

**Análisis de la diversidad genética de 21
accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.)
utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter-
microsatélites)**

Pablo Roberto Vargas Ribera

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2011

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Análisis de la diversidad genética de 21
accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.)
utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter-
microsatélites)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Pablo Roberto Vargas Ribera

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2011

Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter microsatélites)

Presentado por:

Pablo Roberto Vargas Ribera

Aprobado:

Renán Pineda, Ph.D.
Asesor Principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Carrera de Ingeniería Agronómica

Estela Aguilar, M.Sc.
Asesora

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Marcelino Guachambala, Ing.
Asesor

RESUMEN

Vargas Ribera, P. R. 2011. Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter-microsatélites). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 20 p.

Actualmente, el mundo se enfrenta a una creciente crisis energética ya que los combustibles fósiles, fuente principal de energía en la actualidad, se están agotando. En respuesta a esta crisis, se han iniciado investigaciones en fuentes alternativas de energía como los biocombustibles, fuente energética derivada de la fijación biológica de carbono. El biodiesel es un biocombustible de primera generación que puede ser producido a partir de la trans-esterificación de ácidos grasos y cuya composición final es similar a la del diesel mineral. El piñón (*Jatropha curcas* L.) ha demostrado ser un popular candidato ya que tolera condiciones severas como suelos poco fértiles y baja cantidad de agua disponible, además se puede cultivar en zonas donde otros cultivos no subsistirían, dando así un uso productivo a esas tierras. El presente estudio analizó la diversidad genética de 21 accesiones de piñón presentes en la colección de la E.A.P. Zamorano. Se utilizaron diez marcadores moleculares de tipo ISSR elaborados por la Universidad de Columbia Británica. Se encontró un total de 74 bandas polimórficas. El porcentaje de polimorfismos promedio fue de 34%; sin embargo, el marcador UBC 810 presentó un 67%. El promedio de contenido de información de polimorfismos (PIC por sus siglas en inglés para Polymorphism Information Content) fue de 0.48 indicando una buena variación de polimorfismos. Estos resultados muestran un reducido rango de polimorfismos. El coeficiente de similitud de Dice varió de 0.000 a 0.990. Se obtuvo un dendrograma basado en el coeficiente de Dice, el algoritmo UPGMA y el método SHAN, el cual mostró las relaciones existentes entre 18 accesiones estudiadas. Las accesiones provenientes de Honduras (JC1), El Salvador (JC8, introducida de la India) y del Brasil (JC14) se agruparon en el Grupo 1 (G1). En el grupo 2 (G2) se ubicaron las restantes accesiones divididas en cuatro subgrupos. La accesión JC16 quedó aislada en el subgrupo G2.1 al ser una especie diferente, *Jatropha gossypifolia* L. El análisis de correspondencia (PCA por sus siglas en inglés para Principal Component Analysis) presentó una agrupación congruente con la observada en el dendrograma. Al analizar el coeficiente de Dice y el dendrograma a partir del algoritmo UPGMA y el método SHAN se observó una baja diversidad genética.

Palabras clave: Coeficiente de Dice, PCA (Principal Component Analysis), PCR (Polymerase Chain Reaction), UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros y figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	16
5. RECOMENDACIONES.....	17
6. LITERATURA CITADA.....	18

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros		Página
1.	Procedencia de 21 accesiones de <i>Jatropha curcas</i> L. del Banco de Germoplasma de la E.A.P. Zamorano	4
2.	Protocolo de PCR para marcadores ISSR	5
3.	Perfil térmico de la PCR para marcadores ISSR	6
4.	Lista de primers ISSR utilizados	6
5.	Concentraciones de ADN obtenido en el proceso de extracción	8
6.	Secuencia, número de bandas amplificadas, porcentaje de polimorfismo y valor PIC de cada primer utilizado	11
7.	Matriz de similaridad de Dice de 18 accesiones de <i>Jatropha curcas</i> L ...	13
Figuras		Página
1.	Gel de calidad de ADN de las accesiones de <i>Jatropha curcas</i> L. EM: Escalera Molecular de 1 kb. 1-21: Muestras estudiadas.	9
2.	Perfil de bandas del primer UBC 808. EM: Escalera Molecular de 1 kb.	10
3.	Dendrograma de 18 accesiones de <i>J. curcas</i> L. basado en el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.	14
4.	Gráfico de Análisis de Correspondencia (PCA) de 18 accesiones de <i>J. curcas</i> L.	15

1. INTRODUCCIÓN

El piñón *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), es una especie oleaginosa nativa de México, Centro y Sudamérica que además está ampliamente distribuida en Asia y África (Fairless 2007; Jubera *et al.* 2009; Pamidimarri *et al.* 2009 a; Basha *et al.* 2009; Parawira 2010; Pamidimarri *et al.* 2009 b; Heller 1996; Pamidimarri *et al.* 2009 a; Schmook y Seralta-Peraza 1997). El género *Jatropha* comprende 160–175 especies diversas, entre las que se destacan: *J. curcas*, *J. gossypifolia*, *J. glandulifera*, *J. multifida* y *J. podagrica* (Jubera *et al.* 2008; Pamidimarri *et al.* 2009 a). Esta planta presenta hábitos de crecimiento desde arbustos perennes a árboles pequeños perennifolios de hasta 6 m de altura (Ganesh *et al.* 2008). El nombre *Jatropha* proviene de los vocablos griegos γιατρός (*iatros* en griego = doctor) y τροφή (*trofê* en griego = alimento) (Makkar *et al.* 2011; Divakara *et al.* 2009; Katembo y Gray 2007).

La actual crisis energética mundial causada por el creciente agotamiento de las reservas de combustible fósil ha promovido reconsiderar la importancia de varias especies oleosas de África, Asia y Latinoamérica como alternativas energéticas. Entre éstas, *J. curcas* ha asumido gran importancia debido a su fácil adaptación (Bártoli 2008), resistencia a sequía (viz. establecerse en regiones secas, áridas y semiáridas), relativamente bajo costo de semilla, alto contenido de aceite (44-62%) (Makkar *et al.* 1998 a y b; Martínez-Herrera *et al.* 2006), potencial para rehabilitar tierras degradadas (al adicionar materia orgánica al suelo), y capacidad para convertirse en un sustituto de algunos combustibles sin necesidad de alterar los motores existentes. Al ser una fuente de biocombustibles y no competir por terreno con cultivos edibles, alivia ligeramente la controversia del dilema de alimentos contra combustibles (Pamidimarri *et al.* 2009 a y b, Basha y Sujatha 2007). Sin embargo, esta especie se caracteriza por tener rendimientos variables e impredecibles por razones que no han sido aún identificadas, siendo este un factor limitante para el cultivo a grandes escalas y respalda la necesidad de un mejoramiento genético de la especie (Pamidimarri *et al.* 2009 a y b; Basha y Sujatha 2007). El piñón es una planta tóxica, pero algunas variedades mexicanas son conocidas como no tóxicas por presentar baja o ninguna concentración de ésteres de forbol, y pueden ser usadas para alimentación animal y humana (Martínez-Herrera *et al.* 2006). Esta especie puede ser también usada como planta medicinal (Parawira 2010; Marroquín *et al.* 1997; Gohil y Pandya 2009; IKBAL *et al.* 2009).

