



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GENÉTICA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR  
DE VARIEDADES DE NOPAL  
(*OPUNTIA* SPP.) CON  
MICROSATÉLITES**

MIGUEL ANGEL PACHECO AGUILAR

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2017

La presente tesis titulada: **Caracterización molecular de variedades de nopal (*Opuntia spp.*) con microsatélites**, realizada por el alumno: **Miguel Angel Pacheco Aguilar**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

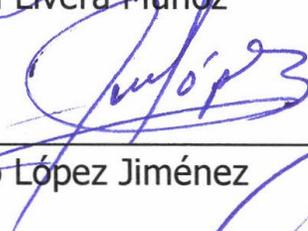
**MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GENETICA**

CONSEJO PARTICULAR

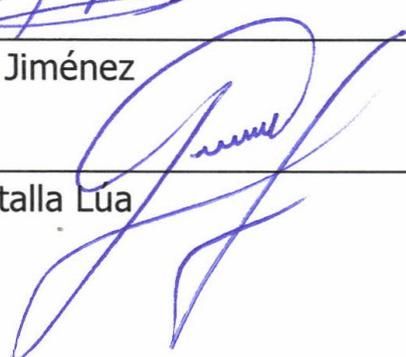
CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Livera Muñoz

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alfredo López Jiménez

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
MC. Alfonso Muratalla Lua

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2017

# **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VARIEDADES DE NOPAL (*OPUNTIA* SPP.) CON MICROSATÉLITES**

**MIGUEL ANGEL PACHECO AGUILAR, M. en C.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017**

## **RESUMEN**

México es centro de origen y diversidad del nopal (*Opuntia* spp.), y de 181 especies que tiene el género, en México se distribuyen 76. En el país los nopales se han aprovechado desde tiempos precolombinos como fuente importante de fruta y verdura, entre otros usos, existiendo una amplia diversidad genética en el germoplasma silvestre y las variedades sobresalientes seleccionadas por productores y por fitomejoradores. En el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, desde la década de los años sesenta se tiene en marcha un programa de mejoramiento genético del nopal que ha generado variedades y tecnología para la producción de fruta y verdura. Otras contribuciones recientes del programa son dos variedades y tecnología para la obtención de frutos de alta calidad, sin semilla y una variedad para la producción de nopalitos de color morado. Esta investigación tuvo como objetivos: 1) conocer la diversidad genética en un grupo de 41 genotipos incluyendo algunas variedades que son ampliamente utilizadas por los agricultores y otras que no lo son, pero que tienen un alto potencial; 2) obtener la huella genética de las variedades productoras de tunas de alta calidad y sin semilla y de la que produce nopalitos color morado, utilizando microsatélites; y 3) en la progenie de CP-Tepemor continuar con la selección de genotipos que produzcan nopalitos con color morado. Se realizó la extracción de ADN con el Kit ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen, se amplificaron 26 microsatélites por PCR y se llevó a cabo una electroforesis capilar con un secuenciador de ADN (Genetic Analyzers ABI® 3130, Applied Biosystems). Con los datos obtenidos se realizaron

fenogramas y perfiles alélicos. Los resultados obtenidos son: 1) de manera general, los genotipos estudiados se agruparon de acuerdo a la especie perteneciente; 2) se obtuvo la huella genética de las dos variedades productoras de tuna de alta calidad y de la productora de nopalitos de color morado, y 3) en la germinación de semillas de 'CP-Tepemor' se encontraron cuatro clases de plántulas: verdes, moradas, rosas y bicolors; además, las plántulas rosas, aclorofílicas, murieron aproximadamente a los 15 días de la emergencia; los resultados del análisis molecular no mostraron correlación con el agrupamiento de clases que se realizó fenotípicamente. Se seleccionaron plántulas de color morado para continuar con el mejoramiento y obtener variedades productoras de nopalitos morados.

**Palabras Clave:** *Opuntia*, diversidad genética, microsatélites, ADN, huella genética

# **MOLECULAR CHARACTERIZATION OF VARIETIES OF NOPAL (*OPUNTIA* SPP.) WITH MICROSATELLITES**

**MIGUEL ANGEL PACHECO AGUILAR, M. en C.  
COLEGIO DE POSTGRADUADOS, 2017**

## **ABSTRACT**

Mexico is considered a center of origin and diversity of the nopal (*Opuntia* spp.), and of 181 species that has the genus, 76 are distributed in Mexico. In this country the nopales are used since pre-Columbian times as an important source of fruit and vegetables, among others uses; and there is a wide genetic diversity in wild nopales and varieties selected by producers and breeders. In the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, a breeding program of the nopal is under way and it has generated varieties and technology for the production of fruit and nopalitos. Other recent contributions of the program are two outstanding varieties and technology for obtaining high quality seedless fruits, and a variety for the production of purple nopalitos. This research had as objectives: 1) to know the genetic diversity in a group of 41 genotypes including varieties that are widely used by farmers and accessions that are not, but that have a high potential; 2) to obtain the genetic fingerprint of the varieties developed by the Colegio de Postgraduados for producing functional and seedless tunas and of 'CP-Tepemor' that produces purple-colored nopalitos, using microsatellites; and 3) in the progeny of CP-Tepemor continue with the selection of genotypes that produce nopalitos with purple color. DNA extraction was performed with the ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen Kit, 26 microsatellites were amplified by PCR and capillary electrophoresis was performed with a DNA sequencer (Genetic Analyzers ABI® 3130, Applied Biosystems). Phenograms and allelic profiles were carried out with the data obtained. The results are: 1) the genotypes with current and potential importance were differentiated into groups according to their taxonomic

species 2) the genetic imprint of the two high quality seedless tuna-producing varieties was obtained; and 3) seedlings of CP-Tepemor were of four types: green, purple, pink and bicolor; In addition, the pink, aclorophilic, seedlings, died approximately 15 days after the seedling emergence. There was no correlation between the molecular analysis results with the grouping of seedling types that was performed phenotypically. Purple seedlings were selected to continue the breeding towards obtaining varieties for producing purple nopalitos.

**Keywords:** *Opuntia*, genetic diversity, microsatellites, DNA, genetic fingerprint

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Postgraduados y específicamente al Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haberme otorgado todo el financiamiento durante mis estudios.

Al Dr. Manuel Livera Muñoz, por brindarme su apoyo, orientación y conocimientos durante mis estudios, además de brindar los recursos y herramientas requeridas para el desarrollo de la presente tesis.

A mi consejo particular; Dr. Alfredo López Jiménez y MC. Alfonso Muratalla Lúa por sus asesorías y sugerencias durante la investigación.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela, quien amablemente otorgó los recursos tecnológicos para la ejecución del análisis molecular, mediante el uso del laboratorio, así mismo a la laboratorista Laura Carrillo, por su gran apoyo y tiempo.

A mis padres, D. Jaime Pacheco Bautista y Lucila Aguilar Hernández por todo su apoyo, ya que gracias a ellos he logrado realizar una meta más en mi vida y hacerles saber que este logro también es de ellos.

A mi hermana y hermanos por estar a mi lado y ser los mejores hermanos que alguien pueda tener.

A Beatriz por brindarme su amor y su apoyo, durante todo este tiempo y la dicha de ser padre.

A todos mis amigos, principalmente a los homies de Kame house (Fredy, Gregorio, Brian, Enrique, Iván, Eric, Emmanuel y Apolinar), y al Colima (Elías).

Al F.C. Real Genética y todos los amigos y compañeros del COLPOS.

## DEDICATORIA

*Con mucho cariño para la familia "Pacheco Aguilar" por todo su apoyo y comprensión durante toda mi existencia.*

*A mis padres Lucila y Jaime. Gracias por su apoyo en todo momento.*

*A mis abuelitos Q.E.P.D.*

*Adolfina Hernández y Cirilo Aguilar*

*Lucila Bautista.*

*A mis hermanos y amigos*

*A mi familia*

## CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
BIBLIOGRAFÍA	6
<b>CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN UN GRUPO DE GENOTIPOS SOBRESALIENTES DE NOPAL (<i>Opuntia</i> spp.) UTILIZANDO MICROSATÉLITES (SSR)</b>	9
RESUMEN	9
SUMMARY	10
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	25

<b>CAPITULO III. HUELLA GENÉTICA DE VARIEDADES DE NOPAL (<i>Opuntia</i> spp.)</b>	
<b>PRODUCTORAS DE NOPALITOS Y FRUTA</b>	29
RESUMEN	29
SUMMARY	30
INTRODUCCIÓN	31
MATERIALES Y MÉTODOS	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
<b>CAPITULO IV. GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EVALUACIÓN DE LA</b>	
<b>DIVERSIDAD GENÉTICA EN PLÁNTULAS DE CP-TEPEMOR (<i>Opuntia</i></b>	53
<b><i>robusta</i>) UTILIZANDO MICROSATÉLITES</b>	
RESUMEN	53
SUMMARY	54
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES</b>	79

## LISTA DE CUADROS

### CAPITULO II

<b>Cuadro 1.</b>	Variedades y genotipos de <i>Opuntia</i> evaluados con SSR's	15
<b>Cuadro 2.</b>	Microsatélites (SSR's) empleados para la amplificación por PCR.	18
<b>Cuadro 3.</b>	Cuadro comparativo de la temperatura de amplificación, alelos observados y tamaño de los fragmentos obtenidos en este estudio con los de estudios previos	21

### CAPITULO III

<b>Cuadro 1.</b>	Microsatélites (SSR's) empleados para la amplificación por PCR	38
<b>Cuadro 2.</b>	Concentración de ADN y relación de absorbancias 260/280.	40
<b>Cuadro 3.</b>	Cuadro comparativo de la temperatura de amplificación, alelos observados y tamaño de los fragmentos obtenidos en este estudio con los de estudios previos.	42
<b>Cuadro 4.</b>	Matriz de distancias fenéticas calculadas con el coeficiente de Dice generada con los datos de los microsatélites	46

### CAPITULO IV

<b>Cuadro 1.</b>	Microsatélites (SSR's) empleados para la amplificación por PCR.	62
<b>Cuadro 2.</b>	Frecuencias relativas de las clases de plántulas obtenidas de semillas de 'CP-Tepemor'	65
<b>Cuadro 3.</b>	Concentración de ADN y relación de absorbancias 260/280.	68

<b>Cuadro 4.</b>	Índice de similitud de Dice de 16 plántulas y su progenitor 'CP-Tepemor'.	70
------------------	---	----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO II

<b>Figura 1</b>	Electroferograma con Opufic 10. A) 'Amarilla Montesa' (AM-O.m), B) 'Cardona' (Ca-O.s) y C) 'Burrona' (B-O.a)..	20
<b>Figura 2.</b>	Fenograma generado a partir de cálculo de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice.	24

### CAPITULO III

<b>Figura 1.</b>	Electroferogramas con Opufic 16. A: 'CP Azteca', B: 'CP Dorada', C: 'CP-RSE' y D: 'CP-Tepemor'.	33
<b>Figura 2.</b>	Huella genética de 11 variedades obtenida con 22 microsatélites.	44
<b>Figura 3.</b>	Huella genética de cuatro variedades del Colegio de Postgraduados obtenida con 22 microsatélite A) 'CP-RSE', B) 'CP-Tepemor', C) 'CP-Azteca' y D) 'CP-Dorada'.	45
<b>Figura 4.</b>	Fenograma generado a partir de cálculo de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice.	48

### CAPITULO IV

<b>Figura 1.</b>	Dinámica de la emergencia y mortalidad de plántulas de 'CP-	63
------------------	---	----

Tepemor´ por fecha de siembra.

- Figura 2.** Diversidad genética de colores que presentaron las plántulas entre los 8 y 15 días después de la emergencia. 64
- Figura 3.** Marchitamiento y mortalidad de las plántulas albinas. A: plántula normal, B: Plántula albina marchita, C: Plántula albina muerta, 20 días después de la emergencia y D: plántula color morada, a los 20 días. 66
- Figura 4.** Plántulas bicolors obtenidas de la germinación de semillas de ´CP-Tepemor´. 67
- Figura 5.** Cronograma de las diferentes etapas de crecimiento de plántulas normales de ´CP-Tepemor´.. 67
- Figura 6.** Electroferogramas obtenidos con Opufic 15. A: ´CP-Tepemor´, B: plántula verde, C: plántula morada, D: plánula albina y E: plántula bicolor. 69
- Figura 7.** Fenograma generado a partir de cálculo de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice. 71

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN GENERAL

Existe un grupo de plantas fascinante y atractivo caracterizado por presentar areolas, llamado comúnmente “cactus”, que incluye los nopales, las biznagas, órganos, pitayas, etc., que botánicamente están integrados en la familia Cactaceae (Anderson, 2001) y que caracterizan el paisaje de las zonas áridas y semiáridas de México (Alanís y Velazco, 2008). Entre estas plantas destacan los nopales del género *Opuntia* integrado por 189 especies (Anderson, 2001), y a México se le considera como centro de origen de 76 (Guzmán *et al.*, 2003). El nopal se ha utilizado en el país desde hace unos nueve mil años (Chapman *et al.*, 2002); y la historia registra que ha tenido un papel importante en la vida económica, social y religiosa desde tiempos prehispánicos hasta la fecha; por ejemplo, el glifo de la gran Tenochtitlan ostentaba un nopal, y es parte del actual escudo nacional mexicano. El uso de los tallos y frutos como alimento es el uso más común que los antiguos Mexicanos le dieron al nopal, los tallos jóvenes se consumen hasta la fecha como verdura y se conocen comúnmente como nopalitos, y los frutos, llamados tunas, son jugosos y muy apreciados. Otros usos fueron el medicinal y religioso en ritos y ceremonias. En la actualidad existen numerosos usos del nopal, como cercos vivos, fijación de suelo para prevenir la erosión, forraje, fuente de mucilago, gomas y pectinas y el uso ornamental; en el nopal también se desarrolla la “grana cochinilla” que es fuente del colorante denominado carmín (Alanís y Velazco, 2008).

Los españoles introdujeron el nopal a Europa y posteriormente se extendió a todo el mundo. Ahora se cultiva en Argelia, Marruecos, Túnez, Grecia, Israel, India, Filipinas, China, Australia, Sudáfrica, Brasil, Argentina, Colombia, Italia, Chile, Estados Unidos, Sudáfrica,

Colombia y Perú, entre otros (Cruz y Paredes, 2010). En varios países los cladodios no se consumen, pero la fruta es muy popular (Muñoz *et al.*, 1995).

En México se encuentra la mayor diversidad genética a nivel inter e intraespecífico ya que es considerado como el centro de origen y dispersión del género (Bravo, 1978).

La tuna es el sexto fruto en las estadísticas nacionales (SIAP, 2016), después de la naranja, aguacate, plátano, mango y manzana; la producción total de tuna es de 423,860 t obtenidas en 47,628 ha distribuidas en 17 estados de la República Mexicana, y en ocho se concentra 87% de la superficie y el 96% de la producción (SIAP, 2016), que se encuentran en tres regiones: Región Centro-Norte, donde se encuentran los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Jalisco y Aguascalientes; Región Centro, con el Edo. de México e Hidalgo; y la Región Sur, con Puebla (Flores, 1995; Gallegos *et al.*, 2009). La producción de tuna se basa principalmente en siete variedades: 'Reyna', 'Cristalina' y 'Burróna', de tunas blancas; 'Roja Lisa' y 'Roja San Martín' y las amarillo-anaranjadas 'Naranjona o Pico Chulo' y 'Amarilla Montesa' (Gallegos y Mondragón, 2011). El consumo de tuna *per cápita* se ha mantenido estable en los últimos años, en 3.8 kg (SIAP, 2016).

Los nopalitos se producen en 12,630 ha, (SIAP, 2016) distribuidas en 25 estados de la República Mexicana; sin embargo, solo en dos, Morelos y Estado de México, y en los alrededores de la Ciudad de México, en Milpa Alta, se concentra más del 50% de la producción, que es de 670,805 t (SIAP, 2016). Existen dos variedades que son las más cultivadas, 'Milpa Alta' y 'Atlixco', la segunda cultivada en menor proporción. Sin embargo, existen otras cultivadas localmente con alto potencial. En contraste con el consumo de tuna, el consumo *per cápita* de nopalitos se ha duplicado en los últimos años y es de 5.4 kg (SIAP, 2016).

Existe una gran diversidad en las plantas de *Opuntia*, ya que son el resultado del proceso evolutivo en interacción continúa con el ambiente, lo que conlleva a un gran reto para su manejo eficiente y para su conservación y aprovechamiento. En la diversidad vegetal conservada *ex situ e in situ* se encuentran genotipos con caracteres de alto valor agronómico asociados a caracteres indeseables o de poco valor, lo que puede dificultar el mejoramiento genético. El conocimiento, conservación y utilización de los recursos genéticos de *Opuntia* es de importancia estratégica para el país, ya que son plantas adaptadas a condiciones climáticas desfavorables, con sequía y altas temperaturas, y es prioritario desarrollar nuevas variedades y productos con aceptación en el mercado. La caracterización del germoplasma del nopal y el estudio de su diversidad genética se ha hecho con base en caracteres morfológicos, principalmente.

Sin embargo, en los estudios de la diversidad genética hay avances significativos que iniciaron con el uso de la electroforesis, una de las primeras técnicas empleadas en la diferenciación de genotipos en los años 50 que separa moléculas por su movilidad a través de un solvente en un campo eléctrico. Con los avances de la biología molecular se han incorporado nuevas técnicas, nuevos marcadores de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar diferencias y cambios en los genotipos de los individuos (Becerra y Paredes, 2000).

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs); (Litt y Luty, 1989) son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (TT)<sub>n</sub>, dinucleótidos (AT)<sub>n</sub>, o tetranucleótidos (AAGG)<sub>n</sub>. Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es una técnica que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Gupta *et al.*, 1996).

Los microsatélites más comunes son de tipo nuclear y se emplean principalmente en estudios de variación genética intra e interespecífica (Edwards *et al.*, 1991) y en análisis de linajes, principalmente. Pero también existen microsatélites en algunos organelos como el cloroplasto (Vendramín *et al.*, 1996;) y la mitocondria (Soranzo *et al.*, 1998) y estos se utilizan principalmente en estudios evolutivos y en análisis de paternidad (McCracken *et al.*, 1999).

Los microsatélites tienen ventajas sobre otros marcadores moleculares como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, y estas ventajas se deben principalmente a que tienen mayor grado de polimorfismo; su segregación es de manera mendeliana, son codominantes y son selectivamente neutros (Vendramin *et al.*, 1996). Sin embargo, es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para contar con primers específicos que amplifiquen la región repetitiva (el microsatélite) (Golstein *et al.*, 1996). Los estudios de la diversidad genética en *Opuntia* con microsatélites son relativamente recientes y entre ellos destaca la investigación de Samah *et al.* (2015) quienes emplearon 88 colectas pertenecientes a 17 especies de *Opuntia* y cuyos resultados revelaron la gran diversidad genética existente en México y los errores de clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos, que son altamente influenciados por el ambiente.

### **JUSTIFICACIÓN**

El aprovechamiento de los recursos genéticos de *Opuntia* en el mejoramiento genético del nopalen México es incipiente y los principales problemas para incrementar la producción son: frutos con numerosas semillas que demeritan su calidad, la falta de mercado nacional e internacional para la fruta, la estacionalidad de la producción, la escasez de personal científico interesado en el tema y los pocos recursos asignados a la investigación, entre

otras. Como se ha mencionado, en el caso del nopalito la producción se basa principalmente en el uso de dos variedades, lo que representa un riesgo de posible vulnerabilidad genética ante la amenaza de factores bióticos y abióticos que les puedan afectar negativamente, riesgo también presente en las variedades productoras de fruta, ya que todas son clones.

El Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, tiene en marcha un programa de mejoramiento genético del nopal que inició en los años sesentas y que ha generado variedades y tecnología para la producción de fruta y verdura. Este Posgrado cuenta con un acervo genético que incluye las variedades más utilizadas para la producción de tuna y nopalitos y genotipos con alto potencial para obtener productos de calidad; dicho grupo presenta una diversidad genética que debe ser valorada. Otras contribuciones recientes del programa son dos variedades sobresalientes y tecnología para la obtención de frutos de alta calidad sin semillas, y una variedad para la producción de nopalitos de color morado (Livera, 2016, comunicación personal).

### **HIPOTESIS**

Utilizando microsatélites (SSRs) es posible determinar la diversidad genética en un grupo de 41 genotipos de nopal y caracterizarlos molecularmente.

### **OBJETIVOS**

Esta investigación tuvo como objetivos:

- 1) Conocer la diversidad genética utilizando microsatélites en un grupo de 41 genotipos, incluyendo variedades que son ampliamente utilizadas por los agricultores y colectas que tienen un alto potencial.

2) Obtener la huella genética de variedades desarrolladas por el Colegio de Postgraduados utilizadas para producir tunas de alta calidad y sin semillas y de la variedad 'CP-Tepemor', que produce nopalitos color morado, utilizando microsátélites.

3) Seleccionar plántulas con color morado en la progenie de 'CP-Tepemor', para continuar el proceso de mejoramiento genético.

Cada uno se presenta como un capítulo de esta tesis.

## BIBLIOGRAFÍA

**Alanís F. G. J. y C. G. Velazco M. (2008).** Importancia de las cactáceas como recurso natural en el noroeste de México. *Ciencia UANL*. 1:5-11p.

**Anderson E. F. (2001).** The cactus family. Timber Press. Portland, Oregon, USA.

**Becerra V. V. y M. Paredes. C. (2000).** Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*. 60(3).

**Bravo-Hollis. H. (1978).** Las cactáceas de México. Vol. 1. UNAM. México, D. F.

**Cruz-Hernandez A. and O. Paredes L. (2009).** Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 12:110 126.

**Chapman B., C. Mondragon J., R. Bunch and H. Patterson A. (2002).** Breeding and biotechnology, pp. 255-271. In: *Cacti Biology and Uses*. Nobel P. S. (ed). Univ. of California Press. Berkeley, USA.

**Edwards A., A. Civetello, H. A. Hammond and C. T. Caskey (1991).** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal Human Genetics* 49:746-756.

- Flores V. C. A., J. M. de Luna E. y P. P. Ramírez M. (1995).** Mercado Mundial de la Tuna. ASERCA-UACH-CIESTAAM. Chapingo, México. 173 p.
- Gallegos V. C., C. Mondragón J., and J. A. Reyes A. (2009).** An update on the evolution of the cactus pear industry in Mexico. *Acta Horticulturae*. 811:69-76.
- Gallegos V. C., C. Mondragón J. (2011).** Cultivares Selectos de Tuna, de México al mundo. Ed. Chapingo. México.159p.
- Golstein D. B., L. A. Zhivotovsky, K. Nayar, A. Ruíz L., L. L. Cavalli S. and W. M. W. Feltman (1996).** Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 13:1213-1218.
- Gupta M., Y. S. Chyi, J. Romero S., and J. L. Own (1994).** Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical. Applied Genetics* 89:998-1006.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila (2003).** Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 315 p.
- Litt M. and A. Luty J. (1989).** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle gene. *American Journal of Human Genetics* 44:397-401.
- McCracken G. F., G. M. Burghard and S. E. Houst (1999).** Microsatellites marker and multiple paternity in the garter snake *Thamnophis sirtalis*. *Molecular Ecology* 8:1475-1479.

- Muñoz de C. M., A. Chávez, V. Valles and J. A. Roldan (1995).** The nopal: a plant of manifold qualities. *Plant Foods for Human Nutrition*. 77: 109–134.
- Samah S., C. V. de Teodoro P., M. A. Serrato C. and E. Valadez M. (2015).** Genetic diversity, genotype discrimination, and population structure of mexican *Opuntia* sp., determined by SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*. 34: 146-159.
- Soranzo N., J. Porvan and W. Powell (1999).** An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42:158-161
- Vendramin G. G., L. Lelli, P. Rossi and M. Morgante (1996).** A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5:595-598.

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN UN GRUPO DE GENOTIPOS SOBRESALIENTES DE NOPAL (*Opuntia* spp.) UTILIZANDO MICROSATÉLITES (SSR)

### MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ESTIMATION OF GENETIC DIVERSITY IN A GROUP OF OUTSTANDING NOPAL GENOTYPES (*Opuntia* spp) USING MICROSATELLITES (SSR)

#### RESUMEN

El Programa de Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, desde la década de los años sesenta tiene en marcha un programa de mejoramiento genético del nopal que ha generado variedades y tecnología para la producción de fruta y nopalitos. Otras contribuciones recientes del programa son dos variedades y tecnología para la obtención de frutos de alta calidad sin semilla, y una variedad para la producción de nopalitos de color morado. El objetivo de este trabajo fue conocer la diversidad genética en parte del acervo genético actual del programa, usando marcadores moleculares tipo microsatélites. Se estudiaron 41 genotipos; la extracción de ADN se hizo utilizando el Kit ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen; los microsatélites se amplificaron por PCR y se realizó una electroforesis capilar con un secuenciador de ADN (Genetic Analyzers ABI® 3130, Applied Biosystems). Con los datos se construyó un fenograma donde se pudo observar que, la mayoría de los genotipos estudiados fueron agrupados de acuerdo a la especie en la que fueron previamente clasificados. Los resultados también mostraron un alto polimorfismo ya que se encontraron hasta 20 alelos por microsatélite.

**Palabras clave:** *Opuntia*, ADN, microsatélites, polimorfismo, PCR

## SUMMARY

The Genetics Program of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, since the sixties has started a program of genetic improvement of the nopal that has generated varieties and technology for the production of fruit and nopalitos. Other recent contributions of the program are two varieties and technology for obtaining high quality seedless fruits, and a variety for the production of purple nopalitos. The objective of this work was to know the genetic diversity in part of the current gene pool of the program, using molecular markers of the microsatellite type. Forty one genotypes were studied; DNA extraction was done using the ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen; The microsatellites were amplified by PCR and capillary electrophoresis was performed with a DNA sequencer (Genetic Analyzers ABI 3130, Applied Biosystems). With the data a phenogram was constructed where it was observed that the majority of the genotypes studied were grouped according to the species in which they were previously classified. The results also showed a high polymorphism since up to 20 alleles per microsatellite were found.

**Key words:** *Opuntia*, DNA, microsatellites, polymorphism, PCR.

## INTRODUCCIÓN

México es un país mega diverso que tiene 30,000 especies vegetales, aproximadamente, con gran riqueza cultural que ha contribuido al conocimiento, conservación, mejoramiento y utilización de numerosos recursos vegetales. (Cuevas, 2002; Gallegos *et al.* 2006).

La familia Cactaceae está integrada por alrededor de 65 géneros y 2000 especies, de origen americano (Bravo y Scheinvar, 1999) distribuidas mayormente en climas áridos y semiáridos. El género *Opuntia* pertenece a la subfamilia Opuntioideae y actualmente se encuentra distribuido a nivel mundial. En México se encuentra la mayor diversidad genética siendo reconocido como el centro de origen y diversidad de este género (Bravo 1978; García *et al.*, 2009).

En México, el nopal se ha utilizado desde hace 9,000 años, desempeñado un papel crucial en el desarrollo de las culturas prehispánicas por el aporte de alimento y por otros usos, incluyendo el religioso (Granados y Castañeda, 1991). Actualmente hay interés en aprovecharlos en mayor grado considerando sus características que le permiten adaptarse a condiciones climáticas limitantes para la producción, sus propiedades como alimento, su importancia ecológica (conservación de suelos, reforestación, alimento de fauna silvestre) (Bravo y Scheinvar, 1995; Felker, 2001; González *et al.*, 2001; Luna *et al.*, 2007), su potencial para conservar y mejorar la salud (Anoop *et al.*, 2012) y obtener productos derivados.

La producción nacional de tuna es de 423,860 t obtenidas en 47,628 ha y la producción de nopalitas es de 670,805 t en 12,630 ha (SIAP, 2016). La producción de tuna en su mayor parte se hace con ocho variedades o cultivares: 'Reyna', 'Cristalina', 'Burróna', 'Esmeralda', 'Gavia', 'Villanueva', 'Rojo Pelón' y 'Rojo San Martín'; y cabe señalar que la

variedad 'Reyna' se utiliza en la mitad de la superficie. Sin embargo, existe una gran diversidad de variedades y genotipos de importancia regional cultivadas en los traspatios y también existe la recolección de frutos en poblaciones silvestres; por ejemplo, 'Cardona'; variedad que se sitúa en el centro-norte del país, y que por su excelente sabor tiene alta demanda y es procesada para obtener queso de tuna (Gallegos y Mondragón, 2011). En la producción comercial de nopalito también se hace un uso restringido de la diversidad genética; principalmente se utiliza la variedad 'Milpa Alta' y en menor grado la variedad 'Atlixco'. Existen otros cultivares y genotipos de interés regional, como la 'Moradilla' y el 'Tapon Macho'; el segundo tiene cladodios de forma elíptica y un color verde cenizo, característico de *Opuntia robusta*, sin ondulaciones en el margen, y que generalmente no produce frutos pero presenta una intensa floración al inicio de la primavera. Sus pencas tiernas se aprovechan mediante la recolección en áreas cercanas a la ciudad de San Luis Potosí, donde es procesada en salmuera y escabeche (Gallegos y Mondragón, 2011).

El uso restringido de la diversidad genética en la producción comercial de tuna y nopalito se debe a diferentes razones; para el primer caso se pueden mencionar: la falta de mercado nacional e internacional, la estacionalidad de la producción, la gran cantidad de semillas relativamente grandes en el fruto y la corta vida de anaquel de éste (Livera, 2016, comunicación personal). En cuanto a la producción de nopalito, Livera (2016, comunicación personal) considera una necesidad la oferta de nuevas variedades con características novedosas, como son nopalitos sin de espinas y con color diferente al verde, con propiedades funcionales y nutraceuticas. Otros investigadores mencionan que el uso restringido de la diversidad se debe a que no han existido programas de mejoramiento de largo plazo debido, entre otras razones, a que son plantas perennes y a que hay pocos

investigadores que dediquen su atención a los nopales. (Pimienta, 1990; Gallegos y Mondragón, 2011).

En el Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, se lleva a cabo un proyecto de mejoramiento genético del nopal para la producción de fruta y nopalitos desde los años sesenta, y ha logrado la obtención de variedades de nopal para la producción de fruta y verdura, y recientemente ha seleccionado el cultivar 'CP-Tepemor' que produce nopalitos de color morado, (resultados no publicados, Dr. Manuel Livera Muñoz). En este mismo proyecto se han seleccionado variedades apropiadas para la producción de tuna de alta calidad, con propiedades funcionales y sin semilla, induciendo partenocarpia (Livera, 2016, comunicación personal).

Este proyecto de mejoramiento genético cuenta con un acervo genético de alto valor y surge la necesidad de estimar cuanta variabilidad genética se tiene utilizando herramientas moleculares.

Existen estudios en nopal donde emplearon marcadores moleculares y los más utilizados han sido RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism) e ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) como los reportados por Mondragón (2003), Luna *et al.*, (2007), García (2006), y Pacheco (2013), por mencionar solo algunos. En los últimos años se han utilizado microsatélites SSR (Simple Sequence Repeat). Los SSR han sido empleados en estudios de diversidad genética (Caruso *et al.*, 2010; Samah *et al.*, 2016) y caracterización de cultivares y especies (Helsen *et al.*, 2007, Erre *et al.*, 2011; Chessa *et al.*, 2013

Los objetivos del presente trabajo fueron 1) estimar la diversidad genética en un grupo de variedades y colectas de nopal que tiene el proyecto de mejoramiento genético de nopal del Posgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados utilizando 26 microsatélites (SSR's).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Las variedades y genotipos utilizados en el presente trabajo se muestran en el Cuadro 1, con las claves a utilizar y la especie que pertenecen.

**Cuadro 1. Variedades y genotipos de *Opuntia* evaluados con SSR´s.**

No.	Clave	Genotipos	Especie
1	Ch-O.a	Chapeada	<i>O. albicarpa</i>
2	AM-O.m	Amarilla Montesa	<i>O. Megacantha</i>
3	ChT-O.s	Charola Tardía	<i>O. streptacantha var aguirrana</i>
4	A-O.s	Apastillada	<i>O. streptacantha</i>
5	Te-	Teco	<i>Opuntia</i> sp.
6	X-O.j	Xoconostle	<i>O. Jonostle</i>
7	J-	Jarilla (Rojo Jarilla)	<i>Opuntia</i> sp-
8	Cr-O.a	Cristalina	<i>O. albicarpa</i>
9	ChT*C-O.s	Charola-Cardona (Hibrido)	<i>O. streptacanyha</i>
10	R-	Roja	<i>Opuntia</i> sp.
11	B-O.a	Burrona	<i>O. albicarpa</i>
12	R2-	Roja chapeada	<i>Opuntia</i> sp.
13	N-O.m	Naranjona	<i>O. Meganatha</i>
14	RE-	Roja Enci	<i>Opuntia</i> sp.
15	T-O.r	Tapona	<i>O. robusta var robusta</i>
16	At-O.fi	Atlixco	<i>O. ficus-indica</i>
17	ST-	Sangre de toro	<i>Opuntia</i> sp.
18	TM-O.r	Tapón Macho	<i>O. robusta var. Robusta</i>
19	Cc-O.c	Cacalote	<i>O. cochinera</i>
20	Ap-	Apalillo	<i>Opuntia</i> sp.
21	Ca-O.s	Cardona	<i>O. Streptacanta</i>
22	PC-O.m	Pico Chulo	<i>O. Meganatha</i>
23	Or-O.r	O. Robusta G	<i>O. robusta</i>
24	TSMP-O.r	Tapona SMP	<i>O. robusta</i>
25	MSJP-	Morada SJP	<i>Opuntia</i> sp.
26	XO-O.j	Xoconostle Otumba	<i>O. matudae</i>
27	CPA-O.fi	CP-Azteca	<i>O. ficus-inica</i>
28	CPD-O.fi	CP-Dorada	<i>O. ficus-inica</i>
29	CPNP-O.r	CP-RSE	<i>O. robusta</i>
30	MA-O.fi	Milpa Alta	<i>O. ficus-inica</i>
31	Ay-O.r	Ayapango	<i>O. robusta</i>
32	TeMo-O.r	TepeMor	<i>O. robusta</i>
33	Tg-O.r	Tenango	<i>O. robusta</i>
34	Tg2-O.r	Tenango 2	<i>O. robusta</i>
35	RP-O.fi	Rojo Pelón.	<i>O. ficus-inica</i>
36	Ry-O.a	Reyna	<i>O. Albicarpa</i>
37	Cp5-O.fi	Copena 5	<i>O. albicarpa</i>
38	CpV1-O.fi	Copena V1	<i>O. ficus-inica</i>
39	OprT-O.r	Opr Tepe	<i>O. robusta</i>
40	XSJP-O.m	Xoco SJP	<i>O. matudae</i>
41	XRSJP-	Xoco Rojo SJP	<i>Opuntia</i> sp

Para la evaluación de la variabilidad genética de los genotipos se recolectaron cladodios recién emergidos, con un tamaño máximo de tres centímetros, de los cuales se tomaron 200 mg de tejido para extraerles el ADN utilizando el Kit comercial ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen, con pequeñas adecuaciones que consistieron en agregar 800 µL de Lisis y 100 µL de reactivo A antes de macerar y 100 µL de lisis y 100 µL de reactivo A después de haber macerado, se utilizó el robot de extracción (King Fisher Flex®, ThermoScientific). La cuantificación del ADN se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000, ThermoScientific, de ultra-bajo volumen, con lecturas de absorbancia en 260 y 280 nm.

Se utilizaron 26 iniciadores en la amplificación por PCR (Mullis, *et al.*, 1990), seleccionados con base en los resultados de Helsen *et al.* (2007), Caruso *et al.*, (2010), Erre *et al.*, (2011), Chessa *et al.*, (2013) y Samah *et al.* (2016) y etiquetados con fluorescencia 6-FAM, ROX o HEX en el extremo 5', como se muestra en el Cuadro 2, para su detección en el secuenciador de ADN.

La amplificación por PCR se realizó con un Termociclador BIORAD modelo C1000 Thermal Cycler de manera multiple por lo que fue necesario agrupar los iniciadores (Cuadro 2) principalmente por temperatura, tamaño de fragmentos y la fluorescencia con la que fueron etiquetados, y consistió en 25 µL de volumen final que contenían 20 ng de ADN genómico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X Taq Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 1 U de Taq polimerasa, 10 pMol de cada primer. El protocolo de amplificación fue de una desnaturalización inicial de 12 min a 95 °C, 35 ciclos que consistieron en: desnaturalización 60 s a 95 °C, alineamiento 60 s a 52-58.8 °C (Cuadro 2), extensión de 90 s a 72 °C; por último una extensión final de 12 min a 72 °C.

Una vez realizada la PCR, los productos fueron analizados por electroforesis capilar en un secuenciador de ADN (Genetic Analyzers ABI® 3130, Applied Biosystems), utilizando LIZ-

500 como marcador interno de peso molecular. La lectura de los electroferogramas se realizó con el software GeneMapper® V 4.0.

Los resultados obtenidos con GeneMapper® V 4.0 fueron procesados con el paquete estadístico Polysat, utilizado para el análisis de resultados obtenidos de especies poliploides y que funciona bajo el ambiente R (Clark y Jasieniuk, 2011); se generó una matriz de presencia y ausencia para posteriormente realizar un análisis de las frecuencias alélicas con el programa InfoGen/E V 2014 y comparar las similitudes o diferencias en cuanto al patrón expresado, generándose un fenograma con el coeficiente de Dice ( $S_D$ ) (Dice, 1945) y Nei-Li (1979).

