ISBN: 978-607-00-2083-4

Análisis de marcadores ISSRs e ISTRs en genoma de *Ferocactus histrix*

Patricia Castro-Félix[1], Alejandro Muñoz Arias[3], Isabel Torres Morán[2], Verónica Palomera-Ávalos y Anne Santerre Lucas[1]

[1] Departamento de Biología Celular y Molecular
[2] Departamento de Producción Agrícola
[3] Departamento de Ecología
CUCBA, Universidad de Guadalajara. Km 15. Carretera a Nogales, Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jalisco. México. C. P. 45110. CUCBA, Universidad de Guadalajara.
Correo electrónico: pcastro@cucba.udg.mx

Introducción

México es el principal centro de diversidad de cactáceas a nivel mundial (Bravo y Sánchez Mejorada 1978). Hunt (1992) reconoce 48 géneros con un total de 563 especies distribuidas principalmente en las zonas áridas y semiáridas del país. El porcentaje de endemismo calculado para las cactáceas mexicanas es aproximadamente de un 80% (Hernández y Godínez 1994; CONABIO 2006).

Ferocactus histrix (DC.) Lindsay, especie endémica conocida comúnmente como biznaga (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991), es utilizada como planta de ornato y medicinal y es uno de los cactus más requeridos en México para la elaboración de confituras; con frecuencia las plantas son utilizadas como alimento y fuente de agua para el ganado caprino (Del Castillo y Trujillo 1991; Huerta-Martínez y Escobar 1998). Asimismo, los botones florales y los frutos de *F. histrix* son consumidos y comercializados por los pobladores locales. Su área de distribución es extensa, abarca las zonas semiáridas del centro de México, específicamente el Altiplano Mexicano y regiones adyacentes de las Sierras Madre Oriental y Occidental, crece sobre cantiles y escombros de talud y presenta poco translapamiento con otras especies de *Ferocactus*.

Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados del reino vegetal. Aproximadamente el 38% de las cactáceas mexicanas presentan problemas de conservación y el 11% se encuentran en peligro de extinción (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2002). La estructura y la densidad de la mayoría de las poblaciones de *F. histrix* se han visto seriamente afectadas en los últimos años. En la más reciente actualización de la Norma Oficial Mexicana *F. histrix* aparece en el apéndice de especies en riesgo de extinción (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2002).

El grado y el nivel de diversidad genética que presentan las poblaciones naturales de una especie y la distribución y estructuración de esa diversidad en el espacio y en el tiempo, son aspectos fundamentales que deben considerarse en los proyectos de conservación biológica. Ambos constituyen la base científica para llevar a cabo estrategias de conservación efectivas en especies que se encuentren amenazadas o en peligro de extinción (Barret y Kohn 1991; Primarck 1995).

El desarrollo y el uso de marcadores moleculares en las últimas décadas, específicamente de aquellos que se basan en la amplificación del ADN por medio de la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction de sus siglas en inglés) han facilitado el análisis y la medición de la diversidad genética. Sin embargo, son muy pocas las especies de cactáceas mexicanas estudiadas con este tipo de herramientas (Clark Tapia et al. 2005; Otero-Arnaiz et al. 2004). No se han realizado estudios que involucren el uso de

marcadores moleculares en *F. histrix*, por lo que es importante generar y seleccionar marcadores en esta especie que revelen el nivel y la distribución de la variación genética.

Los ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeat de sus siglas en inglés) son marcadores que se obtienen por la amplificación por PCR de segmentos de ADN que se encuentran entre dos secuencias de microsatélites iguales e invertidas (Zietkiewiez et al. 1994). Los ISTRs (Inverse Sequence Tagged Repeat de sus siglas en Inglés) son marcadores producidos por la amplificación de secuencias de elementos *Copia*, que son LTR-retrotransposones encontrados en eucariotas (Rohde 1996). Ambos son marcadores multiloci, dominantes y han sido utilizados con éxito en estudios de diversidad genética en plantas (Cariaga et al. 2005; Bornet el al. 2002).