La caracterización genotípica usando marcadores moleculares RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar), SSR (Secuencias Simples Repetidas), AFLP (Polimorfismos de la longitud del fragmento amplificado) o ISSR (repeticiones de secuencia simple interna o repeticiones de secuencia simple anclada), se pueden utilizar para distinguir diferencias genéticas entre individuos. Los marcadores ISSR son secuencias de

microsatélites (SSR) utilizadas como primers, capaces de diferenciar rápidamente fragmentos de ADN genómico. Estos primers se componen de 15 a 20 nucleótidos con nucleótidos extras en los extremos 3' o 5' de la cadena de ADN que funcionan como anclas. Este tipo de marcador combina las ventajas de los SSRs y AFLPs aunado con la universalidad de los RAPD, ya que no se necesita conocer previamente la secuencia del genoma estudiado. Los ISSR son marcadores altamente polimórficos y han probado su utilidad en estudios de diversidad genética, filogenia, identificación de genes, mapeo genético y biología evolucionaria (Joint FAO/IAEA 2002; González y Aguirre 2007; Zietkiewicz *et al.* 1994; Reddy *et al.* 2002; Wolfe 2010; Pharmawati *et al.* 2004; Basha y Sujatha 2007; Ganesh *et al.* 2008; Cai *et al.* 2010).

Una característica importante de los marcadores moleculares es que no son afectados por el ambiente, y por ésto pueden ser utilizados en la descripción de parentales o en la identificación de variaciones genéticas entre individuos de una población, para constatar diferencias o similitudes entre los genotipos analizados (Reddy *et al.* 2002; Basha y Sujatha 2007; Guachambala y Rosas 2011; Subramanyam *et al.* 2009; Jubera *et al.* 2009). Un conocimiento pleno de la extensión de la diversidad genética de un cultivo es crítico para el éxito de un programa de mejoramiento. Los métodos tradicionales que utilizan marcadores morfológicos para establecer la diversidad y las relaciones entre accesiones son poco exactos debido a la fuerte influencia que ejerce el ambiente sobre características altamente heredables, como ser peso seco, contenido de aceite y proteína en la semilla (Heller 1996; Jubera *et al.* 2009). Por lo tanto, la caracterización de germoplasma, el análisis de la diversidad genética, la identificación de marcadores polimórficos y específicos usando marcadores moleculares neutrales proveen información confiable y consistente (Basha y Sujatha 2007; Joint FAO/IAEA 2002).

El presente estudio analiza la diversidad genética de 21 accesiones de *J. curcas* L. de la colección de la Escuela Agrícola Panamericana (E.A.P.) Zamorano, utilizando marcadores moleculares ISSR para identificar duplicados de accesiones y formar una colección núcleo de genotipos con caracteres deseables para ser utilizados posteriormente en un programa de mejoramiento genético.

En este contexto, se definieron los objetivos de este estudio: emplear la técnica de marcadores ISSR para distinguir polimorfismos entre los genotipos estudiados (se considera polimorfismo a un segmento de ADN de diferente longitud), elaborar una matriz tipo I para analizar la presencia o ausencia de polimorfismos y generar un dendrograma basado en el cálculo de las distancias genéticas utilizando el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA para analizar la diversidad genética de las accesiones.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología, de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria (CCPA), Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Se analizaron 21 genotipos provenientes de Mesoamérica y Sudamérica. De los 21 genotipos, 19 son accesiones de *Jatropha curcas* L., un genotipo de *Jatropha gossypifolia* L. y un genotipo híbrido *Jatropha curcas* × *Jatropha gossypifolia*. Los genotipos estudiados pertenecen a la colección del proyecto Evaluation of the *Jatropha curcas* Biodiesel value chain as a potential driver for rural development in Mesoamerica de Syngenta Foundation for Sustainable Agriculture. De las accesiones de *Jatropha curcas* estudiadas, ocho proceden de Honduras, dos de El Salvador, una de Nicaragua, ocho de Brasil y dos de México (Cuadro 1).

Extracción de ADN. El ADN genómico fue extraído utilizando el método Skroch *et al.* (1998) modificado de acuerdo a las facilidades del laboratorio. Se recolectaron cuatro hojas jóvenes sin su peciolo de cada genotipo y se maceraron en nitrógeno líquido utilizando un mortero y pistilo. Al producto macerado se añadieron 2 mL de buffer de extracción PEX (etil-xantogenato de potasio). Se mezcló bien hasta obtener una consistencia homogénea. El producto de cada accesión fue distribuido en cuatro microtubos de 1.5 mL cada uno. Luego se sometió el producto a baño maría a 65°C durante una hora. Las muestras se centrifugaron a 14,000 RPM durante 20 minutos para separar los restos del tejido o fase sólida del buffer con los ácidos nucleicos o fase líquida. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a microtubos nuevos evitando transferir la fase sólida. Se añadió 1 mL de una solución 6:1 de etanol:acetato de amonio 7.5 M para precipitar el ADN y ARN. Se mezcló por inversión durante 3-5 minutos y luego se dejó reposar a temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) por 30 minutos. Se centrifugó el producto a 3,000 RPM durante 15 minutos para obtener un pellet (concentrado) de ácidos nucleicos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 µL de la solución de la enzima ARNasa (100 ng/mL) y se incubó a 37°C durante una hora para digerir el ARN. Después se centrifugaron las muestras a 3,000 RPM durante 5 minutos para concentrar los restos de ARN digerido y de la enzima ARNasa. El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 1.5 µL limpio y se añadió 1 mL de una solución 10:1 de etanol:acetato de sodio 3 M y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos para que se precipite el ADN. Luego se centrifugó a 3,000 RPM durante 5 minutos para concentrar el ADN precipitado. Se descartó el sobrenadante y se limpió tres veces el pellet resultante con una solución de etanol al 70%, centrifugando a 14,000 RPM durante 15 segundos cada vez. Los pellets lavados fueron puestos en la cámara de flujo laminar y se dejó secar durante 14 horas a

temperatura ambiente (aproximadamente 24°C). Finalmente, los pellets secos se rehidrataron con 200 µL de buffer TE 0.1X a 65°C durante 15 minutos. Se realizó una prueba de calidad de ADN en un gel de 1.0% de agarosa y se cargaron 5 µL de ADN puro con 2 µL de buffer de carga.