**Cuadro 2. Microsatélites (SSR's) empleados para la amplificación por PCR.**

Grupo	Primer/Locus	T°C	Tamaño de fragmento (pb)	Iniciador hacia adelante//Iniciador en reversa
1	Opufic04	58.8	196-218	[ROX]TGCAGTCAGGTTTCTCATTGTC//GCCCAACTCTTACCCTCTCC
	Opufic17	58.8	158-181	[6-FAM]ATGGATCGTCTTCGTCCCTG//GATGTCACCCCATTCCATTCC
	Opuntia1	58.8	100-126	[HEX]CCATCTACTTCCCACCTTGC//CTCCTGTGTTTCTCTGTGCTC
	Opuntia5	58.8	352-367	[HEX]TATGCACAAAGCACCATGC//CCAACCATACCAACTGTA CTGAC
2	Opufic13	56.7	138-190	[HEX]GGGCTTTCAACGATGCTG//AAGACATAGGTTGGAGACTCAATTCC
	Opuntia9	56.7	147-185	[ROX]CTAGGCTTCATCCCACATTAGG//TCCAAATTCACCTCCTCTGC
	Opuntia13	56.7	247-301	[ROX]CCAAATACCCAGCCCATAC//CGAGAACCTAACTCCGATG
	Opuntia16	56.7	322-350	[6-FAM]GTCAATCCCGAGCAATTTAGG//CTCATTAGTGAGGCCCAACG
3	Opufic03	56.7	134-162	[HEX]GCTTTGAAATGTCTTGTGTGAATG//AGTCCTGGGAATCCTCAACC
	Opuntia8	56.7	136-178	[ROX]ACCGCCATCACCAGCTATC//CTCACCCACAATTCCAAACC
	Opuntia10	56.7	191-247	[6-FAM]ACCAACATCAAACCTTCAATACC//CATGCTTCATCTTGTTCAATTGG
	Opuntia15	56.7	343-357	[6-FAM]GCGGTGGAAGCAGTTAGG//TCAGTCGATCATACCCAAGG
4	Opufic14	56.0	162-262	[ROX]AATTGACCTCTTCACGTTATGC//GAGAAAGTGAGGCAGACAACG
	Opuntia3	56.0	317-344	[ROX]GTGAGTGCCAGATGAAACT//TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG
	Opuntia11	56.0	110-138	[6-FAM]CCTACACCTGCTGCCAATC//CGAGACAAACATCAGAGGAG
5	Opufic10	55.5	213-250	[6-FAM]GCTTCCTTCAATAGCATGACC//TGAGGCTTTACATGGCACAC
	Opuntia12	55.5	226-294	[HEX]TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC//GGTATCTTGTTATTTCGTTCCG
6	Opufic01	56.2	147-178	[HEX]TGGGTGAGACAATATAGTAGACCAAG//CTGCCGTGAAATCTGAATGG
	Opufic16	56.2	110-153	[6-FAM]TCCCATGCTTCAGTTTTGTTC//GCCGGAATTCGTTATCAGTG
7	Opufic09	56.2	182-236	[ROX]GGCAATACCCTGAGTTGAGC//CCTGAGACTACAGCGTGAGGA
	Opufic15	56.2	182-213	[HEX]TTAAACCTGCACACCATTCCG//GTGTGAGGCGAGGTTGCTC
	Opuntia21	56.2	75-144	[6-FAM]AAAGGGAAGACCTTGCTCTC//TCTATTCTCAGCCCTCCTCTC
8	Opuntia 2	55.2	211-258	[6-FAM]CACATACGCAAATACATGG// GCTTCATTTTCCAGGTTACT
	Opuntia 6	55.2	127-152	[6-FAM]ATCTCATTGTATCATCTATTTCTG//AGCACAAAGACACTTCATCG
9	Opuntia 4	53.5	105-152	[ROX]GATGATTCCGCCATTACC// CGTCGATCTGACTCACACC
	Opuntia 14	53.5	206-258	[6-FAM]TCAGGATTCAAGAAGATTTGC//CGATTCAATTGATGATGGGC

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ADN extraído con el Kit comercial tuvo un rendimiento que osciló entre 90 y 610 ng•μL<sup>-1</sup>, y la relación de las absorbancias DO<sub>260/280</sub> vario de 1.71 a 2.07, resultados que indican cantidad, calidad y pureza del ADN apropiados para los objetivos de la investigación.

La calidad y pureza del ADN se corroboró por medio de PCR y electroforesis capilar. En la Figura 1 se presenta como ejemplo los resultados obtenidos con el iniciador Opufic 10 en tres genotipos.

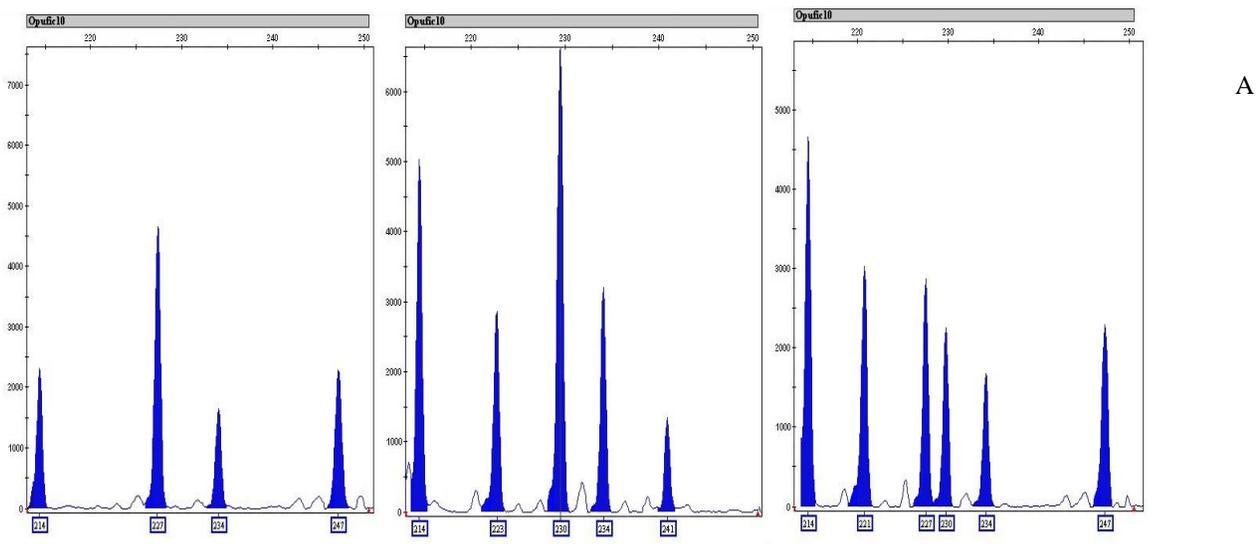


Figura 1. Electroferograma con Opufic 10. A) 'Amarilla Montesa' (AM-O.m), B) 'Cardona' (Ca-O.s) y C) 'Burróna' (B-O.a).

El Cuadro 3 muestra los 26 microsatélites utilizados, de los cuales se descartaron cuatro debido a que no produjeron amplificación o en caso de haberla no se observaron perfiles definidos, es decir presentaban picos que no fue posible su lectura (Caruso *et al.* 2010, Samah *et al.* 2015).

En el Cuadro 3 se comparan la temperatura de amplificación, alelos observados y tamaño de los fragmentos obtenidos en este estudio con los de estudios previos; los rangos de las amplificaciones que se obtuvieron en su mayoría fueron consistentes con lo encontrado por Helsen *et al.* (2007) y Erre *et al.* (2011), excepto para los marcados con \*, donde se modificó el rango. Otros trabajos como el de Chessa *et al.* (2013) han obtenido resultados que no fueron consistentes con los de Helsen *et al.* (2007) y Erre *et al.* (2011) porque mostraron cambios en los rangos indicados por los descriptores.

Una posible razón de la modificación en los rangos es la base genética estudiada o en la que fueron desarrollados los microsatélites; por ejemplo: Helsen *et al.* (2007) desarrollaron 16 SSR's para dos variedades de *O. echios* de las islas Galápagos, y Chessa *et al.* (2013) utilizaron 29 variedades de Italia y Argentina de diferentes especies. Aunque existen cambios en los rangos estos andan alrededor de los descritos por los autores originales, incluso en este trabajo. Otra de las posibles razones es la heterosigocidad parcial que presentan las especies debido a los niveles de ploidia que oscila de dos a ocho (Chessa *et al.*, 2013).

Los resultados del análisis fenético se presentan en la Figura 2 donde se puede observar las similitudes o diferencias entre los genotipos.

De los diez genotipos de *O. robusta*, ocho quedaron integrados en el mismo grupo, no obstante que presentan grandes diferencias morfológicas en el tamaño de los cladodios, el número y tamaño de espinas, entre otras. También se observa que 'Tapon Macho' (TM-O.r) y 'Opuntia robusta G' (Or- O.r) son el mismo clon.

**Cuadro 3. Cuadro comparativo de la temperatura de amplificación, alelos observados y tamaño de los fragmentos obtenidos en este estudio con los de estudios previos.**

No.	Nombre Primer	En este trabajo			Helnsen <i>et al.</i>			Erre <i>et al.</i>			Caruso <i>et al.</i>		
		T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb
1	Opufic 01	56.2	11	147-178				56	11	147-178			
2	Opufic 03	56.7	5	143-162				56	6	143-162			
3	Opufic 04	58.8	6	196-218				56	14	196-218			
4	Opufic 09	56.2	14	182-237*				56	16	182-236			
5	Opufic 10	55.5	6	213-250				56	16	213-250			
6	Opufic 13	56.7	11	138-190				56	19	138-190			
7	Opufic 14	56	20	162-262				56	22	162-262			
8	Opufic 15	56.2	12	182-213				56	13	182-213			
9	Opufic 16	56.2	17	108-153*				56	16	110-153			
10	Opufic 17	58.8	8	158-181				56	14	158-181			
11	Opuntia 1	58.8	8	100-126	61.5	17	100-126						
12	Opuntia 2				55.2	35	211-258						
13	Opuntia 3	56	6	302-344*	59	15	317-344				53.0 - 55.0	7	
14	Opuntia 4				53.5	32	105-152						
15	Opuntia 5	58.8	2	352-367	61.5	6	352-367				53.0 - 55.0	11	
16	Opuntia 6				55.2	15	127-152						
17	Opuntia 8	56.7	12	100-178*	57	34	136-178						
18	Opuntia 9	56.7	11	100-185	59.3	28	147-185				53.0 - 55.0	22	
19	Opuntia 10	56.7	7	155-247*	59	24	191-247						
20	Opuntia 11	56	7	110-138	53	17	110-138				53.0 - 55.0	9	
21	Opuntia 12	55.5	16	226-294	57	53	226-294				53.0 - 55.0	33	
22	Opuntia 13	56.7	6	247-301	53	37	247-301				53.0 - 55.0	16	
23	Opuntia 14				53.5	44	206-258						
24	Opuntia 15	56.7	2	320-357*	53	10	343-357						
25	Opuntia 16	56.7	2	322-350	59.3	17	322-350						
26	Opuntia 21	56.2	16	75-144	59	42	75-144						

T °C temperatura de amplificación; All Obs Alelos observados; Rango. Rango de los fragmentos en pares de base.

Continuación cuadro 3.

No.	Nombre Primer	Nieddu <i>et al.</i>					Samah <i>et al.</i>			
		Helnsen <i>et al.</i>			Erre <i>et al.</i>		T °C	All Obs	Rango pb	
		T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb
1	Opufic 01				56	19	148-184	68	7	
2	Opufic 03				56	14	134-163	67	7	
3	Opufic 04				56	17	196-222	68	11	
4	Opufic 09							67	23	
5	Opufic 10							66	18	
6	Opufic 13				56	31	136-190			
7	Opufic 14				56	22	143-282			
8	Opufic 15							65	12	
9	Opufic 16							65	12	
10	Opufic 17							66	9	
11	Opuntia 1									
12	Opuntia 2	56	9	201-217						
13	Opuntia 3									
14	Opuntia 4	56	14	98-124						
15	Opuntia 5									
16	Opuntia 6							65	7	
17	Opuntia 8	56	19	102-137						
18	Opuntia 9	56	27	146-173						
19	Opuntia 10	56	8	159-191						
20	Opuntia 11							64	14	
21	Opuntia 12	56	21	226-272						
22	Opuntia 13	56	19	238-262				65	13	
23	Opuntia 14									
24	Opuntia 15									
25	Opuntia 16									
26	Opuntia 21	56	28	93-166						

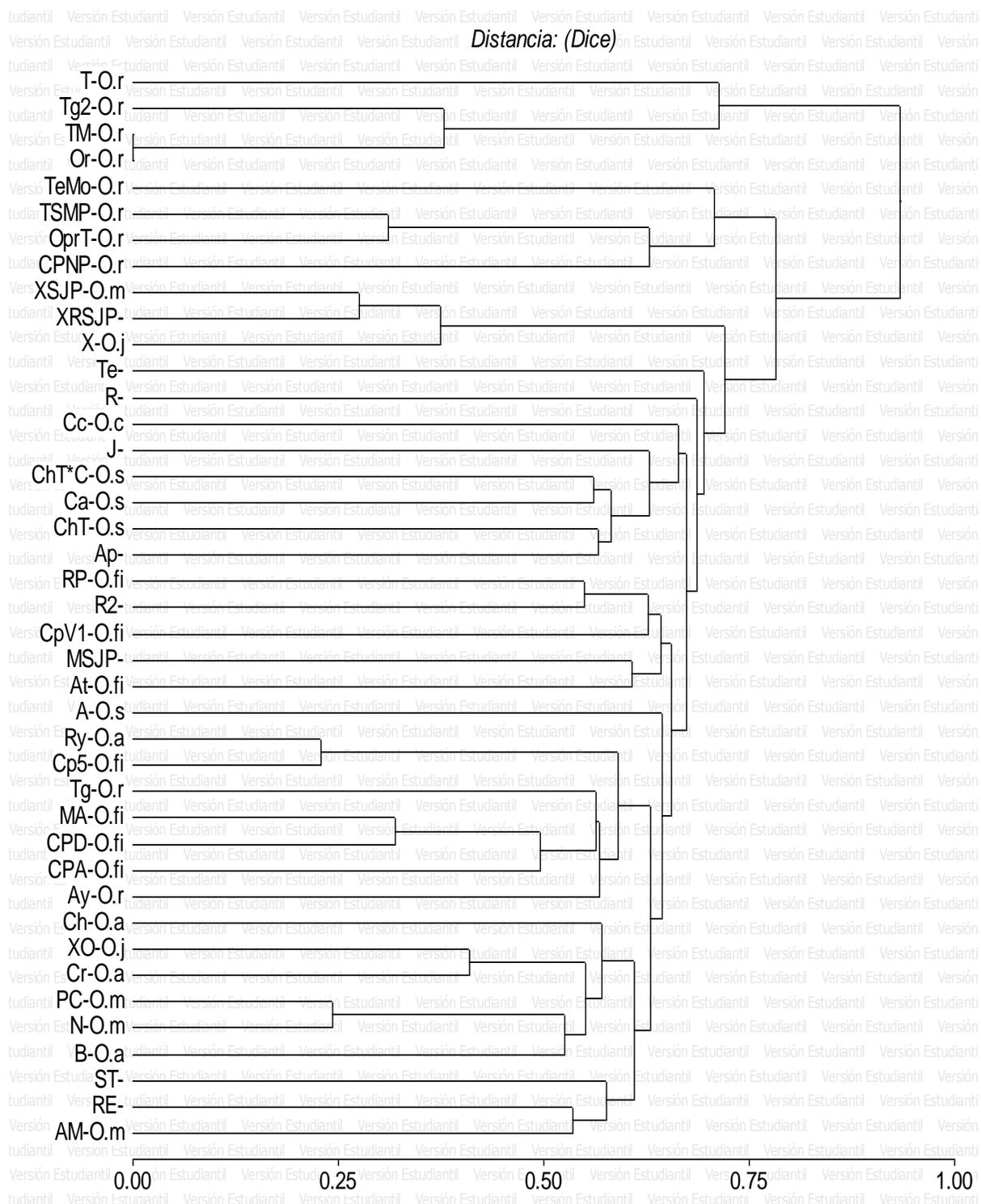
T °C temperatura de amplificación; All -Obs Alelos observados; Rango. Rango de los fragmentos en pares de base.

Las características de las espinas han sido importantes para la clasificación taxonómica con base en caracteres morfológicos (Britton y Rose, 1963., Scheinvar, 1995). *O. robusta*, en lo general, se caracteriza por tener espinas abundantes y de gran tamaño. Sin embargo, el genotipo 'CP-RSE' (CPNP-O.r), que pertenece a *O. robusta* por tener las características de flor, fruto y tallo de la especie, se distingue porque no presenta espinas.

Otros dos genotipos de *O. robusta*, 'Tenango' (Tg-Or) y 'Ayapango' (Ay-O-r), quedaron fuera del grupo principal conformado por ocho genotipos de esta especie.

Los resultados de esta investigación muestran que existe una discrepancia entre la clasificación taxonómica morfológica y la molecular, discrepancia que también ha sido señalada por Samah *et al.* (2015). Los resultados obtenidos con los genotipos y variedades de *O. ficus-indica*, que es la especie más cultivada y que se caracteriza por tener pocas espinas, tampoco se agruparon en un grupo, concordando que no existe una relación directa de la clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos como la presencia o ausencia de espinas con la clasificación molecular (Reyes *et al.*, 2005; Caruso *et al.*, 2010).

La falta de correlación entre la clasificación taxonómica morfológica y la molecular de *O. ficus-indica* Griffith (2004), la atribuye a que los cultivares de esta especie podrían haberse originado de diferentes ancestros.



**Figura 2. Fenograma generado a partir de cálculo de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice.**

## CONCLUSIONES

El polimorfismo que presentaron los 22 microsatélites y el número elevado de alelos encontrados, indica que en el grupo de genotipos y variedades estudiado existe gran diversidad genética y que este tipo de marcadores son útiles para realizar estudios de variabilidad genética intra e inter específica.

La clasificación taxonómica establecida basada en características morfológicas no coincidió con los resultados obtenidos con los microsatélite.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anoop S., M. K, Rana and S. P. Preetham (2012).** Cactus: a medicinal food. *Journal Food Scientists & Technologists*. 49(5):530-536.
- Britton N. L. and J. N. Rose (1963).** The Cactaceae, vol 1. Dover, New York.
- Bravo Hollis H. (1978).** Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México, D.F. 743 p.
- Bravo H. H. y Scheinvar L. (1995).** El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de cultura económica. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, D.F.
- Bravo H. H., Scheinvar L. (1999).** El interesante mundo de las cactáceas. 2da ed. Fondo de cultura económica. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México, D. F. 233 p.
- Caruso M., S. Currò, G. Las Casas, S. La Malfa and A. Gentile (2010).** Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Plant Systematics and Evolution*. 290:85-97.

- Chessa I., P. Erre, M. Barbato, G. Nieddu and J. Ochoa ( 2013).** Polymorphic microsatellite DNA markers in *Opuntia* spp. Collections Acta Hort. (ISHS) 995:35-41.
- Clark L. V. and M. Jasieniuk (2011).** Polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*. 11: 562-66.
- Cuevas S. J. A. (2002).** Banco nacional de germoplasma vegetal, Programa nacional de etnobotanica, serie: Conservacion de recursos vegetales No. 5. Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo Méx. 30 p.
- Dice L. R. (1945).** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 (3): 297-302.
- Erre P., G. Nieddu and I. Chessa (2011).** Identification of microsatellite loci in *opuntia* spp. and their characterization in cultivars and species. Acta Horticulturae. 918, ISHS.
- Felker P. (2001).** Utilization of *Opuntia* for forage in the United States of America. In: Mondragón J. C. y Pérez G. S. Eds. Cactus (*Opuntia* spp.) as Forage, pp. 51-56, FAO Plant Production and Protection Paper 169. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Gallegos V. C., J. Cervantes H. y A. Barrientos P. (2006).** Conservación *ex situ* y custodia de los cultivares objeto de registro y los de referencia en la guía UPOV. SINAREFI.
- Gallegos V. C. y C. Mondragón J. (2011).** Cultivares selectos de tuna, de México al Mundo. Ed. Chapingo. México.159p.
- García-Zambrano E. A., A. Gutiérrez D., G. E. Salinas G., E. Cárdenas C., R. E. Vásquez A., F. Zavala G. y J. Martínez de la C. (2006).** Clasificación y estimación de la diversidad genética de Nopal *Opuntia* spp en base a descriptores fenotípicos y

marcadores genético moleculares. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 75: 125-135.

