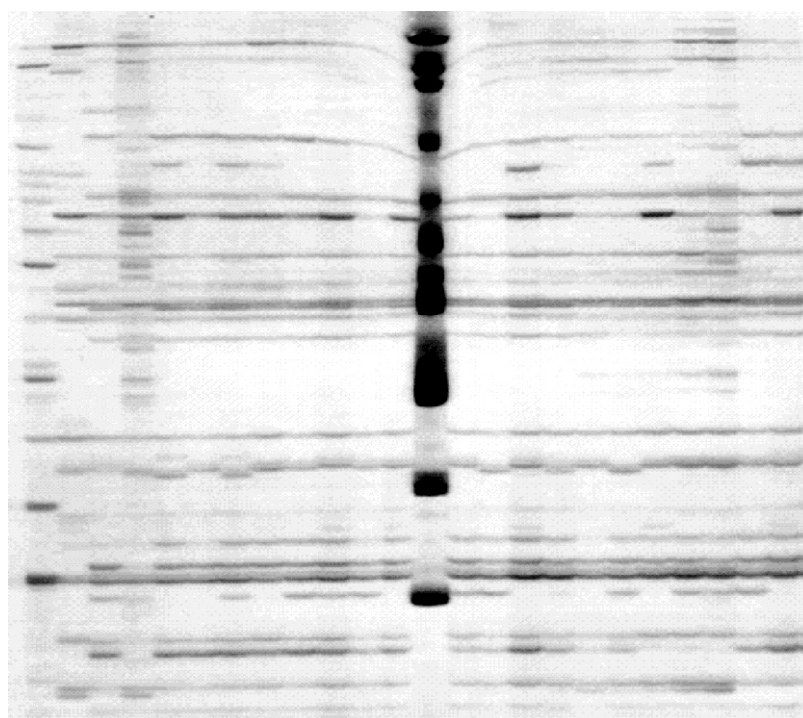


Figura 2. Perfil de amplificación AFLP de *Opuntia ficus indica* "tuna". Combinación de iniciadores E33M48 y "M" representa el marcador de peso molecular. Ayacucho 2018.

En el análisis molecular de tuna de las 40 muestras, se encontró que la variación genética promedio fue de 0,276, con un índice de información de Shannon de 0,426. De acuerdo al dendrograma del agrupamiento de accesiones de tuna procedentes del banco de germoplasma INIA Ayacucho, en el agrupamiento se puede observar un árbol con grados de diferenciación entre las muestras analizadas utilizando el

coeficiente Simple Matching. La correlación cofenética fue de 0.99354 (sig., $p=1.000$) Indicando una muy buena representación del dendrograma con respecto a la matriz de distancia. Y a una distancia ultramétrica de 0.752 se distingue cuatro grupos. El grupo I incluye 23 accesiones de tuna y en el grupo II comprende 9 accesiones, así como los grupos III y IV con 4 accesiones cada uno. Por lo que en el

análisis no se observaron accesiones duplicadas o repetidas, todas las accesiones muestran ser diferentes.

Se realizó el cálculo del Índice de heterocigocidad media, siendo esta 0,26; teniendo en cuenta que el máximo valor que se puede alcanzar es 0,5, podemos indicar que estos resultados mostraron bajo nivel de polimorfismo genético de las accesiones procedentes del banco de germoplasma del INIA Ayacucho.

La investigación logró analizar la diversidad genética de las 40 colecciones de tuna pertenecientes al banco de germoplasma del Instituto Nacional de Innovación Agraria-Ayacucho, la metodología de Doyle y Doyle (1990) modificado, para el aislamiento de ADN genómico a partir del parénquima de tuna fue óptima, ya que se obtuvo como resultado un DNA con buen grado de pureza y en concentraciones suficientes (100 – 400 ng/μl) para su amplificación mediante la técnica AFLP, la estandarización de la técnica AFLP mostraron fragmentos amplificados con alta resolución y reproducibilidad, permitieron generar un gran número de loci con un rango de tamaño de 100 – 2000 pb. determinándose que a concentraciones entre 100 y 400 ng/μl fueron las concentraciones adecuadas de ADN digerido que permitieron continuar de manera eficiente la técnica de AFLP, además se determinó que diluciones 1:4 fueron los que mostraron perfiles de amplificados mucho más claros e intensos. Y la variación genética promedio fue 0,276 y el índice de Shannon fue 0,426. Por lo tanto se evidencia que existe un bajo grado de diversidad genética en las accesiones analizadas.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) – Ayacucho. En especial al Ing. Ignacio Juan Tieno Canchari.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alimentación Sana Org. (2010). El Nopal y sus Propiedades.

Brown PO, Botstein D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* [internet]. 1999. [citado 15 de marzo de 2015]; 21: 33-37.

Doyle JJ; Doyle JL. (1990). Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. *Focus* 12:13-15.

Excoffier, L., G. Laval y S. Scheider. (2005). Alerquin. Un software integrado para el análisis de Genética de Poblaciones de datos. Instituto Zoológico de la Universidad de Berna - Suiza.

Ferreira M; Grattapaglia D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia-Brasil.

Ferreira M; Grattapaglia D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia-Brasil.

González F, Pita J. (2001). Conservación y caracterización de Recursos Filogenéticos. Publicaciones I.N.E.A. Valladolid. España.

Kresovish S.; William J.; Mcferson J.; Routman E.; Schaal B. (1993). Characterization of genetic identities and relationships of Brassica oleracea L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: 1-7.

Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. 2da. Edic. Edit: INTA. Buenos Aires. Argentina.

Reynolds S. y Arias – Jimenez E. (2010). Grupos de Pastizales y Cultivos Forrajeros División de producción Vegetal. Edit. FAO.

Rohlf, J. (2000). NTSYs pc. University of New York. Stony Brook, NY 11794-5245.

Sevilla PR, Holle S.M. (2004). Recursos Genéticos Vegetales. Lima, Ediciones Torre Azul SAC.p. 445.

Valadez E, Kahl G. (2000). Huellas de AND en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-prensa México, S.A. de C. V.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M. (1995). AFLP: a new technique ADN fingerprinting. *Nucleic acids research.* [internet]. [citado 20 de marzo de 2015]; 23: 44407-4414.