Cuadro 1. Procedencia de 21 accesiones de *Jatropha curcas* L. del Banco de Germoplasma de la E.A.P. Zamorano.

Nro.	Accesión	Procedencia
JC1	108	Puerto Cortés, Cortés, Honduras.
JC2	111 [€]	San Pedro Sula, Cortés, Honduras.
JC3	112	Puerto Cortés, Cortés, Honduras.
JC4	Filomena [€]	Yoro, Yoro, Honduras.
JC5	Arturo Araujo	Yoro, Yoro, Honduras.
JC6	Criolla Salvadoreña [€]	El Salvador.
JC7	Brasilia [€]	Gota Verde (La Lima, Cortés, Honduras; introducida desde Brasil).
JC8	India Salvadoreña [€]	El Salvador (introducida desde India).
JC9	Tanzania	Yoro, Yoro, Honduras (introducida desde África).
JC10	Brasil de Yoro	Yoro, Yoro, Honduras (introducida desde Brasil).
JC11	Masaya	Masaya, Nicaragua.
JC12	Piñón Minas	Brasil
JC13	Malí	Brasil
JC14	Piñón 2	Brasil
JC15	Piñón 1	Brasil
JC16	Piñón Bravo [¶]	Brasil
JC17	Bravo × Malí [¥]	Brasil
JC18	Híbrido 70	Brasil
JC19	EMBRAPA	Brasil
JC20	Mexicana no tóxica	México.
JC21	Puebla	Puebla, México.

[¶] *J. gossypifolia* L.

[¥] *J. gossypifolia* × *J. curcas*.

[€] Materiales resistentes (a enfermedades y plagas y tolerantes a sequía) y de alto follaje.

Cuantificación de ADN. La cuantificación de ADN fue realizada de acuerdo al protocolo establecido por Guachambala y Rosas (2011) utilizando un fluorómetro Hoefer TK-100 calibrado con ADN estándar a 100 ng/µL. Se agregaron 2 mL de buffer de cuantificación en una cubeta de cuarzo, a la cual se añadieron 2 µL de ADN desconocido para obtener el dato de cuantificación (concentración inicial Ci).

Dilución de ADN. Una vez obtenida la concentración inicial (C_i), las muestras de ADN se diluyeron en agua ultra pura SIGMA-ALDRICH® hasta 25 ng/ μ L, para estandarizar su amplificación en la reacción de PCR. El volumen inicial de las muestras de ADN se calculó mediante la fórmula:

$$V_i = \frac{(C_f * V_b)}{(C_i - C_f)}$$

V_i = Volumen inicial.

C_f = Concentración final.

V_b = Volumen del buffer de dilución TE a 0.1 X.

C_i = Concentración inicial.

Amplificación de ADN-ISSRs por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (Müllis *et al.* 1986). Para amplificar el ADN genómico se corrieron reacciones PCR (Cuadros 2 y 3) utilizando un termociclador BIORAD CFX96 REAL TIME SYSTEM. La presencia/ausencia de polimorfismos en las muestras de ADN de las accesiones de *Jatropha* se determinó mediante diez marcadores moleculares ISSR desarrollados por la UBC (University of British Columbia) (Cuadro 4). Se decidió utilizar los marcadores desarrollados por UBC debido a que se han probado anteriormente en otros estudios (Cai *et al.* 2010, Basha y Sujatha 2007, Basha *et al.* 2009) mostrando altos porcentajes de polimorfismos. Se realizaron tres repeticiones por genotipo en cada primer utilizado para determinar la reproducibilidad de la banda.

Cuadro 2. Protocolo de PCR para marcadores ISSR.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	1X (μ L)	72X (μ L)
ddH ₂ O	NA ^ε	NA	14.75	1,062.00
PCR Buffer 5X	5X	0.07X	2.50	180.00
MgCl ₂	25 mM	0.35 mM	3.00	216.00
dNTPs	4 mM	0.06 mM	1.25	90.00
Primer	10 μ M	0.14 μ M	1.00	72.00
Taq (enzima)	5 U/ μ L ^Ω	0.07 U/ μ L	0.50	36.00
ADN templete	25 ng/ μ L		2.00	
Total			25.00	1,656.00

^ε No aplica.

X Número de reacciones.

^Ω Unidades de Taq ADN Polimerasa/ μ L.

Cuadro 3. Perfil térmico de la PCR para marcadores de ISSR.

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5'	1
Desnaturalización	94	30''	} 40
Acoplamiento	52	45''	
Extensión	72	2'	
Extensión final	72	6'	1
Mantenimiento	4	∞	

∞ infinito.

Cuadro 4. Lista de primers ISSR utilizados.

Número	Secuencia 5'-3'
UBC807	(AG)8T
UBC808	(AG)8C
UBC809	(AG)8G
UBC810	(GA)8T
UBC812	(GA)8
UBC827	(AC)8G
UBC834	(AG)8YT [¶]
UBC836	(AG)8YA
UBC840	(GA)8YT
UBC844	(CT)8RC [#]

[¶] Base pirimídica (C, T).

[#] Base púrica (A, G).

Electroforesis. Se utilizaron 6 µL de producto de PCR de cada genotipo y se separaron en geles de agarosa a una concentración de 2% para obtener mejor distinción entre bandas. El gel se elaboró utilizando el buffer de corrido TAE 1X. Una vez colocado el producto de PCR en las celdas del gel, los fragmentos de ADN amplificados se separaron a 85 V durante 1.5 horas. Se utilizaron 5 µL de escalera molecular de 1 kb (Invitrogen[®]) para estimar el tamaño de los polimorfismos amplificados en PCR. Una vez terminada la corrida electroforética, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 100 ppm diluido en agua durante 10 minutos. Luego se introdujo el gel en agua durante 20 minutos para eliminar exceso de bromuro de etidio en la tinción. Para la visualización de las bandas se utilizó un transiluminador de rayos UV marca SPECTROLINE y las fotografías se tomaron con el equipo de captura de imágenes de geles KODAK EDAS 290.