**García-Zambrano E. A., F. Zavala G., A. Gutierrez D., M. C. Ojeda Z. e I. Cerda H. (2009).**

Estimación de la diversidad genética del nopal, usando marcadores moleculares tipo AFLP. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*. 78. 117-120.

**González D. A., M. E. Riojas L. y H. J. Arreola N. (2001).** El género *Opuntia* en Jalisco:

Guía de campo. Universidad de Guadalajara, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Guadalajara. 135p.

**Granados S. D. y A. D. Castañeda P. (1991).** El nopal. Historia, fisiología, genética e

importancia frutícola. Editorial Trillas. D. F., México. 227 p.

**Griffith M. P. (2004).** The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica*

(Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1915–1921.

**Helsen P., P. Verdyck, A. Tye, K. Desender, N. Van Houtte and S. Van Dongen (2007).**

Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos prickly pear (*Opuntia*) cactus species. *Mol Ecol Notes* 7:454–456.

<http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola>

**Luna-Paez A., E. Valadez M, A. F. Barrientos P. y C. Gallegos V. (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*. 9:43-59.

**Mondragón J. C. (2003).** Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de

nopal (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo* 9:97–114

- Mullis K. B. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262(4), 56- 61, 64-55.
- Nei M., and W. H. Li (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(10), 5269–5273.
- Pacheco A. M. A. (2013).** Discriminación de plantas de origen sexual de nopal obtenidas de hibridaciones de tunas mexicanas (*Opuntia* ssp.) Mediante la técnica ISSR. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis. 68 p.
- Pimienta B. E. (1990).** El nopal tunero. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 54 p.
- Reyes-Agüero J. A., J. R. Aguirre R. and H. M. Hernández (2005).** Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia* 39:395–408.
- Samah S., C. V. de Teodoro P., M. A. Serrato C. and E. Valadez M. (2015).** Genetic diversity, genotype discrimination, and population structure of mexican *Opuntia* sp., determined by SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*. 34: 146-159.
- Scheinvar L. (1995).** Taxonomy of utilized opuntias. In: Barbera G., Inglese P., Pimienta-Barrios E. (eds) *Agroecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO plant production and protection paper 132. FAO, Rome, pp 20–27

## CAPÍTULO III

### HUELLA GENÉTICA DE VARIEDADES DE NOPAL (*Opuntia* spp.) PRODUCTORAS DE NOPALITOS Y FRUTA

### GENETIC FINGERPRINT OF VARIETIES OF NOPAL (*Opuntia* spp.) FOR PRODUCTION OF NOPALITOS AND FRUITS

#### RESUMEN

El nopal (*Opuntia* spp.) es una planta endémica de América y se estima que en México existen alrededor de 76 especies nativas. Los usos económicos más importantes son producción de fruta y nopalitos. La producción comercial de ambos se hace con pocas variedades, que a su vez pertenecen a pocas especies. Para ofrecer a los agricultores y al mercado mayor diversidad de productos, el Programa de Mejoramiento de Nopal del Programa de Genética del Colegio de Postgraduados ha generado variedades y tecnología para la producción de tuna y nopalitos de alta calidad. El objetivo de este trabajo fue obtener la huella genética de 11 variedades, en las que se incluyen una variedad para producir nopalitos sin espinas, una variedad que produce nopalitos color morado, y dos que producen frutos de alta calidad y sin semillas induciendo la partenocarpia. Se realizó la extracción de ADN con el Kit ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen, una amplificación de los microsatélites por PCR y una electroforesis capilar con un secuenciador de ADN. Se obtuvo la huella genética de las variedades; es decir, se obtuvo el perfil alélico de cada variedad para cada uno de los microsatélites, y también se generó un fenograma. La huella genética de las variedades puede ser utilizada para garantizar la identidad varietal y para la gestión de la propiedad intelectual.

**Palabras clave:** *Opuntia* spp. ADN, PCR, microsatélites, huella genética.

## SUMMARY

The nopal (*Opuntia* spp.) is an endemic plant of America and it is estimated that in Mexico there are about 76 native species. The most important economic use is production of nopalitos and fruit. The commercial production of both is made with few varieties, which in turn belong to few species. In order to offer greater diversity of products to farmers and the market, the Genetics Program of the Colegio de Postgraduados has generated varieties and technology for the production of high-quality fruits and nopalitos. The objective of this work was to obtain the genetic fingerprint of 11 varieties, which include a variety to produce spineless nopalitos, a variety that produces purple nopalitos, and two that produce high quality seedless fruits by inducing parthenocarpy. DNA extraction was performed with the ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen Kit; amplification of the microsatellites by PCR and capillary electrophoresis with a DNA sequencer. The genetic fingerprint of each variety was obtained; that is, the allelic profiles of each variety were obtained for each of the microsatellite, and a phenogram was also generated. The genetic fingerprint can be used to guarantee the varietal identity and for the management of intellectual property.

**Keywords:** *Opuntia* spp. DNA, PCR, microsatellites, genetic fingerprints.

## INTRODUCCIÓN

La familia de cactácea está integrada por alrededor de 2000 especies (Bravo y Scheinvar, 1999), distribuidas primordialmente en regiones de clima árido y semiárido. Las condiciones geográficas de México con su relieve tan particular, han favorecido la diversificación de estas plantas, dando lugar a zonas de una gran riqueza biológica (Prieto *et al*, 2006).

El nopal (*Opuntia* spp.) es endémico del continente Americano; se estima que en México existen 76 especies (Guzmán *et al.*, 2003). En el país destaca la región de la Altiplanicie Meridional con la mayor riqueza específica de *Opuntia* y mayor cantidad de especies endémicas (Reyes *et al.*, 2006). El uso económico más importante del nopal a nivel mundial es la producción de fruta y verdura. Actualmente se cultiva en México, Italia, Chile, Estados Unidos, Sudáfrica, Israel, Marruecos, Túnez, Colombia y Perú entre otros (Cruz y Paredes, 2010).

En los últimos años el consumo de tuna en México ha permanecido estable, en 3.8 kg por persona al año; en contraste el consumo de nopalito se ha duplicado y actualmente es de 5.4 kg por persona por año (SIAP, 2016).

Desde la década de los años 60 ha habido interés en el mejoramiento genético del nopal con objeto de mejorar la producción y la calidad de las tunas y nopalitos además de obtener productos derivados; sin embargo, a la fecha existe un uso restringido de la diversidad genética de *Opuntia* tanto en la producción comercial como en el mejoramiento genético. Actualmente la producción de tuna enfrenta varios problemas: la falta de mercado nacional e internacional, la estacionalidad de la producción, los gloquidios (“ahuates”), la gran cantidad de semillas en el fruto y la corta vida de anaquel de éste (Livera 2016, comunicación

personal). En cuanto a la producción de nopalito, Livera (2016, comunicación personal) considera una necesidad la oferta de nuevas variedades con características novedosas, como son nopalitos sin espinas y con color diferente al verde, con propiedades funcionales y nutraceuticas. Los señalamientos anteriores sugieren la necesidad de hacer un mayor uso de la diversidad genética; al respecto, otros investigadores mencionan que en los programas de mejoramiento no se han tenido proyectos de largo plazo que hayan considerado un mejor conocimiento y uso de la diversidad genética de *Opuntia* para poder ofrecer nuevas variedades con mejores productos, debido a que las plantas de *Opuntia* son perennes, presentan apomixis y también a que hay pocos investigadores que trabajen con nopal. (Pimienta, 1990; Gallegos y Mondragón, 2011; Pacheco 2013).

La producción comercial de nopal verdura en México se hace utilizando tres variedades, principalmente. La variedad más utilizada es 'Milpa Alta', siguiéndole en importancia 'Atlixco' o 'Negrito' y 'Copena V1', las tres pertenecen a *O. ficus-indica* (Gallegos y Mondragón, 2011).

'Milpa Alta', es de crecimiento vigoroso, con hábito erecto; cladodio de forma elíptica y con pocas espinas, de color verde claro y grosor del cladodio menor que 'Copena V1' y 'Atlixco'. Esto le confiere una menor resistencia al manejo postcosecha. Sin embargo, la productividad es alta, principalmente en climas subtropicales (Gallegos y Mondragón, 2011).

'Atlixco' o 'Negrito', es de crecimiento vigoroso, con hábito erecto; cladodio joven es de forma oboval y cuando es adulto es rómbico, con pocas espinas y de color verde intenso y se le considera de calidad excepcional. Presenta alta productividad y gran respuesta de producción en climas templados (Gallegos y Mondragón, 2011).

´Copena V1´, se caracteriza por tener crecimiento muy vigoroso, hábito erecto; cladodio oboval, de tamaño medio, color verde medio y con pocas espinas. El nopalito es de forma elíptica de color verde claro y presenta un espesor mayor que ´Milpa Alta´ lo que le da mayor resistencia al manejo poscosecha. Se generó en el Colegio de Postgraduados cuando formaba parte de la Escuela Nacional de Agricultura hoy Universidad Autónoma Chapingo por el Dr. Facundo Barrientos Pérez, y fue seleccionada para la producción de nopalito, sin embargo produce tunas de excelente calidad demandadas principalmente por el mercado Canadiense (Gallegos y Mondragón, 2011).

La producción nacional de tuna se basa principalmente en ´Reyna´ y ´Cristalina´, y en menor importancia ´Copena 5´ en tunas blancas, pertenecientes a *O. albicarpa*; ´Rojo Pelón´ en tunas rojas, de la especie *O. ficus-indica* (Gallegos y Mondragón, 2011).

´Reyna´, es un cultivar de alta productividad. La planta es vigorosa, de hábito erecto y porte alto, cladodios largos y de forma elíptica, de color verde grisáceo con la presencia de 4-5 espinas por areola. El fruto es de tamaño medio (7 cm de largo y 5 cm de ancho), de forma elíptica a oblonga. La cascara y pulpa son de color verde claro y la cáscara es delgada, el fruto apreciado por el consumidor pero tiene la limitante que es sensible al manejo poscosecha (Gallegos y Mondragón, 2011).

´Cristalina´, es de vigor alto y porte abierto, cladodios largos y anchos y de forma oboval estrecho, con escasas espinas cortas. Su fruto es grande (9.6 cm de largo y 6.6 de ancho, en promedio), de forma elíptica y con pocos glóquidos, cascara verde y pulpa de color blanquecina (Gallegos y Mondragón, 2011).

‘Copena 5’ es de hábito erecto y porte alto, de cladodios largos y en forma elíptica de un color verde grisaseo, presentan de 4 a 5 espinas por areola. Su fruto es mediano (8.0 y 5.8 cm, largo y ancho, respectivamente) de forma elíptica, en frutos maduros la cascara y la pulpa son de color verde claro; la cascara es delgada y se cataloga como una variedad sobresaliente debido a su alta productividad.

‘Rojo pelón’, la planta es de crecimiento vigoroso con hábito decumbente; cladodios elípticos, pequeños a medianos, gruesos y color verde oscuro y prácticamente sin espinas. El fruto es de tamaño mediano (6 cm de ancho y 8 cm de largo), elíptico a aboval con pocos glóquidos color marrón. La cascara es de color rojo oscuro y la pulpa roja. Presenta una resistencia media al transporte (Gallegos y Mondragón, 2011).

Para coadyuvar a resolver los problemas del cultivo del nopal, en el Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, se lleva a cabo el proyecto Mejoramiento Genético del nopal para la producción de fruta y verdura que se inició en los años 60 y que ha liberado variedades para la producción de fruta (‘Copena 5’), verdura, (‘Copena V1’) y forraje (‘Copena F1’), una variedad 100% sin espinas, etc. y que últimamente ha seleccionado dos variedades sobresalientes para la producción de frutos de alta calidad y sin semillas; así mismo recientemente ha obtenido una variedad para la producción de nopalitos de color morado (Livera, 2016, comunicación personal).

‘Cp-Tepemor’ (*Opuntia robusta*), Cladodios con una espina por areola, raramente con dos; flor con tépalos color amarillo, fruto con cáscara y pulpa color rojo.

‘CP-RSE’ (*Opuntia robusta*), Cladodios que no presentan espinas y son de color verde grisáceo.

‘CP-Azteca’, Cladodios sin espinas, flor con tépalos de color amarillo, fruto con cáscara y pulpa color rojo.

‘CP-Dorada’, Cladodios sin espinas, flor con tépalos de color amarillo, fruto con cáscara y pulpa color amarilla.

Al obtener nuevas variedades surge la necesidad de caracterizarlas para su registro con base en características morfológicas; adicionalmente con los avances de la biología molecular, se pueden caracterizar utilizando marcadores genéticos moleculares para dar mayor solidez a la identificación varietal, planear de mejor manera el logro de los objetivos de mejoramiento genético y proporcionar bases científicas para la defensa de la propiedad intelectual.

La caracterización genotípica con marcadores moleculares también es útil para la discriminación de individuos apocmícticos en el mejoramiento y estudios de diversidad genética y filogenia, entre otros (Mondragón y Bordelon, 2002, Felker *et. al.*, 2005, Pacheco, 2013).

Los marcadores moleculares empleados en nopal han sido Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD’s), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP’s) e Inter Simple Sequence Repeats (ISSR’s) (Mondragón, 2003, Luna-Paez *et al.*, 2007, Garcia Zambrano *et al.* 2006, entre otros). En los últimos años se han usado Microsatélites (Simple Sequence Repeat, SSR’s), que son arreglos de di-, tri- o tetra- nucleótidos, posicionados uno enseguida del otro, muy abundantes en todo el genoma eucariótico, co-dominantes, expresan varios alelos

por locus, tienen un alto nivel de polimorfismo y su costo es menor en comparación de marcadores de generaciones anteriores (González y Aguirre, 2007). Los microsatélites han sido empleados en *Opuntia* en estudios de diversidad genética (Caruso *et al.*, 2010; Samah *et al.*, 2015) y caracterización de cultivares (huella genética) y especies (Helsen *et al.*, 2007, Erre *et al.*, 2011 y Chessa *et al.*, 2013). Describir huella genética

El objetivo del presente trabajo fue obtener la huella genética de 11 variedades mediante el uso de 26 microsatélites.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material Vegetal**

Se utilizaron plantas de las principales variedades o cultivares comerciales para la producción de fruta; 'Reyna', 'Cristalina', Rojo Pelón'; 'CP-Azteca', 'CP-Dorada' y 'Copena 5' y para la producción de nopalitos: 'Milpa Alta', 'Atlixco', 'CP-RSE', 'CP-Tepemor', y 'Copena V1'

### **Extracción y cuantificación de ADN**

Se recolectaron cladodios recién emergidos, con un tamaño máximo de tres centímetros, de los cuales se tomaron 200 mg de tejido para extraerles el ADN utilizando el Kit comercial ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen, con adecuaciones que consistieron en agregar 800 µL de Lisis y 100 µL de reactivo A antes de macerar y 100 µL de Lisis y 100 µL de reactivo A después de haber macerado, se utilizó el robot de extracción King Fisher Flex®, ThermoScientific. La cuantificación del ADN se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop

2000, ThermoScientific, de ultra-bajo volumen, con lecturas de absorbancia en 260 y 280 nm.

### **Amplificación por PCR**

Se utilizaron 26 iniciadores en la amplificación por PCR (Mullis, *et al.*, 1990), seleccionados con base en los resultados de Helsen *et al.* (2007), Caruso *et al.*, (2010), Erre *et al.*, (2011), Chessa *et al.*, (2013) y Samah *et al.* (2016) y etiquetados con fluorescencia 6-FAM, ROX o HEX en el extremo 5', como se muestra en el Cuadro 1, para su detección en el secuenciador de ADN.

La amplificación por PCR se realizó con un Termociclador BIORAD modelo C1000 Thermal Cycler de manera multiple por lo que fue necesario agrupar los iniciadores (Cuadro 1) principalmente por temperatura, tamaño de fragmentos y la fluorescencia con la que fueron etiquetados, y consistió en 25 µL de volumen final que contenían 20 ng de ADN genómico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X Taq Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 1 U de Taq polimerasa, 10 pMol de cada primer. El protocolo de amplificación fue de una desnaturalización inicial de 12 min a 95 °C, 35 ciclos que consistieron en: desnaturalización 60 s a 95 °C, alineamiento 60 s a 52-58.8 °C (Cuadro 1), extensión de 90 s a 72 °C; por último una extensión final de 12 min a 72 °C.

### **Electroforesis**

Una vez realizada la PCR, los productos fueron analizados por electroforesis capilar en un secuenciador de ADN (Genetic Analyzers ABI® 3130, Applied Biosystems), utilizando LIZ-500 como marcador interno de peso molecular. La lectura de los electroferogramas se realizó con el software GeneMapper® V 4.0.