El objetivo de este trabajo es generar y analizar los patrones de amplificación de marcadores ISSRs e ISRTs en genoma de *F. histrix* y evaluar la posibilidad de emplearlos en estudios de diversidad genética de esta especie.

Materiales y Métodos

Material vegetal y extracción de ADN

Se recolectaron muestras de material vegetal de *F. histrix* de la población localizada en el Rayo, Zac. La extracción de ADN se realizó siguiendo el método de Cota et al. (2006) con algunas modificaciones. Se cuantificó el ADN total por espectrofotometría (Sambrook et al. 1989), se diluyó a una concentración de 25 ng/µl y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Amplificación de marcadores ISSRs

Se examinaron los patrones de amplificación de un total de 20 iniciadores, las secuencias y las temperaturas de alineación de cada iniciador se muestran en el Cuadro 1. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl. La reacción de amplificación contenía 50 ng de ADN genómico total y amortiguador para PCR 1X, 1U de *Taq* polimerasa, 25 picomoles de iniciador, $MgCl_2$ y dNTPs a concentraciones finales 2.5 mM y 200 µM respectivamente. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 min, la temperatura de alineación específica para cada iniciador por 1 min, 72°C por 2 min y un paso final de 72°C por 7 min. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (w/v) y se tiñeron con bromuro de etidio.

Amplificación de marcadores ISTRs

Se generaron marcadores ISTRs con un total de 28 combinaciones de 4 iniciadores ISTR-F (Forward: F1, F4, F9 y F21) con 7 ISTR-B (Backward: B1, B6, B8, B10, B71, B81 y B 101). La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl. La reacción de amplificación contenía 50 ng de ADN genómico total, amortiguador para PCR 1X, 1U de *Taq* polimerasa, 6 picomoles de cada iniciador, $MgCl_2$ y dNTPs a concentraciones finales 3 mM y 250 µM respectivamente. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 30 s, 45°C por 1 min, 72°C por 2 min y un paso final de 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (w/v) y se tiñeron con bromuro de etidio.

Resultados y discusión

La estimación de la diversidad genética en poblaciones naturales es fundamental para establecer planes de conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción. Con el desarrollo de la PCR surgieron una serie de marcadores moleculares que facilitaron el análisis del genoma de plantas. Los ISSRs son uno de estos tipos de marcadores, el procedimiento para producirlos es la variante de la técnica conocida como AMP-PCR (Anchored microsatellite primed-PCR de sus siglas en inglés), se emplean iniciadores para la reacción de PCR formados por repeticiones de dinucleótidos o trinucleótidos y por bases no repetidas que funcionan para anclar el iniciador al templete de ADN (Zietkiewicz et al. 1994).

Entre las ventajas que presenta la técnica de ISSRs se encuentran las siguientes: 1. el diseño del iniciador asegura el alineamiento del mismo solamente al extremo de un microsatélite; 2. el anclaje del iniciador permite que amplifiquen solamente un subgrupo de las regiones que se encuentran entre las repeticiones, reduciendo considerablemente el número de amplificados generados cuando se utilizan iniciadores formados por secuencias de di y trinucleótidos, 3. el anclaje asegura que el microsatélite blanco sea parte del producto, lo que incrementa la probabilidad de observar polimorfismos (Weising et al. 2005). De los 20 iniciadores utilizados en este trabajo para amplificar ISSRs en *F. histrix*, 18 fueron iniciadores anclados (Cuadro 1).

La generación de datos utilizando ISSRs ha mostrado ser conveniente para estudios intraespecíficos de genética de poblaciones. Sin embargo no se ha evaluado la utilidad de estos marcadores para realizar estudios de diversidad genética en *F. histrix*. Diecinueve de los 20 iniciadores produjeron marcadores ISSRs en esta especie (Cuadro 1) (Figura 1). El tamaño de los productos amplificados varió entre 100 a >2000 pb, lo mismo que el número de productos amplificados y el número de bandas intensas.

Cuadro 1. Secuencias, temperaturas de alineación, número de *loci* amplificados y número de bandas intensas por iniciador ISSR.

Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineación (ºC)	Número de loci	Número de bandas intensas
$(AC)_8YG$ [1]Y=C o T	52	12	4
$(GACA)_4$ RY [2]R= A o G	55	12	1
$(ACTG)_4$ RG	55	11	2
$YR(GACA)_6$	40	10	0
$(CTG)_5$	55	9	2
$(GA)_8C$	56	9	0
$(GACAC)_3$ RG	64	8	2
$(CA)_8$ CT	48	8	0
$(GA)_8T$	50	7	7
$(AC)_8YA$	50	7	2
$YR(ACTG)_3$	40	7	2
$(GA)_8YC$	60	7	2
$(CA)_8RT$	55	7	3
$(CA)_8$ GT	48	5	5
$(GA)_8YG$	60	5	1

$(GCC)_5$	65	5	0
(CA)8 G	45	5	0
$(TC)_8$RT	55	4	2
$(CT)_8$A	50	3	3
$(AT)_8$ RG	42	0	0

[1]Y=C o T
[2]R= A o G

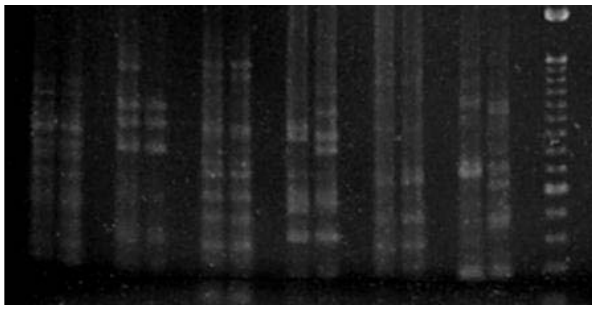

Figura 1. Patrones de amplificación en *Ferocactus histrix* de un grupo de iniciadores ISSRs. El último patrón corresponde al marcador de 100 pb.

Los retrotransposones son elementos que se mueven dentro del genoma a través de un intermediaron de ADN y constituyen una parte importante de genoma de plantas superiores; el 50% del genoma del maíz y más del 90% del genoma de trigo consiste de secuencias de retrotransposones (Aga y Bryngelsson, 2006). Se agrupan en dos clases dependiendo de la presencia o ausencia de LTR. Los retrotransposones LTR han sido utilizados para diseñar iniciadores que permitan desarrollar nuevos marcadores moleculares (Rhode et al. 1996). Los ISTRs se basan en la amplificación por PCR de secuencias LTR.

Del total de 28 combinaciones de iniciadores ISTRs utilizadas en este trabajo, cinco no amplificaron, 11 produjeron patrones de amplificación de menos de 5 loci y 12 amplificaron 5 o más *loci*. El tamaño de los productos varió de 200 a 2000 pb y en general el número de bandas intensas fue reducido. La intensidad de la amplificación de estos marcadores sugiere la necesidad de resolverlos con una técnica más sensible, como sería la electroforesis en geles de poliacrilamida con tinción de plata.

Cuadro 2. Combinación de iniciadores ISTR que amplificaron al menos cinco *loci* en geles de agarosa.

Combinación de iniciadores F/B	Número de *loci*	Número de bandas intensas
F1/B10	13	1
F1/B1	8	1
F10/B101	7	1
F1/B101	7	0
F1/B6	7	0
F9/B81	6	2

F1/B71	6	1
F9/B10	5	2
F9/B101	5	0
F1/B81	5	0
F10/B6	5	0
F10/B81	5	0

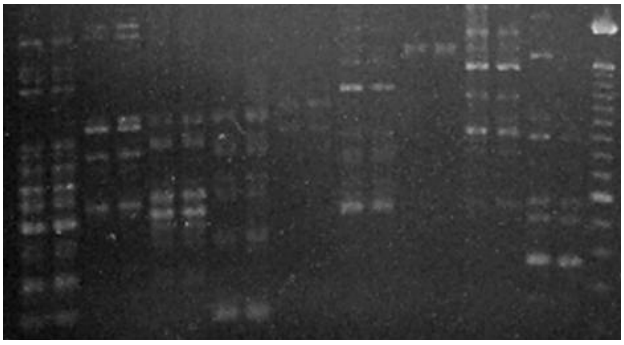

Figura 2. Patrones de amplificación en *Ferocactus histrix* de un grupo de combinaciones de iniciadores ISTRs. Marcador de 100 pb. El último patrón corresponde al marcador de 100 pb.