Análisis de polimorfismos. Las fotografías de los geles fueron impresas para procesar los datos usando el sistema binario (ausencia=0 y presencia del marcador=1) la cual sirvió para realizar los análisis de correspondencias. Se cargaron tres réplicas por cada accesión estudiada y se tomaron en cuenta las bandas polimórficas fuertes (mayor intensidad en brillo) y leves (menor intensidad en brillo) para la elaboración de la matriz; mientras que

las bandas borrosas fueron descartadas. Con la matriz tipo I se computó el total de polimorfismos amplificados al dividir la cantidad de bandas polimórficas obtenidas por cada primer entre el número total de bandas. El contenido de información polimórfica (PIC por sus siglas en inglés, Polymorphism Content Value) se calculó con la fórmula: $PIC = 2 \sum P_i (1 - P_i)$ donde P_i es la frecuencia de ocurrencia de bandas polimórficas en diferentes primers (Bhat 2002).

Análisis de diversidad genética. Los análisis estadísticos para observar la diversidad genética fueron realizados utilizando el paquete estadístico NTSYSpc 2.1. Se realizó una matriz de similaridad utilizando el coeficiente de Dice con el formato SIMQUAL. Los análisis para establecer las distancias genéticas en el dendrograma se hicieron por medio del algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y con el módulo SHAN (Sequential, Hierarchical, Agglomerative and Nested Clustering). Esto ayudó a mostrar la representación fenética de las relaciones genéticas reveladas por el coeficiente de similaridad de Dice (Dice 1945, Guachambala y Rosas 2011). La información binaria fue sujeta a un análisis de correspondencia o análisis de componente principal (PCA Principal Component Analysis por sus siglas en inglés) utilizando los módulos EIGEN y PROJ del programa estadístico.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción, cuantificación y dilución de ADN. La máxima cantidad de ADN extraído fue de 303.00 ng/mL en el genotipo JC12, la mínima fue de 22.33 ng/mL en el genotipo JC10 y el promedio de ADN extraído fue de 142.29 ng/mL (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentraciones de ADN obtenido en el proceso de extracción.

Nro.	Genotipo	Concentración de ADN (ng/mL)			
		C1 ^º	C2 ^º	C3 ^º	Promedio
JC1	108	54	40	37	43.67
JC2	111	68	58	31	52.33
JC3	112	61	62	73	65.33
JC4	Filomena	100	72	58	76.67
JC5	Arturo Araujo	152	216	320	229.33
JC6	Criolla Salvadoreña	190	205	248	214.33
JC7	Brasilia	56	44	56	52.00
JC8	India Salvadoreña	41	36	35	37.33
JC9	Tanzania	29	26	29	28.00
JC10	Brasil de Yoro	19	18	30	22.33
JC11	Masaya	217	230	286	244.33
JC12	Piñón Minas	303	336	270	303.00
JC13	Malí	281	275	330	295.33
JC14	Piñón 2	214	260	141	205.00
JC15	Piñón 1	199	168	193	186.67
JC16	Piñón Bravo	121	83	156	120.00
JC17	Bravo × Malí	133	194	157	161.33
JC18	Híbrido 70	138	103	127	122.67
JC19	EMBRAPA	102	201	202	168.33
JC20	Mexicana no tóxica	135	106	113	118.00
JC21	Puebla	232	260	234	242.00
	Máxima				303.00
	Mínima				22.33
	Promedio				142.29

^º Concentración

Una vez hecha la cuantificación se realizó un gel de calidad de ADN, con 5 μ L de ADN puro y 2 μ L de buffer de carga (glicerol y azul de bromofenol). La corrida electroforética se hizo a una concentración de agarosa de 1% en buffer TBE 0.1X a 90 V durante 45 minutos. Esto permitió observar la calidad del ADN extraído y cotejar los datos obtenidos en la cuantificación. Como se puede observar en la fotografía del gel de calidad, las muestras con bandas contrastantes corresponden a las muestras con mayor concentración de ADN, lo cual permitió tener un ADN óptimo para las pruebas posteriores. Se observa una mancha a lo largo del recorrido del ADN y del buffer, esto posiblemente se deba a fragmentación del ADN o ARN que no fue eliminado durante el proceso de extracción de ADN (Fig. 1).

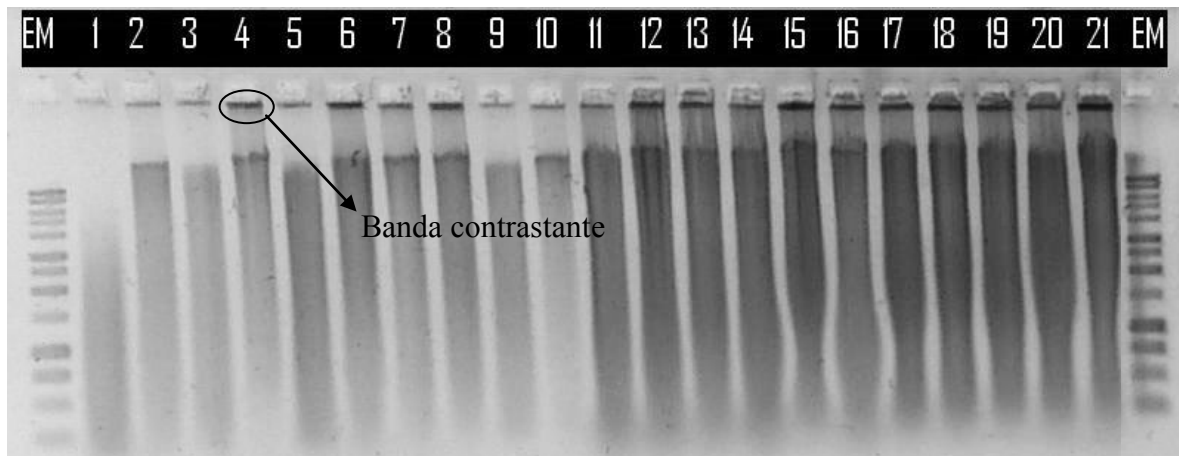


Figura 1. Gel de calidad de ADN de las accesiones de *Jatropha curcas* L. EM: Escalera Molecular de 1 kb. 1-21: Muestras estudiadas.