**Cuadro 1. Microsatélites (SSR's) empleados para la amplificación por PCR.**

Grupo	Primer/Locus	T°C	Tamaño de fragmento (pb)	Iniciador hacia adelante//Iniciador en reversa
1	Opufic04	58.8	196-218	[ROX]TGCAGTCAGGTTTCTCATTGTC//GCCCAACTCTTACCCTCTCC
	Opufic17	58.8	158-181	[6-FAM]ATGGATCGTCTTCGTCCCTG//GATGTCACCCCATTCCATTG
	Opuntia1	58.8	100-126	[HEX]CCATCTACTTCCCACCTTGC//CTCCTGTGTTTCTCTGTGCTC
	Opuntia5	58.8	352-367	[HEX]TATGCACAAAGCACCATGC//CCAACCATACCAACTGTACTGAC
2	Opufic13	56.7	138-190	[HEX]GGGCTTCAACGATGCTG//AAGACATAGGTTGGAGACTCAATTC
	Opuntia9	56.7	147-185	[ROX]CTAGGCTTCATCCCACATTAGG//TCCAAATTCACCTCCTCTGC
	Opuntia13	56.7	247-301	[ROX]CCAAATACCCAGCCCATAC//CGAGAACCTAACTCCGATG
	Opuntia16	56.7	322-350	[6-FAM]GTCAATCCCGAGCAATTTAGG//CTCATTAGTGAGGCCCAACG
3	Opufic03	56.7	134-162	[HEX]GCTTTGAAATGTCTTGTGTGAATG//AGTCCTGGGAATCCTCAACC
	Opuntia8	56.7	136-178	[ROX]ACCGCCATCACCAGCTATC//CTCACCCACAATTCCAAACC
	Opuntia10	56.7	191-247	[6-FAM]ACCAACATCAAACCTTCAATACC//CATGCTTCATCTGTTCATTGG
	Opuntia15	56.7	343-357	[6-FAM]GCGGTGGAAGCAGTTAGG//TCAGTCGATCATACCCAAGG
4	Opufic14	56.0	162-262	[ROX]AATTGACCTCTTCACGTTATGC//GAGAAAGTGAGGCAGACAACG
	Opuntia3	56.0	317-344	[ROX]GTGAGTGCCAGATGAAACT//TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG
	Opuntia11	56.0	110-138	[6-FAM]CCTACACCTGCTGCCAATC//CGAGACAAACATCAGAGGAG
5	Opufic10	55.5	213-250	[6-FAM]GCTTCCTTCAATAGCATGACC//TGAGGCTTTACATGGCACAC
	Opuntia12	55.5	226-294	[HEX]TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC//GGTATCTTGTATTTCGTTCCG
6	Opufic01	56.2	147-178	[HEX]TGGGTGAGACAATATAGTAGACCAAG//CTGCCGTGAAATCTGAATGG
	Opufic16	56.2	110-153	[6-FAM]TCCCATGCTTCAGTTTTGTTC//GCCGGAATTCGTTATCAGTG
7	Opufic09	56.2	182-236	[ROX]GGCAATACCCTGAGTTGAGC//CCTGAGACTACAGCGTGAGGA
	Opufic15	56.2	182-213	[HEX]TTAAACCTGCACACCATTTCG//GTGTGAGGCGAGGTTGCTC
	Opuntia21	56.2	75-144	[6-FAM]AAAGGGAAGACCTTGCTCTC//TCTATTCTCAGCCCTCCTCTC
8	Opuntia 2	55.2	211-258	[6-FAM]CACATACGCAAATACATGG// GCTTCATTTTCCAGGTTACT
	Opuntia 6	55.2	127-152	[6-FAM]ATCTCATTGTATCATCTATTTCTG//AGCACAAAGACACTTCATCG
9	Opuntia 4	53.5	105-152	[ROX]GATGATTCCGCCATTACCC// CGTCGATCTGACTCACACC
	Opuntia 14	53.5	206-258	[6-FAM]TCAGGATTCAAGAAGATTTGC//CGATTCAATTGATGATGGGC

## **Análisis de datos**

Los resultados obtenidos con GeneMapper® V 4.0 fueron procesados con el paquete estadístico Polysat, utilizado para el análisis de resultados obtenidos de especies poliploides y que funciona bajo el ambiente R (Clark y Jasieniuk, 2011); se generó una matriz de presencia y ausencia para posteriormente realizar un análisis de las frecuencias alélicas con el programa InfoGen/E V 2014 y comparar las similitudes o diferencias en cuanto al patrón expresado, generándose un fenograma con el coeficiente de Dice ( $S_D$ ) (Dice, 1945) y Nei-Li (1979), además de los patrones alélicos o geles virtuales de los microsatélites

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El ADN extraído con el Kit comercial tuvo un rendimiento que osciló entre 90 y 258  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , y la relación de la absorbancia  $DO_{260/280}$  vario de 1.68 a 1.97 como se muestra en el Cuadro 2, resultados que indican cantidad, calidad y pureza apropiados para los objetivos de la investigación.

**Cuadro 2. Concentración de ADN y relación de absorbancias 260/280.**

Variedad	Especie	Concentración ADN	Unidades	Absorbancia 260/280
Atlixco	<i>O. ficus-indica</i>	166.5	ng/μl	1.94
Copena 5	<i>O. albicarpa</i>	107.8	ng/μl	1.68
Copena V1	<i>O. ficus-indica</i>	111.9	ng/μl	1.74
CP-Azteca	<i>O. ficus-indica</i>	148.5	ng/μl	1.93
CP-Dorada	<i>O. ficus-indica</i>	133.6	ng/μl	1.83
CP-RSE	<i>O. robusta</i>	127.4	ng/μl	1.97
Cristalina	<i>O. albicarpa</i>	90.0	ng/μl	1.86
Milpa Alta	<i>O. ficus-indica</i>	258.3	ng/μl	1.82
Reyna	<i>O. albicarpa</i>	112.0	ng/μl	1.70
Rojo Pelon	<i>O. ficus-indica</i>	152.1	ng/μl	1.87
CP-Tepemor	<i>O. robusta</i>	138.0	ng/μl	1.75

La calidad y pureza del ADN se corroboró con PCR y electroforesis capilar. En la Figura 1 como ejemplo, se presentan los resultados obtenidos con el iniciador Opufic 16, en cuatro variedades.

Tamaño de fragmento en pares de bases

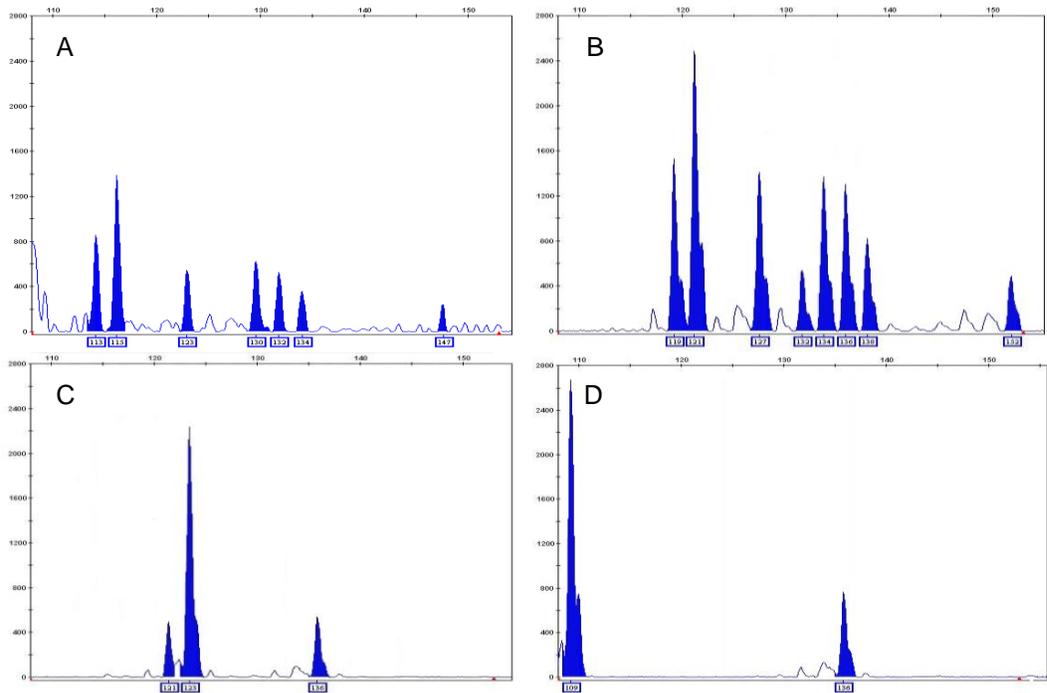


Figura 1. Electroferogramas con Opufic 16. A: 'CP-Azteca', B: 'CP-Dorada', C: 'CP-RSE' y D: 'CP-Tepemor'.

En el Cuadro 3 se hace una comparación de los resultados obtenidos en esta investigación con los de otros autores que utilizaron los mismos microsatélites. De manera general se observan datos similares, los cambios en la temperatura se adecuaron al termociclador, clasificación por grupos en el PCR múltiple; el rango en el tamaño de los fragmentos en algunos SSR's se modificó (los que presentan \*) en base a que salieron consistentes en la mayoría de las variedades; el número de alelos cambia debido a la base genética estudiada o en la que fueron desarrollados los microsatélites; por ejemplo: Helsen *et al.* (2007) desarrollaron 16 SSR's para dos variedades de *O. echios* de las islas Galápagos, y Chessa *et al.* (2013) utilizaron 29 variedades de Italia y Argentina de diferentes especies.

**Cuadro 3 Cuadro comparativo de la temperatura de amplificación, alelos observados y tamaño de los fragmentos obtenidos en este estudio con los de estudios previos**

No.	Nombre Primer	En este trabajo			Helnsen <i>et al.</i>			Erre <i>et al.</i>			Caruso <i>et al.</i>		
		T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb
1	Opufic 01	56.2	11	147-178				56	11	147-178			
2	Opufic 03	56.7	5	143-162				56	6	143-162			
3	Opufic 04	58.8	6	196-218				56	14	196-218			
4	Opufic 09	56.2	14	182-237*				56	16	182-236			
5	Opufic 10	55.5	6	213-250				56	16	213-250			
6	Opufic 13	56.7	11	138-190				56	19	138-190			
7	Opufic 14	56	20	162-262				56	22	162-262			
8	Opufic 15	56.2	12	182-213				56	13	182-213			
9	Opufic 16	56.2	17	108-153*				56	16	110-153			
10	Opufic 17	58.8	8	158-181				56	14	158-181			
11	Opuntia 1	58.8	8	100-126	61.5	17	100-126						
12	Opuntia 2				55.2	35	211-258						
13	Opuntia 3	56	6	302-344*	59	15	317-344				53.0 - 55.0	7	
14	Opuntia 4				53.5	32	105-152						
15	Opuntia 5	58.8	2	352-367	61.5	6	352-367				53.0 - 55.0	11	
16	Opuntia 6				55.2	15	127-152						
17	Opuntia 8	56.7	12	100-178*	57	34	136-178						
18	Opuntia 9	56.7	11	100-185	59.3	28	147-185				53.0 - 55.0	22	
19	Opuntia 10	56.7	7	155-247*	59	24	191-247						
20	Opuntia 11	56	7	110-138	53	17	110-138				53.0 - 55.0	9	
21	Opuntia 12	55.5	16	226-294	57	53	226-294				53.0 - 55.0	33	
22	Opuntia 13	56.7	6	247-301	53	37	247-301				53.0 - 55.0	16	
23	Opuntia 14				53.5	44	206-258						
24	Opuntia 15	56.7	2	320-357*	53	10	343-357						
25	Opuntia 16	56.7	2	322-350	59.3	17	322-350						
26	Opuntia 21	56.2	16	75-144	59	42	75-144						

T °C temperatura de amplificación; All Obs Alelos observados; Rango. Rango de los fragmentos en pares de base.

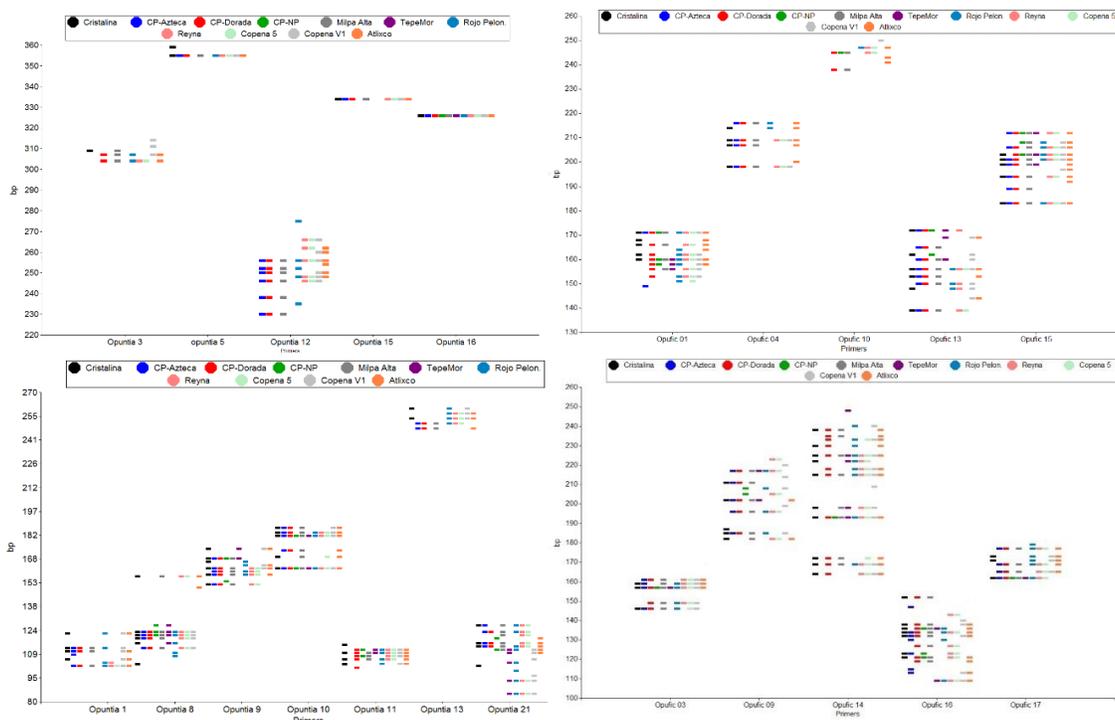
Continuación **Cuadro 3.**

No.	Nombre Primer	Nieddu <i>et al.</i>					Samah <i>et al.</i>			
		Helnsen <i>et al.</i>			Erre <i>et al.</i>		T °C	All Obs	Rango pb	
		T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb	T °C	All Obs	Rango pb
1	Opufic 01				56	19	148-184	68	7	
2	Opufic 03				56	14	134-163	67	7	
3	Opufic 04				56	17	196-222	68	11	
4	Opufic 09							67	23	
5	Opufic 10							66	18	
6	Opufic 13				56	31	136-190			
7	Opufic 14				56	22	143-282			
8	Opufic 15							65	12	
9	Opufic 16							65	12	
10	Opufic 17							66	9	
11	Opuntia 1									
12	Opuntia 2	56	9	201-217						
13	Opuntia 3									
14	Opuntia 4	56	14	98-124						
15	Opuntia 5									
16	Opuntia 6							65	7	
17	Opuntia 8	56	19	102-137						
18	Opuntia 9	56	27	146-173						
19	Opuntia 10	56	8	159-191						
20	Opuntia 11							64	14	
21	Opuntia 12	56	21	226-272						
22	Opuntia 13	56	19	238-262				65	13	
23	Opuntia 14									
24	Opuntia 15									
25	Opuntia 16									
26	Opuntia 21	56	28	93-166						

**T °C** temperatura de amplificación; **All -Obs** Alelos observados; **Rango**. Rango de los fragmentos en pares de base.

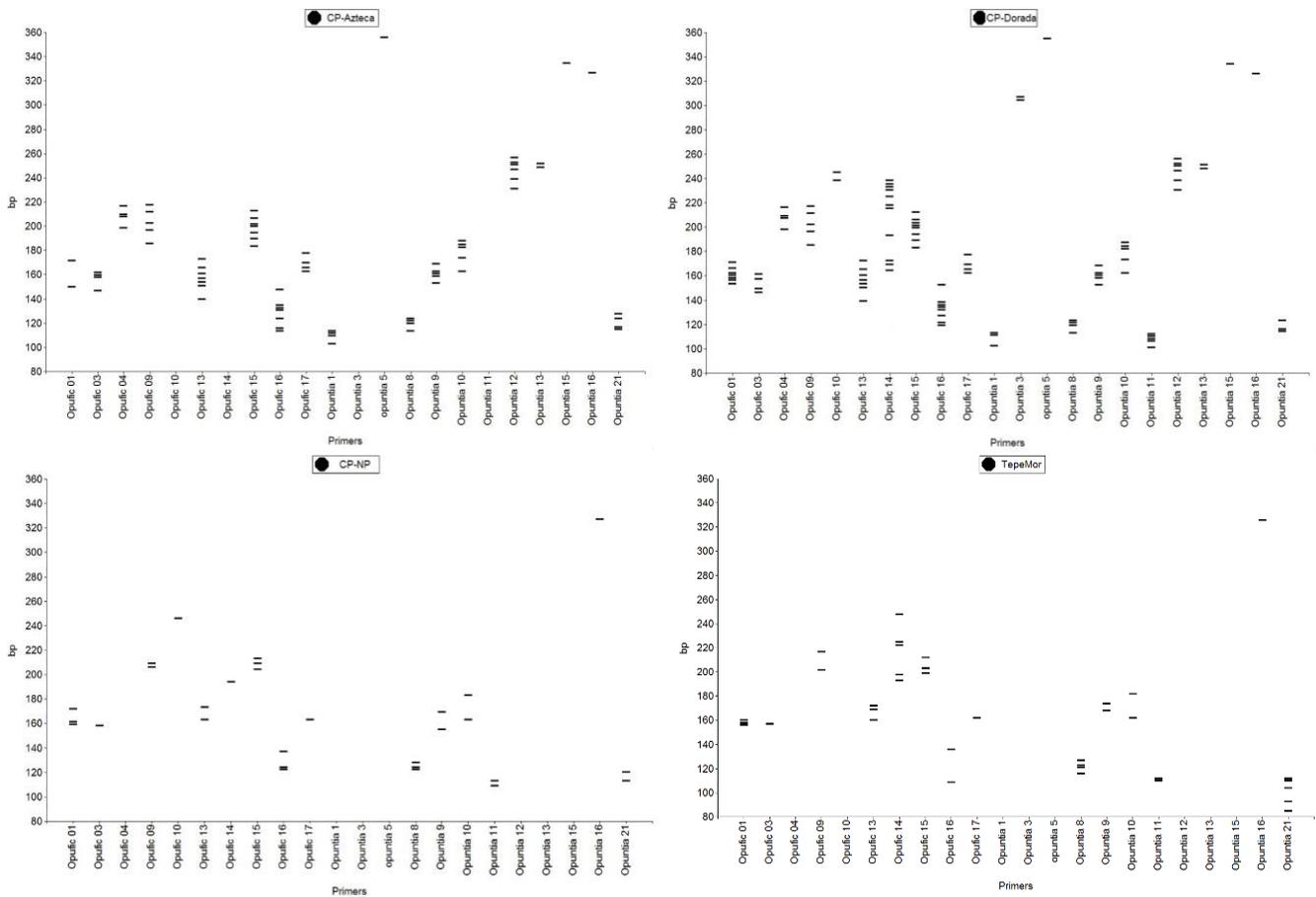
De los 26 marcadores se descartaron cuatro, por no presentar amplificación, o porque presentaban perfiles confusos para su lectura. El número de alelos amplificados vario dependiendo de cada microsatélite, llegándose a encontrar hasta 20. Los SSR's que más alelos presentaron fueron Opufic 14 con 20, Opufic 16 con 17 alelos y Opuntia 12 y Opuntia 21 con 16 cada uno. En contraste, solamente presentaron dos alelos Opuntia 5, Opuntia 15 y opuntia 16,

Con los pesos moleculares obtenidos se crearon patrones alélicos, también llamados geles virtuales, expresados en pares de bases (pb), cada patrón resultó único para cada variedad por lo que representa su huella genética (Figura 2) útil para la identificación varietal y, por lo tanto, para la comparación de germoplasma (Arнау *et.al.*, 2001).



**Figura 2. Huella genética de 11 variedades obtenida con 22 microsatélites.**

En la Figura 3 se muestra la huella genética por separado de todos los microsatélites para cuatro variedades del Colegio de Postgraduados.



**Figura 3. Huella genética de cuatro variedades del Colegio de Postgraduados obtenida con 22 microsatélite A) 'CP-RSE', B) 'CP-Tepemor', C) 'CP-Azteca' y D) 'CP-Dorada'.**

Con los resultados obtenidos con los microsatélites se elaboró una matriz de distancias fenéticas utilizando el coeficiente de Dice (Dice 1945) (Cuadro 4) y a partir de ésta se obtuvo un fenograma (Figura 4) donde se pueden observar las similitudes y diferencias entre las variedades.