Finalmente, es importante señalar que con un grupo de iniciadores ISSRs y ISTRs, se observaron *loci* polimórficos al generar los patrones de amplificación de dos muestras diferentes de *F. histrix*. Por lo tanto, es muy probable que estos marcadores sean útiles para conocer los niveles y la estructura de la diversidad genética de esta especie.

Conclusiones

- Es posible generar marcadores ISSR e ISTRs en genoma de *F. hixtrix*.
- El número de *loci* revelados en geles de agarosa con la técnica de ISSRs es mayor que el número observado con la técnica de ISTRs.
- El patrón de amplificación en geles de agarosa de los ISSRs es mejor que el de los ISTRs.
- Es necesario resolver los patrones de amplificación de los ISTRs en geles de poliacrilamida.
- Ambos marcadores son útiles para realizar estudios de diversidad genética en *F. histrix*.

Bibliografía

Aga, E. y T. Bryngelsson. 2006. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) análisis of genetic variability in forest coffee (*Coffea arabica* L.) from Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 721-728.

Barrett, S.C.H y J.R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger

KE, eds. *Genetic and conservation of rare plants*. New York: Oxford University Press, 3-30.

Bornet B., F. Goraguer. G. Joly y M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* Subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*, 45: 481-484.

Bravo-Hollis, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. *Las cactáceas de México* (Vol. II), 2nd ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 404 pp.

Cariaga, K. A., C. E. Lewis, J. Maschinski, S. J. Wright y J. Francisco-Ortega. 2005. Patterns of Genetic Diversity in the Critically Endangered Florida Key Endemic *Consolea corallicola* Small (Cacataceae): Evidence from Inter-Simple Sequence Repeat (ISSRs) DNA Polymorphisms. *Caribbean Journal of Science*, 41(2): 225-233.

Clark-Tapia, R, C. Alfonso-Corrado, L. E. Eguiarte y F. Molina-Freaner. 2005. Clonal diversity and distribution in Sterocereus Eruca (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany,* 92: 272-278.

CONABIO. 2006. Capital natural y bienestar social. Comisión Natural para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

Cota-Sánchez, J. H., K. Remrchuk y K. Ubayasena. 2006. Ready to use DNA extracted with CTAB method adapted for Herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24: 161-167.

Del Castillo, R.F. y S. Trujillo. 1991. Ethnobotany of *Ferocactus histrix* and *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) in the semiarid Central Mexico: Past, present and future. *Economic Botany*, 45: 495-502.

Hernández, H. M. y H. Godínez A. 1994. Contribución al conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, 26:33-52

Huerta-Martínez, F.M. y V.E. Escobar-Santos. 1998. Estatus ecológico actual de *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay en los llanos de Ojuelos, Jalisco-Zacatecas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 43: 57-63.

Hunt, D. 1992. CITES *Cactaceae* checklist. 2nd ed. Kew, U.K. Royal Botanic Gardens and Internacional Organization for Suculent Plant Studies.

Otero-Arnaiz, A., J. Cruse-Sanders, A. Casas y J.L. Hamrick. 2004. Isolation and characterization of microsatellites in the columar cactus: *Polaskia chichipe* and cross-species amplificaction within the tribe Pachycereeae (Cactaceae). *Molecular Ecology*, 4: 265-267.

Primarck, R. 1995. *A primer of conservation biology*. Sinauer-Sunderland, U.S.A. Pp 277.

Rhode, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom. *Journal of Genetics & Breeding*, 50: 249-261.

Sambrook J., E. F. Fritish y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, E. U. A. Vol. 1

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-2001, Protección ambiental-especies nativas de México de flore y fauna silvestres- categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff y G. Kahl. 2005. *DNA fingerprinting in Plants: principles, Methods, and Applications*. CRC Press, EUA. Pp 92.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski y P. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomic*, 20: 176-183.