Amplificación de ADN y análisis de polimorfismos. Las 21 accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.) fueron analizadas utilizando diez primers ISSR mediante la PCR. Todos los primers presentaron patrones de bandas polimórficas reproducibles en 18 genotipos. El perfil de bandas del marcador representativo ISSR 808 se muestra en la Figura 2. Los genotipos JC2 (genotipo 111 proveniente de Honduras), JC3 (genotipo 112 proveniente de Honduras) y JC10 (genotipo Brasil de Yoro proveniente de Honduras, pero introducido desde Brasil) fueron descartados del análisis ya que no presentaron amplificación con ninguno de los primers utilizados, debido posiblemente a la degradación del ADN. Con los resultados obtenidos de la PCR se construyó una matriz tipo I con 18 columnas representando los genotipos estudiados y 73 filas representando los alelos amplificados con cada primer.

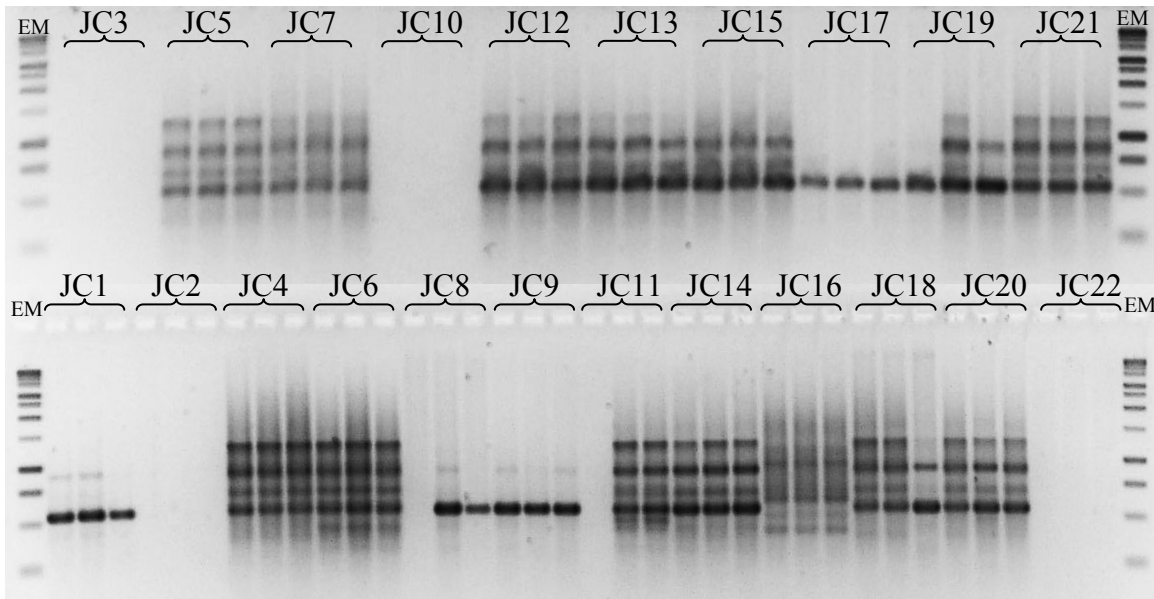


Figura 2. Perfil de bandas del primer UBC 808. EM: Escalera Molecular de 1 kb.

Se encontraron 73 bandas polimórficas. El número de bandas generadas por cada primer varió de 5 a 16, siendo 7.4 la media; el mínimo de cinco bandas fueron generadas por los primers UBC 807 y UBC 836, mientras que un máximo de 10 bandas fueron generadas por el primer UBC 840. El tamaño de los productos amplificados variaron de 350 a 2,500 pb. El porcentaje de polimorfismos promedio fue de 34%, el primer UBC 810 generó el más alto porcentaje de polimorfismos (67%) y los primers UBC 812 y UBC 840 generaron el más bajo porcentaje de polimorfismo (22%). El porcentaje de polimorfismos detectados por los primers ISSR (34%) en este estudio es similar al observado en otros: 33.5% (Basha y Sujatha 2007) y 35.5% (Basha *et al.* 2009); aunque es relativamente bajo en comparación con los resultados de Cai *et al.* 2010 (75.15%).

El promedio de contenido de información de polimorfismos (PIC por sus siglas en inglés para Polymorphism Information Content) calculado a partir de la frecuencia de bandas polimórficas presentes en todos los genotipos fue de 0.48, superior al 0.44 reportado en otro estudio realizado con RAPD en piñón (Ganesh *et al.* 2008). Los primers UBC 808, 812, 834 y 844 revelaron el mayor valor PIC de 0.5, seguido por los primers UBC 810 y 840 con un valor de 0.49. El primer UBC 807 reveló el PIC más bajo con un valor de 0.43. El valor PIC provee una medida influenciada por el número y frecuencia de alelos. El valor máximo de PIC para un marcador ISSR es 0.5, pues se asume la presencia de dos alelos por locus en un análisis de ISSR (Henry 1997) (Cuadro 6). Se presentaron valores altos de PIC, a pesar de la existencia de bajos porcentajes de polimorfismo, debido a que el rango de cantidad de bandas amplificadas por cada primer fue amplio (Fig. 2).

Cuadro 6. Secuencia, número de bandas amplificadas, porcentaje de polimorfismo y valor PIC de cada primer (primer) utilizado.

Primer	Secuencia 5'-3'	Número de bandas amplificadas	Porcentaje de polimorfismo	Valor PIC
UBC807	(AG) ₈ T	5	33	0.43
UBC808	(AG) ₈ C	7	28	0.50
UBC809	(AG) ₈ G	7	33	0.48
UBC810	(GA) ₈ T	8	67	0.49
UBC812	(GA) ₈	7	22	0.50
UBC827	(AC) ₈ G	9	28	0.45
UBC834	(AG) ₈ YT [¶]	8	28	0.50
UBC836	(AG) ₈ YA	5	33	0.46
UBC840	(GA) ₈ YT	10	22	0.49
UBC844	(CT) ₈ RC [#]	8	44	0.50
	Media	7.4	34	0.48

[¶] Base pirimídica (C, T).

[#] Base púrica (A, G).

Diversidad genética. El coeficiente de similaridad de Dice varió de 0.000 a 0.990. El más alto coeficiente de similaridad genética (0.990) se observó entre JC12 y JC21; mientras que el valor más bajo (0.00) se observó entre JC14 y JC16 (Cuadro 7). Resultados similares han sido observados en otros estudios realizados con el índice de Jaccard y marcadores RAPD, siendo el rango de 0.000 a 1.000 (Subramanyam *et al.* 2009, Ganesh *et al.* 2008).