**Cuadro 4. Matriz de distancias fenéticas calculadas con el coeficiente de Dice generada con los datos de los microsatélites.**

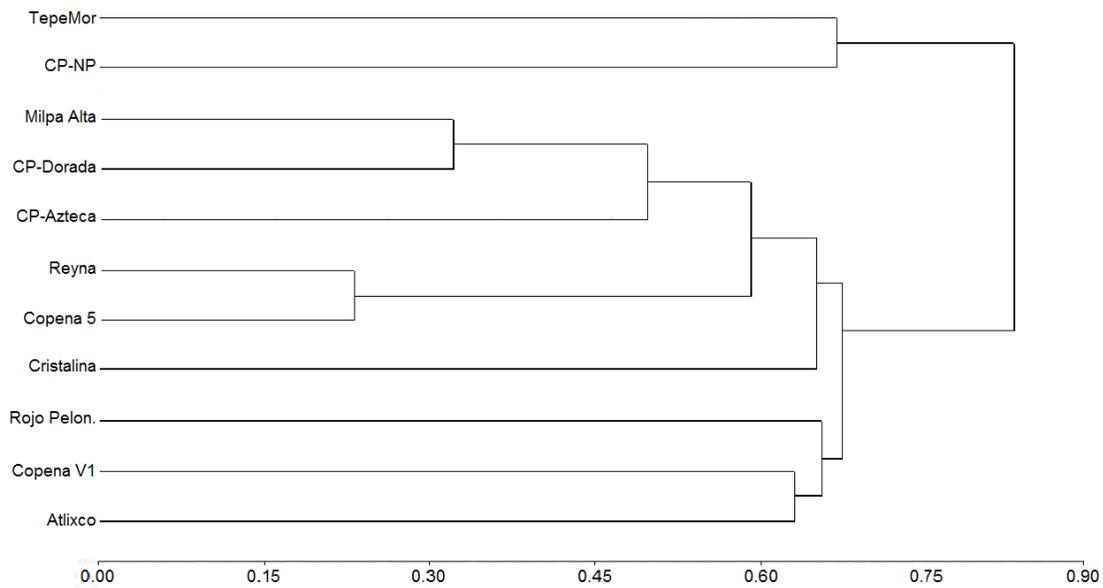
	Atlixco	Copena 5	Copena V1	CP-Azteca	CP-Dorada	CP-RSE	Cristalina	Milpa Alta	Reyna	Rojo Pelon	CP-TepeMor
Atlixco	0.00										
Copena 5	0.77	0.00									
Copena V1	0.76	0.78	0.00								
CP-Azteca	0.84	0.79	0.85	0.00							
CP-Dorada	0.73	0.69	0.79	0.64	0.00						
CP-RSE	0.92	0.90	0.91	0.93	0.90	0.00					
Cristalina	0.76	0.79	0.82	0.80	0.75	0.91	0.00				
Milpa Alta	0.73	0.68	0.81	0.63	0.43	0.91	0.72	0.00			
Reyna	0.79	0.32	0.78	0.78	0.69	0.89	0.79	0.69	0.00		
Rojo Pelon.	0.80	0.75	0.76	0.85	0.79	0.91	0.82	0.81	0.74	0.00	
CP-TepeMor	0.91	0.89	0.88	0.92	0.89	0.79	0.89	0.90	0.88	0.88	0.00

En la Figura 4 se observa que 'CP-RSE' y 'CP-Tepemor' que pertenecen a *O. robusta* conforman un grupo; otro grupo lo integran variedades de *O. albicarpa* ('Reyna', 'Cristalina' y 'Copena 5') y variedades de *O. ficus-indica* ('Milpa Alta', 'CP-Dorada', 'CP Azteca' 'Rojo Pelón', 'Copena V1' y 'Atlixco'); dentro del grupo de *O. ficus-indica* se diferencian dos sub grupos, uno con las variedades 'Milpa Alta', 'CP-Dorada' y 'CP Azteca' y el otro con 'Rojo Pelón', 'Copena V1' y 'Atlixco'; estas últimas tres presentan un mayor grosor en el nopalito (Gallegos y Mondragón, 2011), carácter morfológico que podría estar relacionado en la separación de estos sub grupos.

En el primer sub grupo de *O. ficus-indica*, las tres variedades son morfológicamente similares y una característica para diferenciarlas es el color del fruto, en 'Milpa Alta' y 'CP-Dorada'

son de color amarillo, y en 'CP-Azteca' de color rojo; sin embargo 'CP-Dorada' y 'CP-Azteca' se caracterizan por ser excelentes para producir frutos partenocarpicos y de alta calidad. El segundo sub grupo de *O. ficus-indica*, que a pesar compartir la característica de producir nopalitos de mayor grosor, morfológicamente difieren en otras características, prueba de esto es que presentan un porcentaje de similitud menor a 40 (equivalente al 60 % de disimilitud), como se observa en la Figura 4. Griffith (2004), señala que la falta de consistencia en la agrupación de las variedades de *O. ficus-indica*, podría deberse a que los cultivares de esta especie podrían haberse originado de diferentes ancestros

En el caso de *O. albicarpa*, si consideramos un porcentaje de similitud menor a 40 (Figura 4) 'Cristalina' está separada de 'Reyna' y 'Copena 5'; Caruso *et. al.* (2010) incluyeron en su estudio a 'Reyna' y 'Cristalina', y el porcentaje de similitud que presentaron fue menor a 38. Sin embargo, 'Reyna' y 'Copena 5' que están cercanas a nivel molecular, con una similitud de 75 % aproximadamente (Figura 4), también morfológicamente son similares ya que solo pueden ser diferenciadas por caracteres particulares del fruto; algo similar a lo que ocurre con 'CP-Dorada' y 'CP-Azteca', variación fenotípica que Caruso *et al.*, (2010), lo atribuyen a mutaciones.



**Figura 4. Fenograma generado a partir de cálculo de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice.**

## CONCLUSIONES

Con un grupo de 22 microsatélites se obtuvo la huella genética de 11 variedades, que resultó ser única para cada variedad y que puede ser utilizada para garantizar su identidad y proteger la propiedad intelectual que pertenece al país.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arnau G., J. Lallemand and M. Bourgoïn (2001).** Are AFLP markers the best alternative for cultivar identification. *Acta Horticulturae*. 546: 301-6.
- Bravo H. H., Scheinvar L. (1999).** El interesante mundo de las cactáceas. 2da ed. Fondo de cultura económica. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México, D. F. 233 p.
- Caruso M., S. Currò, G. Las Casas, S. La Malfa and A. Gentile (2010).** Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Plant Systematics and Evolution*. 290:85-97.
- Chessa I., P. Erre, M. Barbato, G. Nieddu and J. Ochoa (2013).** Polymorphic microsatellite DNA markers in *Opuntia* spp. Collections Acta Hort. (ISHS) 995:35-41.
- Clark L. V. and M. Jasieniuk (2011).** Polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*. 11: 562-66.
- Cruz H. A. and O. Paredes L. (2009).** Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 12:110 126.
- Dice L. R. (1945).** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 (3): 297-302.
- Erre P., G. Nieddu and I. Chessa (2011).** Identification of microsatellite loci in *opuntia* spp. and their characterization in cultivars and species. *Acta Horticulturae*. 918, ISHS.

- Felker P., S. del C. Rodríguez, R. M. Casoliba, R. Filippini, D. Medina and R. Zapata (2005).** Comparison of *Opuntia ficus indica* varieties of Mexican and Argentine origin for fruit yield and quality in Argentina. *Journal of Arid Environments* 60: 405-422.
- Gallegos V. C. y Mondragón J. C. (2011).** Cultivares selectos de tuna, de México al Mundo. Ed. Chapingo. México.159p.
- García-Zambrano E. A., A. Gutiérrez D., G. E. Salinas G., E. Cárdenas C., R. E. Vásquez A., F. Zavala G. y J. Martínez de la C. (2006).** Clasificación y estimación de la diversidad genética de Nopal *Opuntia* spp en base a descriptores fenotípicos y marcadores genético moleculares. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 75: 125-135.
- Griffith M. P. (2004).** The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1915–1921.
- González A. and Aguirre X. (2007).** Inter Simple Sequence Repeats (ISSR's). *Ecología Molecular*, editado por Eguiarte L. E., Souza V., y Aguirre X., Primera Ed, 567-75. México D. F. CONABIO.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila (2003).** Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 315 p.
- Helsen P., P. Verdyck, A. Tye, K. Desender, N. Van Houtte and S. Van Dongen (2007).** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos prickly pear (*Opuntia*) cactus species. *Mol Ecol Notes* 7:454–456.

- Luna-Paez A., E. Valadez M, A. F. Barrientos P. y C. Gallegos V. (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*. 9:43-59.
- Mondragón J. C. (2003).** Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo* 9:97–114.
- Mondragon J. C. y Bodelon B. (2002).** Presencia de apomixis en cruces de nopales mexicanos y su identificación molecular preliminar. *Revista Fitotecnia Mexicana*.25 (3): 247-252.
- Mullis K. B. (1990).** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* . 262(4), 56- 61, 64-55.
- Nei M., and W. H. Li (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(10), 5269–5273.
- Pacheco A. M. A. (2013).** Discriminación de plantas de origen sexual de nopal obtenidas de hibridaciones de tunas mexicanas (*Opuntia* ssp.) mediante la técnica ISSR. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis. 68 p.
- Pimienta B. E. (1990).** El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 54 p.

- Prieto G. F., S. Filardo K., E. Pérez C., R. Beltrán H., A. Román G. y M. Méndez M. (2006).** Caracterización física y química de semillas de opuntias (*Opuntia* spp.) cultivadas en el Estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, vol. 18, núm. 3, pp. 163-169.
- Reyes-Agüero J. A., J. R. Aguirre R. and A. Valiente B. (2006).** Reproductive biology of *Opuntia*: a review. *Journal of Arid Environ* 64:549–585.
- Samah S., C. V. de Teodoro P., M. A. Serrato C. and E. Valadez M. (2015).** Genetic diversity, genotype discrimination, and population structure of mexican *Opuntia* sp., determined by SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*. 34: 146-159.

## CAPÍTULO IV

### GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN PLÁNTULAS DE CP-TEPEMOR (*Opuntia robusta*) UTILIZANDO MICROSATÉLITES

### SEED GERMINATION AND ASSESMENT OF GENETIC DIVERSITY IN SEDDLINGS OF CP-TEPEMOR (*Opuntia robusta*) USING MICROSATELLITES

#### RESUMEN

El género *Opuntia* spp. está integrado por 189 especies y México es centro de origen de 76. El nopal se ha utilizado desde hace nueve mil años como una fuente importante de alimento. La producción comercial de nopalito en México se basa principalmente en dos variedades de *Opuntia ficus-indica*, alcanzando una producción anual de 670,805 t y un consumo per cápita de 5.4 kg por año. En el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, desde los años 60 se lleva a cabo un programa de mejoramiento genético del nopal que ha generado variedades y tecnología para la producción de fruta y nopalitos y recientemente ha obtenido a 'CP-Tepemor' (*Opuntia robusta*) que se caracteriza por presentar una pigmentación de color morada en los cladodios jóvenes (nopalitos) aptos para consumo como verdura. Se germinaron 1100 semillas de este genotipo, en cada una de tres fechas de siembra, con el objetivo de identificar plántulas con pigmentación morada para hacer selección. Previamente a la siembra las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado durante cinco minutos. Se realizó un conteo diario de las plántulas emergidas y se observaron diferentes tipos de plántula que se agruparon en cuatro clases: verdes, moradas, rosas y bicolors. Las plántulas rosas se consideraron albinas y morían al agotarse las reservas de los cotiledones y se registró su mortalidad. Se realizó también un análisis molecular de la

diversidad genética con 26 microsatélites para generar un fenograma. Se observó que la caracterización molecular de las plántulas no correspondió con la clasificación fenotípica.

**Palabras clave:** *Opuntia robusta*, germinación, plántulas albinas, plántulas moradas, microsatélites.

### SUMMARY

The genus *Opuntia* spp. Is composed of 189 species and Mexico is the center of origin of 76. The nopal has been used for nine thousand years as an important source of food. The commercial production of nopalito in Mexico is based mainly on two varieties of *Opuntia ficus-indica*, reaching an annual production of 670,805 t and a per capita consumption of 5.4 kg per year. In the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, since the 60s a program of genetic improvement of the nopal has been carried out that has generated varieties and technology for the production of fruit and nopalitos and has recently obtained the 'CP-Tepemor' (*Opuntia robusta*) which is characterized by purple pigmentation in young cladodes (nopalitos), suitable for consumption as vegetables. 1100 seeds of this variety were germinated, at each of three planting dates, in order to identify seedlings with purple pigmentation to make selection. Prior to planting the seeds were scarified with concentrated sulfuric acid for five minutes. A daily count of emerged seedlings was carried out and different types of seedlings were grouped into four classes: green, purple, pink and bicolor. Pink seedlings were considered albino and died when the cotyledons were depleted and their mortality recorded. A molecular analysis of genetic diversity was also carried out with 26 microsatellites to generate a phenogram. It was observed that the molecular characterization of the seedlings did not correspond to the phenotypic classification.

**Key words:** *Opuntia robusta*, germination, albino seedlings, purple seedlings, microsatellites.

## INTRODUCCIÓN

El género *Opuntia* spp., perteneciente a la familia Cactaceae, constituye uno de los grupos con mayor diversidad e importancia económica y ecológica, está integrado por 189 especies (Anderson, 2001) y México es centro de origen de 76 (Guzmán *et al.*, 2003). El nopal se ha utilizado en el país desde hace nueve mil años (Chapman *et al.*, 2002). El nopal ha sido una fuente importante de alimento a través del tiempo (Mondragón y Pimienta, 1995); se consumen las tunas, las pencas y las flores; con las tunas se preparan diversos productos como miel, queso de tuna y la bebida fermentada *nochitli* o colonche (Gallegos y Mondragon, 2011).

La producción comercial de tuna en México se basa principalmente en variedades de *Opuntia albicarpa*, y en menor proporción de *O. megacantha*; en la recolección de tunas en nopaleras silvestres y en la producción de traspatio se utilizan otras especies de menor importancia (Gallegos y Mondragon, 2011). La producción comercial anual de tuna es de 423,860 t con un consumo anual per cápita de 3.8 kg. Para nopalito se tiene una producción anual de 670,805 t y un consumo per cápita de 5.4 kg por año (SIAP, 2016).

La propagación principal del nopal se realiza de manera vegetativa, utilizando los cladodios, (Pimienta, 1990). Para propósitos de mejoramiento genético esa técnica es útil solo para incrementar el material pero no para obtener variabilidad genética, que solamente se obtiene por medio de la recombinación que ocurre con la reproducción sexual (Molina, 1992).

Las semillas de muchas especies presentan latencia; Morpeth y Hall (2000) reportaron la combinación de latencias, morfológica y fisiológica, también llamadas latencia exógena y

endógena. El éxito de la germinación de las semillas depende de la pérdida de esta latencia, lo cual puede ocurrir a través del tiempo, para aumentar las posibilidades de establecimiento y supervivencia de la especie (Egley, 1993).

La subfamilia Opuntioideae se caracteriza porque las semillas presentan un tejido funicular que las rodea y que está fuertemente lignificado (Bregman y Bouman, 1983), y este es uno de los motivos por lo que las semillas de algunas cactáceas como el nopal no germinan fácilmente, lo que ha motivado diversos estudios sobre el proceso de la germinación. Para que las semillas de *Opuntia* germinen es necesario romper la barrera que representa la cubierta funicular lignificada; Rojas y Vázquez (2000) hicieron una revisión hasta ese año sobre la germinación de las semillas en cactáceas, donde mencionan distintos procesos de estratificación y escarificación que la favorecen. Ochoa *et al.*, (2015) evaluaron el efecto del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) sobre la germinación en diez cultivares de *Opuntia* y concluyen que bajo condiciones *in vitro* promueve la germinación hasta en un 90 % después de cuatro semanas. En 2010 Delgado *et al.* evaluaron el efecto de distintas especies de hongos para romper la latencia en semillas de *Opuntia* y encontraron que la germinación se incrementa de un 10 a un 40 %, siendo *Trichoderma harzianum* la especie más eficiente. Potter *et al.*, (1984), determinaron que con una inmersión de las semillas en ácido sulfúrico concentrado aumentaba la germinación en algunas especies de *Opuntia*.

En la germinación de semillas de algunas cactáceas han aparecido mutantes albinos, por ejemplo en *Ferocactus histrix* el 0.1% de las plántulas fueron albinas (del Castillo, 1986). Un caso sobresaliente de mutaciones en plántulas es el de *Gymnocalycium mihanovichii*, que no tienen clorofila, pero que presentan diferentes colores (rojo, amarillo, naranja, morado, entre otros); y para que sobrevivan, tienen que injertarse sobre un patrón que les aporte todo

lo necesario para su crecimiento y desarrollo (Pilbeam, 1995). Los mutantes aclorofilicos de *Gymnocalycium* injertados se venden como plantas ornamentales por millones.

El albinismo es un fenómeno que se presenta en el reino vegetal y el reino animal. Los mutantes albinos en su mayoría son causados por un alelo recesivo que en condición homocigota trae como consecuencia la ausencia total o parcial de pigmento, clorofila en el caso de las plantas o melanina en los humanos. Por lo general, estos genes son llamados genes blancos y abreviados con la letra "w".

En el maíz el albinismo se ha estudiado ampliamente, existe la serie de genes "w", y en las plántulas portadoras de w1 y w2 en condición homocigota presentan una reducción en el ADN plastídico; w3, w11, w14, w16 y w17 generan plántulas con poca coloración verde; sin embargo, con poca luz se bloquea la síntesis de carotenoides; los genes w1 y w15 son letales debido a la incapacidad de convertir la protoclorofilida en clorofilida; w18 y w19 se expresan como plántulas de color verde pálido, con rayas de color blanco. Existe otro grupo de genes llamado "white luteus" (wlu por su abreviatura en inglés) entre ellos se encuentran; wlu1, wlu3 y wlu5 que son letales, pero las plántulas presentan un color amarillo pálido o varía de amarillo a blanco, y wlu2 se manifiesta como plántulas blancas con nervaduras de color amarillo a verde (Neuffer *et. al.*, 1997).

El albinismo también se ha encontrado en plántulas obtenidas mediante el cultivo de anteras y micro esporas de otros cereales, interfiriendo en el proceso para obtener dobles haploides (DHs)(Muñoz, 2007).

Archibald Garrod en 1908, describió por primera vez la base genética del albinismo como una condición que se heredaba como un carácter autosómico recesivo; es decir, que el individuo debe recibir dos copias de la mutación albina, una de cada progenitor (Pierce,

2009). Otros autores describen que el plástido es la principal estructura involucrada en el albinismo, que en cereales su genoma tiene un tamaño de 135-140 Kb y codifica: unos 70 polipéptidos, 30 ARNt, y los ARNs estructurales de los ribosomas plastídicos (Hiratsuka *et.al.*, 1989; Maier *et al.*, 1995). Diversos estudios moleculares en cereales concluyeron que generalmente el albinismo se asociaba con deleciones en el genoma del plástido (Day y Ellis 1984 y 1985; Dunford y Walden 1991; Harada *et. al.*, 1991; Muñoz, 2007). Sin embargo, otros investigadores demostraron mediante cruzamientos recíprocos que el control del albinismo es nuclear (Tuveesson *et. al.*, 1989; Larsen *et. al.*, 1991) y que se han encontrado plantas albinas con un genoma plastídico sin deleciones (Hofinger *et. al.*, 2000).

El Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, lleva a cabo desde los años 60 un proyecto de mejoramiento genético del nopal para la producción de fruta y verdura, y ha liberado variedades para la producción de fruta (‘Copena 5’), verdura, (‘Copena V1’) y forraje (‘Copena F1’); recientemente ha obtenido una variedad de *Opuntia* robusta para la producción de nopalitas de color morado ‘CP-Tepemor’ (Livera, 2016, comunicación personal). El objetivo del presente trabajo fue germinar semillas de ‘CP-Tepemor’, hacer un seguimiento de la dinámica de la germinación y seleccionar plántulas con pigmentación morada que sean la base de futuras variedades de nopalitas con este color, y evaluar la variabilidad genética de las plántulas con microsatélites.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el Municipio de Texcoco, Estado de México.

En 2015 se autofecundaron flores de 'CP-Tepemor' y a los frutos se le extrajo la semilla para emplearla en este experimento. Se seleccionaron semillas bien desarrolladas que se sometieron a una escarificación química, utilizando ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) al 98% durante 5 minutos con agitaciones constantes; transcurrido el tiempo se neutralizó el ácido con bicarbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ) y agua. Neutralizado el ácido se lavaron con agua a corriente y se dejaron secar por una hora para posteriormente sembrar y/o almacenar.

El experimento consistió en la siembra de 1100 semillas en cada una de las tres fechas.

La siembra se realizó en charola de 50 por 50 cm utilizando como sustrato turba. Las fechas de siembra fueron el 2 de febrero, 18 de marzo y 21 de mayo de 2016. Los riegos se realizaron cada dos o tres días cuidando que la humedad fuera adecuada para la germinación.

Se realizó un conteo diario de las plántulas que emergieron hasta los 40 días después de la siembra. Se observó que emergieron diferentes tipos de plántulas: de color verde, morado, rosa y bicolor (con hojas cotiledonales de colores verde y rosa). Por lo anterior el conteo se realizó por tipo o clase de plántula. También se observó que las plántulas rosas morían, y se les midió el tiempo de vida (días).

Con estos datos se realizó una gráfica de la dinámica de germinación y de la mortalidad de las plántulas.

Para la evaluación de la variabilidad genética de las plántulas obtenidas de la germinación, se extrajo el ADN de cuatro plántulas de cada clase y del progenitor 'CP-Tepemor'. Se tomaron 200 mg de tejido de cladodios recién emergidos de 'CP-Tepemor'; de las plántulas, debido a no alcanzaban el peso de 200 mg, se tomaron enteras para extraerles el ADN. Se utilizó el Kit comercial ChargeSwitch® gDNA Plant, Invitrogen, con adecuaciones que consistieron en agregar 800 µL de Lisis y 100 µL de reactivo A antes de macerar y 100 µL de Lisis y 100 µL de reactivo A después de haber macerado, se utilizó el robot de extracción King Fisher Flex®, ThermoScientific. La cuantificación del ADN se realizó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000, ThermoScientific, de ultra-bajo volumen, con lecturas de absorbancia en 260 y 280 nm.

Se realizó amplificación por PCR (Mullis, *et al.*, 1990) utilizando 26 microsatélites seleccionados con base en los resultados de Helsen *et al.* (2007), Caruso *et al.*, (2010), Erre *et al.*, (2011), Chessa *et al.*, (2013) y Samah *et al.* (2016) y etiquetados con fluorescencia 6-FAM, ROX o HEX en el extremo 5', como se muestra en el Cuadro 1, para su detección en el secuenciador de ADN.

La amplificación por PCR se realizó con un Termociclador BIORAD modelo C1000 Thermal Cycler de manera multiple por lo que fue necesario agrupar los iniciadores (Cuadro 1) principalmente por temperatura, tamaño de fragmentos y la fluorescencia con la que fueron etiquetados, y consistió en 25 µL de volumen final que contenían 20 ng de ADN genómico, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X Taq Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 1 U de Taq polimerasa, 10 pMol de cada primer. El protocolo de amplificación fue de una desnaturalización inicial de 12 min a 95 °C, 35 ciclos que consistieron en: desnaturalización 60 s a 95 °C, alineamiento 60 s a 52-58.8 °C (Cuadro 1), extensión de 90 s a 72 °C; por último una extensión final de 12 min a 72 °C.

Una vez realizada la PCR, los productos fueron analizados por electroforesis capilar en un secuenciador de ADN (Genetic Analyzers ABI® 3130, Applied Biosystems), utilizando LIZ-500 como marcador interno de peso molecular. La lectura de los electroferogramas se realizó con el software GeneMapper® V 4.0.

Los resultados obtenidos con GeneMapper® V 4.0 fueron procesados con el paquete estadístico Polysat, utilizado para el análisis de resultados obtenidos de especies poliploides y que funciona bajo el ambiente R (Clark y Jasieniuk, 2011); se generó una matriz de presencia y ausencia para posteriormente realizar un análisis de las frecuencias alélicas con el programa InfoGen/E V 2014 y comparar las similitudes o diferencias en cuanto al patrón expresado, generándose un fenograma con el coeficiente de Dice ( $S_D$ ) (Dice, 1945) y Nei-Li (1979).

**Cuadro 1. Microsatélites (SSR's) empleados para la amplificación por PCR.**

Grupo	Primer/Locus	T°C	Tamaño de fragmento (pb)	Iniciador hacia adelante//Iniciador en reversa
1	Opufic04	58.8	196-218	[ROX]TGCAGTCAGGTTTCTCATTGTC//GCCCAACTCTTACCCTCTCC
	Opufic17	58.8	158-181	[6-FAM]ATGGATCGTCTTCGTCCCTG//GATGTCACCCCATTCCATTCC
	Opuntia1	58.8	100-126	[HEX]CCATCTACTTCCCACCTTTCG//CTCCTGTGTTTCTCTGTGCTC
	Opuntia5	58.8	352-367	[HEX]TATGCACAAAGCACCATGC//CCAACCATACCAACTGTAAGTAC
2	Opufic13	56.7	138-190	[HEX]GGGCTTTCAACGATGCTG//AAGACATAGGTTGGAGACTCAATTCC
	Opuntia9	56.7	147-185	[ROX]CTAGGCTTCATCCCACATTAGG//TCCAAATTCACCTCCTCTGC
	Opuntia13	56.7	247-301	[ROX]CCAAATACCCAGCCCATAC//CGAGAACCTAACTCCGATG
	Opuntia16	56.7	322-350	[6-FAM]GTCAATCCCGAGCAATTTAGG//CTCATTAGTGAGGCCCAACG
3	Opufic03	56.7	134-162	[HEX]GCTTTGAAATGTCTTGTGTGAATG//AGTCCTGGGAATCCTCAACC
	Opuntia8	56.7	136-178	[ROX]ACCGCCATCACCAGCTATC//CTCACCCACAATTCCAAACC
	Opuntia10	56.7	191-247	[6-FAM]ACCAACATCAAACCTTCAATACC//CATGCTTCATCTTGTTTCATTGG
	Opuntia15	56.7	343-357	[6-FAM]GCGGTGGAAGCAGTTAGG//TCAGTCGATCATACCCAAGG
4	Opufic14	56.0	162-262	[ROX]AATTGACCTCTTACGTTATGC//GAGAAAGTGAGGCAGACAACG
	Opuntia3	56.0	317-344	[ROX]GTGAGTGCCAGATGAAACT//TCCTCAACTTTATTGTAGCAAGAG
	Opuntia11	56.0	110-138	[6-FAM]CCTACACCTGCTGCCAATC//CGAGACAAACATCAGAGGAG
5	Opufic10	55.5	213-250	[6-FAM]GCTTCCTTCAATAGCATGACC//TGAGGCTTTACATGGCACAC
	Opuntia12	55.5	226-294	[HEX]TAATCTTATTCTCAGGTCAGTTAC//GGTATCTTGTTATTCGTTCCG
6	Opufic01	56.2	147-178	[HEX]TGGGTGAGACAATATAGTAGACCAAG//CTGCCGTGAAATCTGAATGG
	Opufic16	56.2	110-153	[6-FAM]TCCCATGCTTCAGTTTTGTTC//GCCGGAATTCGTTATCAGTG
7	Opufic09	56.2	182-236	[ROX]GGCAATACCCTGAGTTGAGC//CCTGAGACTACAGCGTGAGGA
	Opufic15	56.2	182-213	[HEX]TTAAACCTGCACACCATTTCG//GTGTGAGGCGAGGTTGCTC
	Opuntia21	56.2	75-144	[6-FAM]AAAGGGAAGACCTTGCTCTC//TCTATTCTCAGCCCTCCTCTC
8	Opuntia 2	55.2	211-258	[6-FAM]CACATACGCAAATACATGG// GCTTCATTTTCCAGGTTACT
	Opuntia 6	55.2	127-152	[6-FAM]ATCTCATTGTATCATCTATTTCTG//AGCACAAAGACACTTCATCG
9	Opuntia 4	53.5	105-152	[ROX]GATGATTCCGCCATTACCC// CGTCGATCTGACTCACACC
	Opuntia 14	53.5	206-258	[6-FAM]TCAGGATTCAAGAAGATTTGC//CGATTCAATTGATGATGGGC

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se observa la dinámica de la emergencia de las tres fechas de siembra. Con el tratamiento de escarificación dado, la emergencia inicio entre los días 10 y 15. El promedio de emergencias de las tres fechas de siembra hasta los 40 días fue de 51% aproximadamente, resultados que concuerdan con otros trabajos, por ejemplo; Olvera *et al*, (2003), reportó que en *Opuntia tomentosa* el 50 % de la germinación se alcanzó alrededor de los 45 días. Esto se debe posiblemente a que no se realizó ningún tratamiento de estratificación, y como mencionan Morpeth y Hall (2000), las semillas presentan dos tipos de latencia, que les funciona como un mecanismo de supervivencia. Se observó que después de los 40 días seguían emergiendo plántulas, aunque a un ritmo más lento

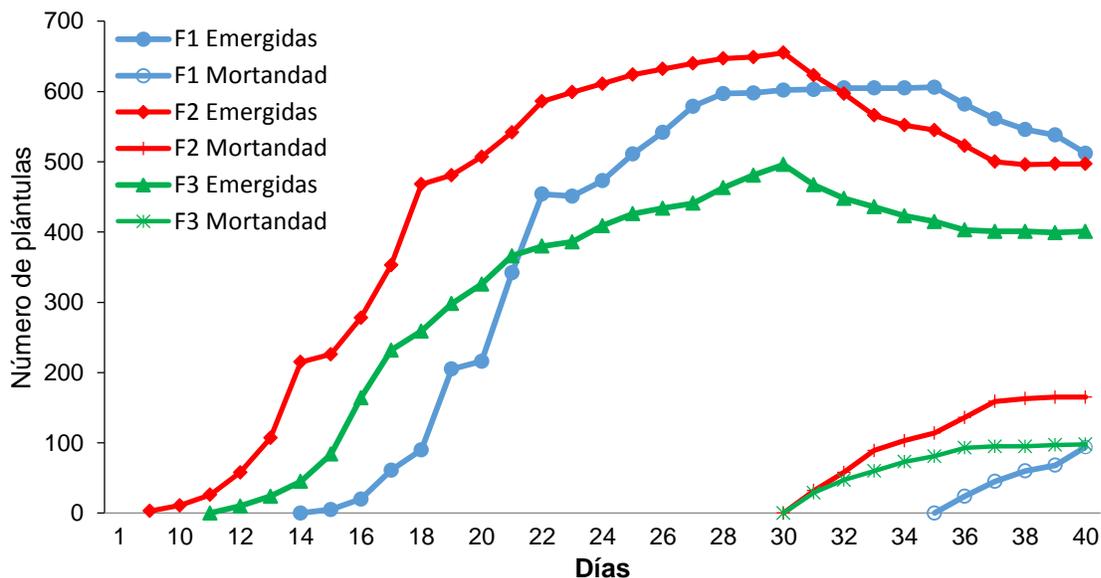


Figura 1. Dinámica de la emergencia y mortalidad de plántulas de 'CP-Tepemor' por fecha de siembra.

‘CP-Tepemor’ presentó una gran variabilidad genética en las plántulas, (Figura 2); emergieron plántulas con cotiledones de color verde, morado, rosa (varias intensidades) y bicolor (rosa y verde) (Figura 4). En las plántulas rosas se observó que a partir de los 15 días después de la emergencia se marchitaban y comenzaban a morir progresivamente (Figura 1 y Figura 3), fenómeno que se atribuye a que son plántulas mutantes que no presentan clorofila y que mueren una vez que se terminan las sustancias de reserva en los cotiledones. Existen plantas que presentan incapacidad para producir cloroplastos y así llevar a cabo el proceso de fotosíntesis, fenómeno conocido como albinismo (Makowska y Oleszczuk, 2014), razón por la cual las plántulas rosas se consideran albinas.



**Figura 2. Diversidad genética de colores que presentaron las plántulas entre los 8 y 15 días después de la emergencia.**

El Cuadro 2 muestra el conteo y la frecuencia relativa por categoría de las plántulas; los resultados fueron consistentes en las tres fechas de siembra, observándose la misma tendencia en la segregación y en el porcentaje de plántulas albinas (rosas), que fue mayor a 25%, frecuencia que es alta en comparación con otras cactáceas donde se ha reportado albinismo; por ejemplo, en *Ferocactus histrix* cerca del 0.1 % de las semillas producen embriones que al germinar dan lugar a plántulas albinas (del Castillo, 1986).

**Cuadro 2. Frecuencias relativas de las clases de plántulas obtenidas de semillas de 'CP-Tepemor'.**

Tipo de plántula	Fecha 1		Fecha 2		Fecha 3	
	Numero de plántulas	Frecuencia relativa	Numero de plántulas	Frecuencia relativa	Numero de plántulas	Frecuencia relativa
Verdes	387	0.64	402	0.61	252	0.61
Rosas	154	0.25	197	0.30	109	0.26
Moradas	57	0.09	54	0.08	46	0.11
Bicolores	8	0.01	9	0.01	5	0.01
Total	606	1	662	1	412	1

Diversos científicos han trabajado para descubrir las causas del albinismo. El maíz tiene dos series de genes, una de llamados genes blancos (White, w) y la otra "white luteus" (wlu). El albinismo también se presenta en otros cereales como el trigo (Liu *et. al.*, 2002), centeno (Immonen y Anttila, 2000), triticale (Oleszczuk *et. al.*, 2004), y Cebada (Careda y *et. al.*, 2004), entre otros; destacando su presencia en el cultivo de anteras para generar dobles haploides (Makowska y Oleszczuk, 2014); en el caso de estos cereales el albinismo se atribuye a deleciones en el genoma del plastidio (Day y Ellis 1984 y 1985; Dunford y Walden

1991; Harada *et. al.*, 1991; Muñoz, 2007). En contraste, otros investigadores demostraron mediante cruzamientos recíprocos que el control del albinismo es nuclear (Tuveesson *et. al.*, 1989; Larsen *et. al.*, 1991), ya que se han encontrado plantas albinas con un genoma plastídico sin deleciones (Hofinger *et. al.*, 2000).

Makowska y Oleszczuk (2014), mencionan que las investigaciones para entender el fenómeno del albinismo se deben centrar en tres áreas; la citología, la genómica de plastidios y en el genoma nuclear.

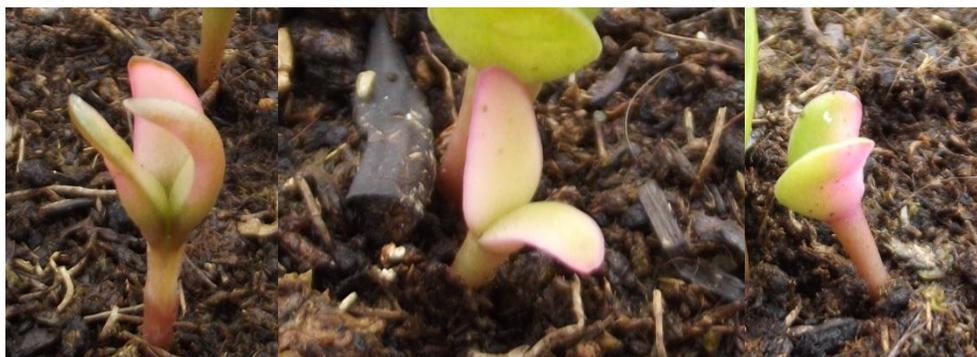
Por todo lo anterior, las plántulas rosas encontradas en este trabajo se consideran albinas, quedando pendiente investigar sus causas.



**Figura 3. Marchitamiento y mortalidad de las plántulas albinas. A: plántula normal, B: Plántula albina marchita, C: Plántula albina muerta, 20 días después de la emergencia y D: plántula color morada, a los 20 días.**

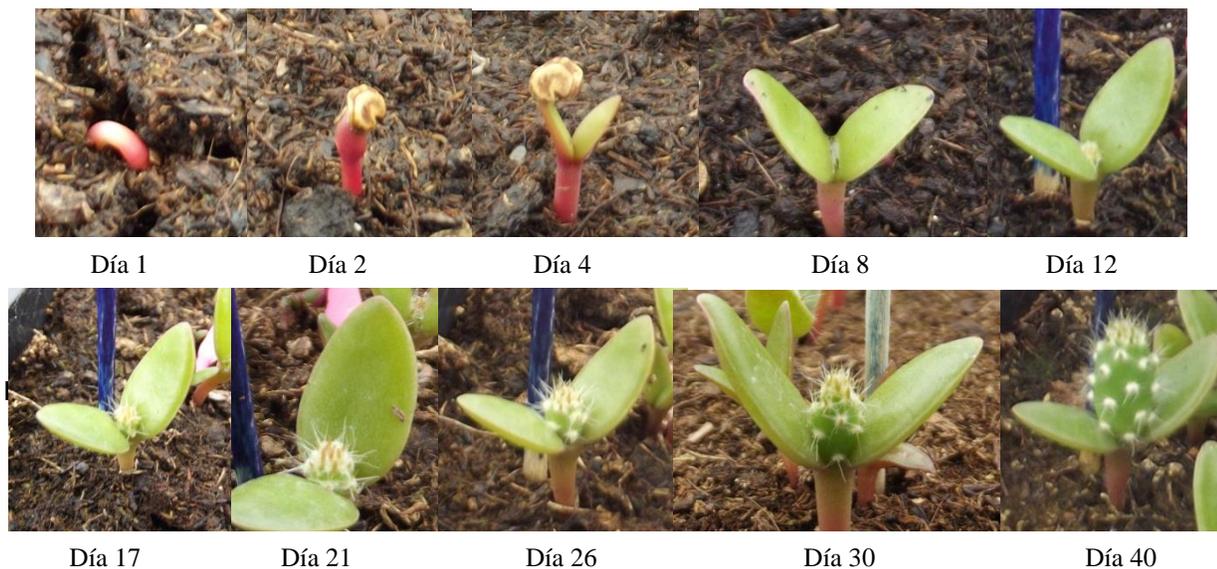
En cuanto a las plántulas de color morado se encontró que su crecimiento fue más lento, comparado con el de las plántulas de color verde; se veían pequeñas y con un crecimiento pobre (Figura 3). Este fenómeno fue desapareciendo con el avance de los días.

Otro fenómeno más que se observó fue la presencia de plántulas bicolors que tenían color rosa y verde en los cotiledones, y entre estas se encontraron plántulas con tres cotiledones (Figura 4).



**Figura 4. Plántulas bicolors obtenidas de la germinación de semillas de 'CP-Tepemor'.**

Por último, se estableció la cronología de las principales etapas de crecimiento de las plántulas (Figura 5) hasta los 40 días después de la emergencia.