El análisis de agrupamiento (Clustering) fue realizado utilizando la matriz de similaridad de Dice y con el algoritmo UPGMA y el método de SHAN del programa NTSYS-pc 2.1. Se generó un dendrograma que ilustra las relaciones genéticas entre los genotipos estudiados (Fig. 3). A partir del valor 0.15 del Coeficiente de Dice (CD) se separan dos grandes grupos: Grupo 1 (G1) y Grupo 2 (G2). El G1 incluye los genotipos JC1, JC8 y JC14 provenientes de diferentes localidades geográficas: JC1 (proveniente de Puerto Cortés, Honduras), JC8 (proveniente de El Salvador, pero introducida desde la India y considerada un genotipo resistente y de alto follaje) y JC14 (proveniente de Brasil). El G2 contiene accesiones provenientes de Honduras, Nicaragua, El Salvador, Brasil y México. Estas accesiones fueron agrupadas en cuatro subgrupos (G2.1, G2.2, G2.3 y G2.4).

Al valor de 0.30 del CD se separa el primer subgrupo 2.1 (G2.1) del los otros subgrupos (G2.2, G2.3, y G2.4). El sub-Grupo G2.1 contiene solamente la accesión JC16 que es una accesión proveniente de Brasil. Este material, *Jatropha gossypifolia* L., es considerado resistente a plagas y enfermedades y tolerante a sequía.

El subgrupo G2.2 contiene las accesiones JC9 (proveniente de Honduras, pero introducida desde África), JC11 (proveniente de Nicaragua), JC17 (proveniente de Brasil, es un híbrido de *J. gossypifolia* × *J. curcas*) y JC20 (proveniente de México) es una variedad no tóxica (contiene bajas concentraciones de ésteres de forbol). El híbrido JC 17 se separa al

valor de 0.75 del CD y esto confirma que posee una mezcla genética de ambas especies *J. gossypifolia* L. y *J. curcas* L (Fig. 3).

Al valor de 0.83 del CD se separa el subgrupo G2.3 del subgrupo G2.4. El subgrupo G2.3 contiene las accesiones: JC5 (proveniente de Honduras), JC7 (proveniente de Honduras, pero introducida desde Brasil), JC12 (proveniente de Brasil), JC13 (proveniente de Brasil), JC15 (proveniente de Brasil), JC19 (proveniente de Brasil) y JC21 (proveniente de México). La mayoría de accesiones de este grupo son provenientes de Brasil (Fig. 3).

El subgrupo G2.4 incluye las accesiones JC4 (proveniente de Honduras y considerado un genotipo resistente y de alto follaje), JC6 (proveniente de El Salvador) y JC18 proveniente de Brasil (Fig. 3).

Según el análisis de correspondencia (PCA), considerando los dos principales componentes, las accesiones se distribuyeron en tres grupos de acuerdo al grado de similitud (o distancia) genética. La mayoría de las accesiones se agruparon en el cuadrante IV, en concordancia con lo observado en el dendrograma (G2). Solo tres accesiones se agruparon en el cuadrante I (JC 1, JC8 y JC14) las mismas que corresponden al G1 y solo una accesión se encontró en el cuadrante III (JC16) que es la especie *Jatropha gossypifolia* (Fig. 4).

Cuadro 7. Matriz de similitud de Dice de 18 accesiones de *Jatropha curcas* L.

	JC1	JC4	JC5	JC6	JC7	JC8	JC9	JC11	JC12	JC13	JC14	JC15	JC16	JC17	JC18	JC19	JC20	JC21	
JC1	1.000																		
JC4	0.125	1.000																	
JC5	0.167	0.886	1.000																
JC6	0.128	0.966	0.897	1.000															
JC7	0.157	0.857	0.945	0.844	1.000														
JC8	0.857	0.085	0.128	0.087	0.120	1.000													
JC9	0.316	0.475	0.508	0.483	0.484	0.333	1.000												
JC11	0.150	0.850	0.800	0.835	0.795	0.103	0.471	1.000											
JC12	0.145	0.884	0.926	0.872	0.959	0.111	0.455	0.805	1.000										
JC13	0.154	0.891	0.935	0.879	0.947	0.118	0.476	0.810	0.970	1.000									
JC14	0.600	0.200	0.200	0.204	0.151	0.444	0.190	0.238	0.175	0.185	1.000								
JC15	0.157	0.879	0.923	0.867	0.957	0.120	0.484	0.795	0.959	0.989	0.151	1.000							
JC16	0.054	0.338	0.338	0.289	0.350	0.056	0.083	0.290	0.333	0.346	0.000	0.350	1.000						
JC17	0.118	0.730	0.811	0.740	0.779	0.121	0.622	0.697	0.741	0.769	0.111	0.779	0.254	1.000					
JC18	0.118	0.901	0.857	0.911	0.872	0.080	0.452	0.819	0.898	0.884	0.226	0.872	0.250	0.701	1.000				
JC19	0.151	0.882	0.925	0.870	0.958	0.115	0.469	0.800	0.980	0.969	0.145	0.958	0.341	0.759	0.896	1.000			
JC20	0.188	0.722	0.694	0.732	0.667	0.129	0.279	0.656	0.684	0.684	0.294	0.667	0.295	0.517	0.747	0.675	1.000		
JC21	0.148	0.894	0.936	0.882	0.969	0.113	0.462	0.814	0.990	0.980	0.179	0.969	0.337	0.750	0.907	0.990	0.692	1.000	