**Figura 5. Cronograma de las diferentes etapas de crecimiento de plántulas normales de 'CP-Tepemor'.**

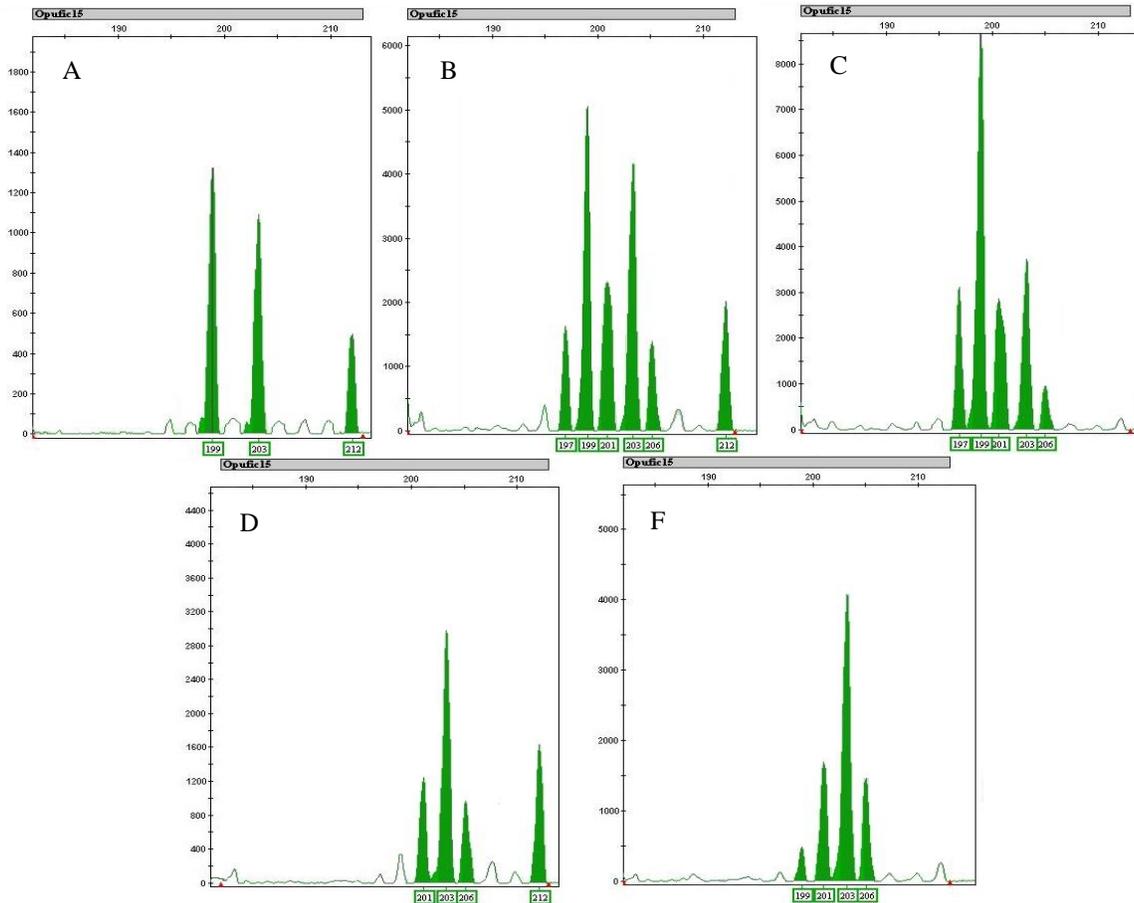
El ADN extraído con el Kit comercial tuvo un rendimiento que osciló entre 16.48 y 284.9  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , y la relación de la absorbancia  $\text{DO}_{260/280}$  vario de 1.60 a 1.97 como se muestra en el Cuadro 3, resultados que indican cantidad, calidad y pureza apropiados para los objetivos de la investigación.

Se observa que en algunas plántulas el rendimiento de ADN fue bajo, como es el caso de “Rosa 3” que tuvo el rendimiento más bajo ( $16.48 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ); sin embargo, fue suficiente para la amplificación por PCR, ya que el protocolo necesita un mínimo de  $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ; esto se atribuye a la corta edad y tamaño pequeño de las plántulas, que están integradas por la raíz, hipocótilo y cotiledones.

**Cuadro 3. Concentración de ADN y relación de absorbancias 260/280.**

<b>Genotipo</b>	<b>Concentración ADN (<math>\text{ng}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Absorbancia 260/280</b>
TepeMor	284.9	1.82
Verde 1	60.44	1.73
Verde 2	54.39	1.81
Verde 3	74.45	1.81
Verde 4	85.37	1.86
Morada 1	64.15	1.76
Morada 2	70.9	1.72
Morada 3	93.84	1.85
Morada 4	73.2	1.74
Rosa 1	35.45	1.71
Rosa 2	27.93	1.78
Rosa 3	16.48	1.60
Rosa 4	38.16	1.77
Bicolor 1	77.01	1.81
Bicolor 2	33.57	1.68
Bicolor 3	56.11	1.84
Bicolor 4	67.53	1.97

La calidad y pureza del ADN se corroboró con PCR y electroforesis capilar. En la Figura 6 como ejemplo, se presentan los resultados obtenidos con el iniciador Opufic 15 en 'CP-Tepemor' y cuatro plántulas, una de cada clase.



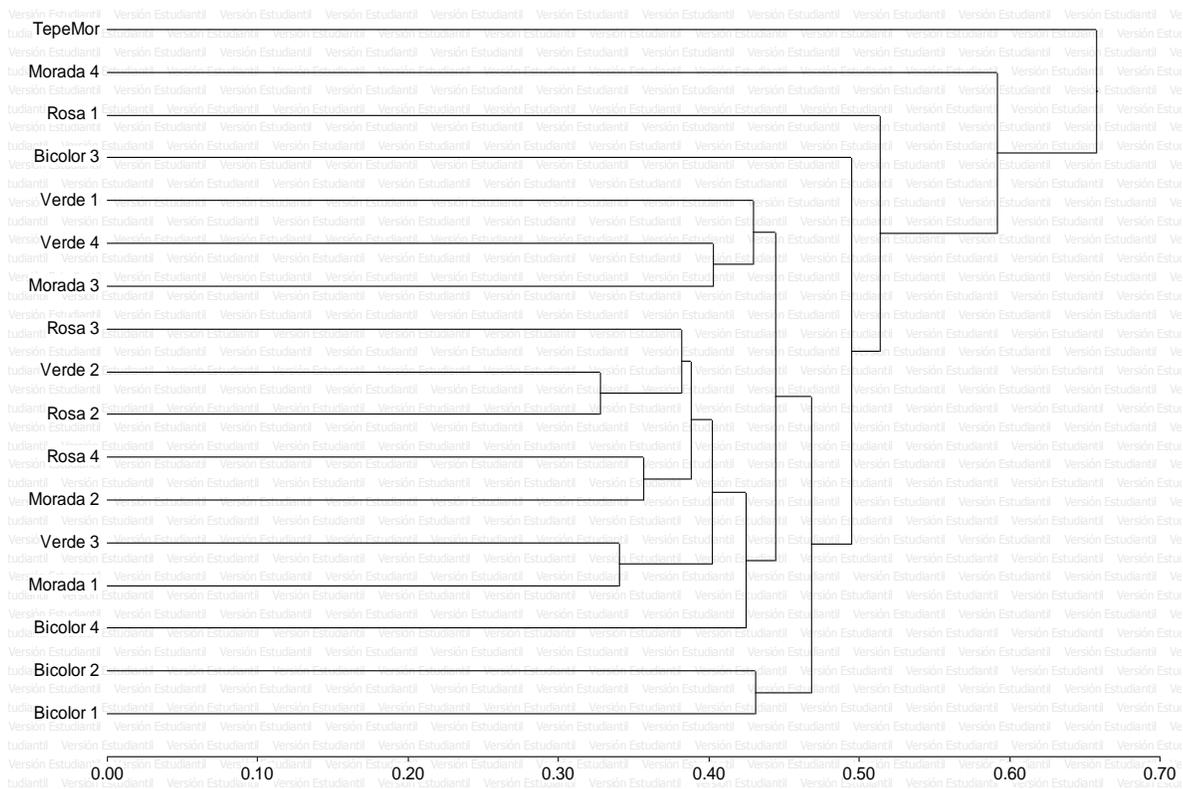
**Figura 6. Electroferogramas obtenidos con Opufic 15. A: 'CP-TEPEMOR', B: plántula verde, C: plántula morada, D: plántula albina y E: plántula bicolor.**

En el Cuadro 4 se muestra la similitud que existe entre cada uno de los individuos y su progenitor, 'CP-Tepemor', calculados con el índice de Dice. La similitud que existe entre 'CP-Tepemor' y su progenie es mayor al 50% lo que se explica por ser plántulas provenientes de autofecundación.

**Cuadro 4. Índice de similitud de Dice de 16 plántulas y su progenitor CP-Tepemor.**

	CP- Tepemor	V. 1	V. 2	V. 3	V. 4	M. 1	M. 2	M. 3	M. 4	R. 1	R. 2	R. 3	R. 4	B. 1	B. 2	B. 3	B. 4
CP- TepeMor	0.00																
Verde 1	0.65	0.00															
Verde 2	0.65	0.45	0.00														
Verde 3	0.67	0.45	0.39	0.00													
Verde 4	0.65	0.42	0.43	0.40	0.00												
Morada 1	0.66	0.42	0.42	0.34	0.43	0.00											
Morada 2	0.69	0.42	0.40	0.38	0.44	0.41	0.00										
Morada 3	0.68	0.44	0.50	0.47	0.40	0.48	0.42	0.00									
Morada 4	0.72	0.59	0.56	0.58	0.56	0.58	0.58	0.59	0.00								
Rosa 1	0.70	0.49	0.53	0.46	0.48	0.52	0.51	0.51	0.63	0.00							
Rosa 2	0.63	0.35	0.33	0.41	0.42	0.38	0.40	0.48	0.58	0.54	0.00						
Rosa 3	0.62	0.49	0.39	0.41	0.40	0.40	0.40	0.44	0.55	0.47	0.38	0.00					
Rosa 4	0.63	0.45	0.37	0.39	0.42	0.44	0.36	0.47	0.60	0.45	0.39	0.37	0.00				
Bicolor 1	0.61	0.46	0.45	0.47	0.40	0.44	0.50	0.52	0.61	0.55	0.42	0.45	0.49	0.00			
Bicolor 2	0.68	0.50	0.49	0.44	0.41	0.43	0.52	0.47	0.62	0.55	0.47	0.42	0.51	0.43	0.00		
Bicolor 3	0.66	0.50	0.52	0.49	0.47	0.43	0.49	0.54	0.66	0.61	0.50	0.50	0.51	0.49	0.50	0.00	
Bicolor 4	0.65	0.49	0.41	0.43	0.44	0.44	0.44	0.53	0.60	0.52	0.47	0.41	0.39	0.49	0.53	0.50	0.00

En la Figura 7 se muestra el fenograma generado con el índice de Dice, y se puede observar que de 'CP-Tepemor' se generan los demás grupos lo que demuestra que es progenitor de los 16 individuos; sin embargo, entre los 16 individuos de la progenie no existe una correlación directa con el agrupamiento de las clases generadas fenotípicamente. Estos resultados no se pueden comparar con trabajos similares, ya que las investigaciones con marcadores moleculares se han enfocado al estudio de la diversidad genética intra e interespecifica, pocos son los que evalúan la progenie respecto a sus progenitores como los de Mondragon y Bordelon (2002) que emplearon RAPD y Pacheco (2013) que utilizó ISSR, en ambos casos para identificar apomixis en etapas tempranas de desarrollo.



**Figura 7. Fenograma generado a partir de cálculo de distancias fenéticas mediante el coeficiente de Dice.**

Los resultados encontrados muestran que es posible la selección de genotipos de color morado para la generación de nuevas variedades de nopalitos y los genotipos albinos potencialmente se pueden utilizar para desarrollar nopales ornamentales injertados, como en el caso de otras cactáceas que producen mutantes aclorofílicos como en *Gymnocalycium mihanovichii*, (Pilbeam, 1995).

Por otro lado, es necesario realizar otros estudios con un mayor número de marcadores y de plántulas, para conocer el fenómeno del albinismo en *Opuntia robusta*.

## CONCLUSIONES

- 1) La progenie de 'CP-Tepemor' obtenida por autofecundación produjo una gran diversidad genética en el tipo de plántulas.
- 2) Se obtuvieron plántulas moradas que se consideran necesarias para la selección y obtención de variedades productoras de nopalitos con este color.
- 3). Las plántulas de color rosa son albinas ya que mueren al agotarse las reservas acumuladas en la semilla.
- 4). La frecuencia de plántulas albinas fue del 25 al 30% del total de plántulas emergidas, superior a la de las plántulas moradas (8 al 11%).
- 5). Se comprueba molecularmente que existe gran diversidad genética en la progenie de 'CP-Tepemor' obtenida por autofecundación.
- 6). La caracterización molecular de las plántulas no correspondió con la clasificación fenotípica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bregman R. and F. Bouman (1983).** Seed germination in Cactaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 86:357-374.
- Caredda S., P. Devaux, R. S. Sangwan, I. Proutt and C. Clément (2004).** Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 76:35–43.
- Caruso M., S. Currò, G. Las Casas, S. La Malfa and A. Gentile (2010).** Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Plant Systematics and Evolution*. 290:85-97.
- Clark L. V. and M. Jasieniuk (2011).** Polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*. 11: 562-66.
- Day A. and T. H. N. Ellis (1984).** Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell* 39: 359-368.
- Day A. and T. H. N. Ellis (1985).** Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Current Genetics* 9: 671-678.

- Delgado S. P., M. A. Ortega A., A. A. Rodríguez H., J. F. Jiménez B. and J. Flores (2010).** Further evidence from the effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signal Behav.* 5(10): 1229–1230.
- Dice L. R. (1945).** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26 (3): 297-302.
- Dunford R and R. M Walden (1991).** Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Current Genetics.* 20: 339-347.
- Egley G. H., (1993).** Water impermeable seed coverings as barriers to germination. In: Taylorson, R. B., (Ed.), *Recent Advances in the Development and Germination of Seeds.* Plenum Press, New York, NY. 295 pp.
- Erre P., G. Nieddu and I. Chessa (2011).** Identification of microsatellite loci in *opuntia* spp. and their characterization in cultivars and species. *Acta Horticulturae.* 918, ISHS.
- Gallegos V. C. y C. Mondragón J. (2011).** Cultivares selectos de tuna, de México al Mundo. Ed. Chapingo. México.159p.
- Guzmán U., S. Arias S. y P. Dávila (2003).** Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 315 p.
- Harada T., T. Sato, D. Asaka and I. Matsukawa (1991).** Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theoretical and Applied Genetics.* 81: 157-161.

**Helsen P., P. Verdyck, A. Tye, K. Desender, N. Van Houtte and S. Van Dongen (2007).**

Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in Galapagos prickly pear (*Opuntia*) cactus species. *Mol Ecol Notes* 7:454–456.

**Hiratsuka J., H. Shimada, R. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori, C. Kondo, Y.**

**Honji, C. R. Sun, B. Y. Meng, Y. Q. Li, A. Kanno, Y. Nishizawa, A. Hirai, K. Shinozaki and M. Sugiura (1989).** The complete nucleotide sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of cereals. *Molecular and General Genetics*. 217: 185-194.

**Hofinger B. J., E. Ankele, Ch Güllý, E. F. Heberle B. and M. Pfosser M. (2000).**

The involvement of the plastid genome in albino plant regeneration from microspores in wheat. In: Bohanec B. (ed.) Biotechnological approaches for utilization of gametic cell. COST 824 final meeting, Bled, Slovenia, pp 215-228.

**<http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola>**

**Immonen S. and H. Anttila (2000).**

Media composition and anther plating for production of androgenetic green plants from cultivated rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Plant Physiology*. 156:204–210.

**Larsen E. T., I. K. D. Tuvešson and S. B. Andersen (1991).**

Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 417-420.

- Liu W., M. Y. Zheng, E. A. Polle and C. F. Konzak (2002)** Highly efficient doubled-haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Science*. 42:686–692.
- Maier R. M., K. Neckermann, G. L. Igloi and H. Kössel (1995)**. Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content hotspots of divergence and fine tuning of genetics information by transcript editing. *Journal of Molecular Biology* 251: 614-628.
- Makowska K. and S. Oleszczuk (2014)**. Albinism in barley androgénesis. *Plant Cell Reports*. 33:385–392
- Molina Galán J. D. (1992)**. Introducción a la Genética de Poblaciones y Cuantitativa. AGT Editor. 349 p.
- Mondragon J. C. y B. Bodelon (2002)**. Presencia de apomixis en cruas de nopales mexicanos y su identificación molecular preliminar. *Revista Fitotecnia Mexicana*.25 (3): 247-252.
- Mondragón J. C. and E. Pimienta B. (1995)** Propagation. *In*: Barbera, G., Inglese P., and Pimienta B. E. (eds.). Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. pp. 64-70.
- Morpeth D. R. and A. M. Hall (2000)**. Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* 'Laxa'. *Seed Science Research*. 10:489-494.
- Mullis K. B. (1990)**. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Sci Am*. 262(4), 56- 61, 64-55.

- Muñoz-Amatriaín M. (2007).** Control genético y variación transcripcional de la embriogénesis de la microspora en cebada. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Zaragoza, España.
- Nei M., and W. H. Li (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(10), 5269–5273.
- Neuffer M. G., S. R. Wessler, and E. H. Coe (1997).** Mutants of maize. Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U. S. A. 325-388.
- Ochoa M. J., L. M. González F, J. M. Cruz R., L. Portillo and J. F. Gómez L. (2015).** Effect of substrate and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 17:50-60.
- Oleszczuk S., S. Sowa and J. Zimny(2004).** Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant cell reports*. 22:885–893.
- Pacheco A. M. A. (2013)** . Discriminación de plantas de origen sexual de nopal obtenidas de hibridaciones de tunas mexicanas (*Opuntia* ssp.) Mediante la técnica ISSR. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis. 68 p.
- Pierce B. A. (2009).** Genética: Un enfoque conceptual. Ed. Médica Panamericana. New York, USA. 832 p
- Pimienta B. E. (1990)** El Nopal Tunero. Colección Tiempos de Ciencia. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 246 p.

- Pilbeam J. (1995)** *Gymnocalycium: A collector's guide*. A A Balkema. USA. 191 p.
- Potter R. L., J. L. Petersen and D. N. Ueckert D. N. (1984)** Germination responses of *Opuntia* spp. to temperature, scarification and other seed treatments. *Weed Science*, 32:106-110.
- Rojas A. M. and C. Vazquez Y. (2000)** Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44:85-104.
- Turesson I. K. D., S. Pedersen and S. B. Andersen (1989)**. Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics* 78: 879-883.
- Vidican T. L., D. Cachiță C. and J. E. Romocea (2009)**. The initiation of *Echinocactus mihanovichii*, *Echinopsis chamaecereus* f. lutea and *Aylostera heliosa* vitrocultures. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș", Seria Științele Vieții*. 19:351-357.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos muestran:

- 1) En el género *Opuntia* existe una gran diversidad genética.
- 2) No existe una correspondencia entre la caracterización molecular y la caracterización morfológica.
- 3) Se identificó por primera vez el fenómeno del albinismo en *Opuntia robusta*.