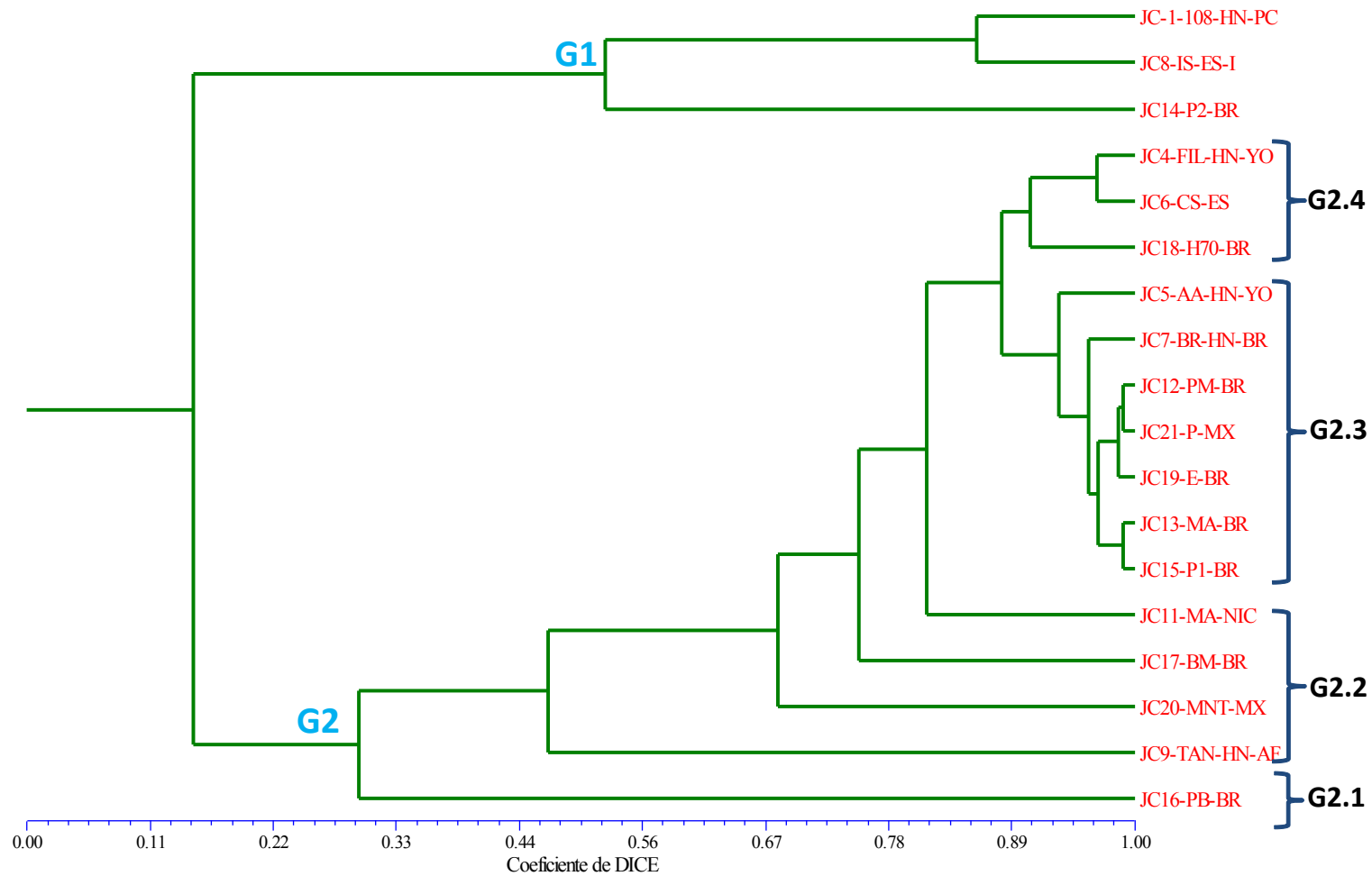


Figura 3. Dendrograma de 18 accesiones de *J. curcas* L basado en el algoritmo UPGMA y el coeficiente de Dice.

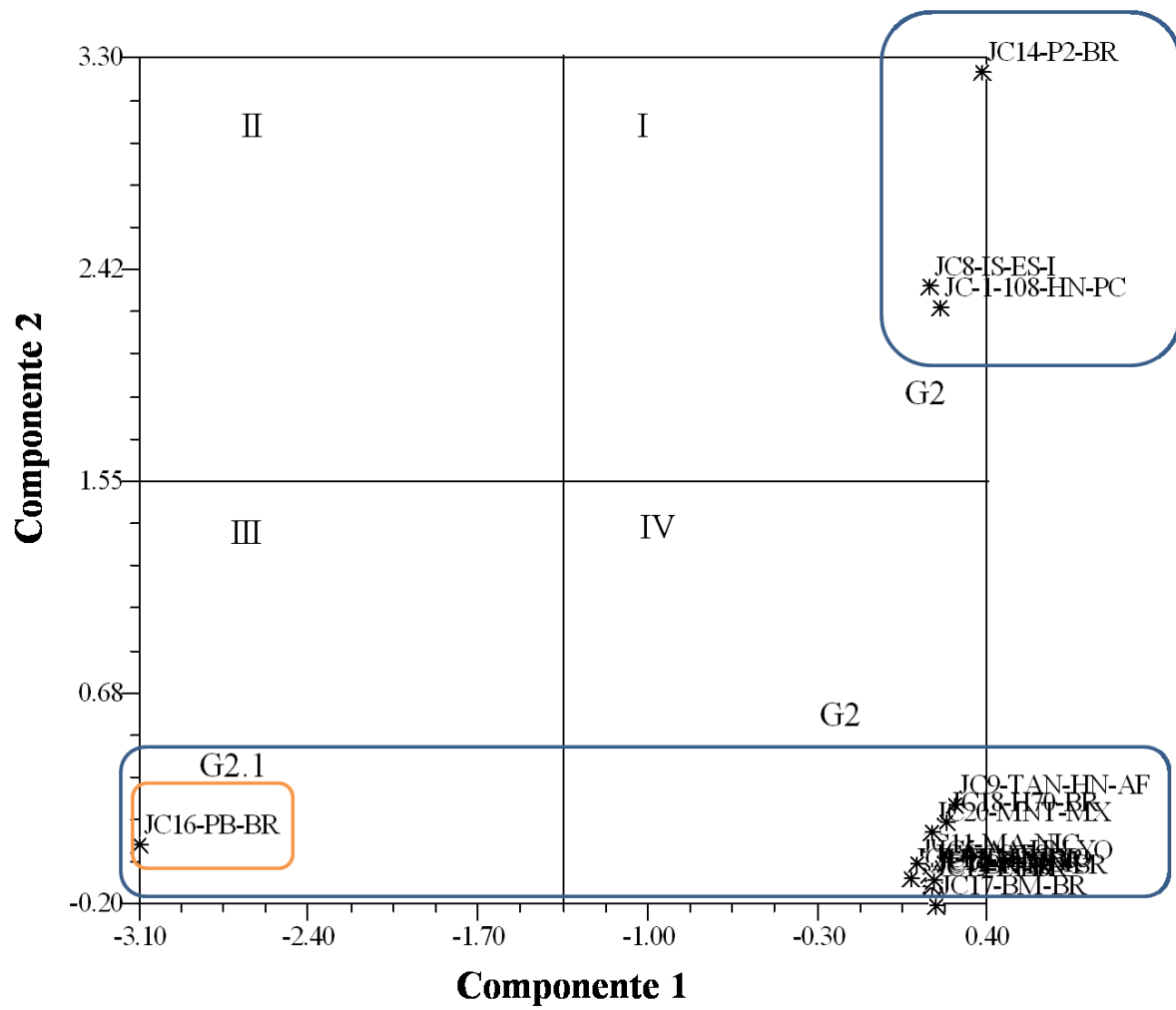


Figura 4. Gráfico de Análisis de Correspondencia (PCA) de 18 accesiones de *J. curcas* L.

4. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se utilizaron marcadores moleculares de tipo ISSR para analizar la diversidad genética de 18 accesiones de *Jatropha curcas* L. del Banco de Germoplasma de la E.A.P. Zamorano. Se obtuvo un reducido rango de polimorfismos posiblemente debido a la procedencia geográfica de las accesiones estudiadas, la baja cantidad de muestras analizadas y la baja cantidad de primers utilizados.
- Se observó una baja diversidad genética ya que cuatro de los cinco grupos creados según el coeficiente de Dice contienen accesiones provenientes de diferentes localidades.
- La capacidad polimórfica de los marcadores moleculares ISSR se vio disminuida al utilizar un solo perfil de termociclado al momento de la amplificación en la PCR, el nivel de degradación del ADN de las accesiones y la procedencia geográfica de las accesiones estudiadas.
- El análisis de correspondencia presentó congruencia con el dendrograma y ayudó a agrupar las accesiones estudiadas.

5. RECOMENDACIONES

- Ampliar la cantidad de accesiones estudiadas y primers utilizados para tener una mejor idea de la diversidad genética existente en la colección de piñón de la E.A.P Zamorano.
- Realizar un estudio similar con las 21 accesiones utilizando diferentes marcadores moleculares polimórficos: RAPD, AFLP y RFLP.
- Utilizar diferentes medidas para analizar la diversidad genética: coeficiente de Jaccard, coeficiente de igualdad simple (*simple match coefficient* en inglés) y coeficientes 1 y 2 de Kulcznski.
- Optimizar protocolos y perfiles térmicos para la amplificación de los distintos ISSR disponibles.

6. LITERATURA CITADA

Bártoli, J. 2008. Manual para el cultivo de piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras. 30 p. La Lima, Cortés, Honduras. AGERATEC, DAJOLKA, FACT Foundation, STRO, IEEA, HIVOS, DOEN, FHIA e Institute of European Environmental Policy.

Basha, S. D.; G. Francis; H. P. S. Makkar; K. Becker y M. Sujatha. 2009. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. *Plant Science* 176:812-823.

Basha, S. D. y M. Sujatha. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 156:375-386.

Bhat, K. V. 2002. Molecular data analysis. In: Proceedings of the short –term training course on molecular marker applicaton in plant breeding. Sept. 26-Oct. 5, 2002, ICAR, New Delhi.

Cai, Y.; D. Sun; G. Wu y J. Peng. 2010. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha* germplasm in China. *Biomass and Bioenergy* 34:1739-1750.

Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26:297-302.

Divakara, B.; H. Upadhyaya; S. Wani y C. Laxmipathi-Gowda. 2009. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy* 87:732-742.

Fairless, D. 2007. Biofuel: The little shurb that could - maybe. *Nature* 449:652-655.

Ganesh, S.; K. Parthiban; R. Senthil; V. Thiruvengadam y M. Paramathma. 2008. Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55:803-809.

Gohil, R. y J. Pandya. 2009. Genetic evaluation of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) genotypes. *Journal of Agricultural Research* 47(3):221-228.

González A. y X. Aguirre. 2007. Capítulo 19: Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). *In*: SEMARNAT (Instituto Nacional de Ecología, México) y CONABIO (Comisión Nacional

para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad, México). Ecología Molecular. Comps. L. E. Eguiarte; V. Souza y X. Aguirre. México D.F., México. IEPSA. p. 567-571.

Guachambala, M. y J. C. Rosas. 2011. Módulo de Diagnóstico Molecular. Laboratorio de Biotecnología del PIF. Manual. Zamorano Academic Press. Zamorano, Honduras. 52 p.

Heller J. 1996. Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. IPK (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung GATERSELBEN) e IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute).

Henry, R. J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. Chapman & Hall. London. 59-98 p.

IKBAL; K. Boora y R. Dhillon. 2010. Evaluation of genetic diversity in *Jatropha curcas* L. using RAPD markers. Indian Journal of Biotechnology 9:50-57.

Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. 2002. Mutant Germplasm Characterization using Molecular Markers, A manual. IAEA. Vienna, Austria. 86 p.

Jubera, M.; B. Janagoudar; D. Biradar; R. Ravikumar; R. Koti y S. Patil. 2009. Genetic diversity analysis of elite *Jatropha curcas* L. genotypes using randomly amplified polymorphic DNA markers. Journal of Agricultural Science 22(2):293-295.

Katembo, B. y P. Gray. 2007. Africa, Seeds, Biofuel. Journal of Multidisciplinary Research 1:1-6.

Makkar, H. P. S.; A. Aderibigbe y K. Becker. 1998 a. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry 62:207-215.

Makkar, H. P. S.; K. Becker y B. Schmook. 1998 b. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. Plant Foods for Human Nutrition 52:31-36.

Makkar, H.; V. Kumar; O. Oyeleye; A. Akinleye; M. Angulo-Escalante y K. Becker. 2011. *Jatropha platyphylla*, a new non-toxic *Jatropha* species: Physical properties and chemical constituents including toxic and antinutritional factors of seeds. Food Chemistry 125:63-71.

Marroquín, E.; S. Granados; A. Cáceres y C. Morales. 1997. Clinical trials of *Jatropha curcas* sapin treatment of common warts. Fitoterapia 68:160-162.

Martínez-Herrera, J.; P. Siddhuraju; G. Francis; G. Davila-Ortiz y K. Becker. 2006. Chemical composition, toxic/antrimetabolic constituents, and effects of different

treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry 96:80-89.

Pamidimarri, D.V.N.S.; R. Sinha; P. Kothari y M.P. Reddy. 2009 a. Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification. Molecular Ecology Resources 9:431-433.

Pamidimarri, D.V.N.S.; S.G. Shaik; H. Rahman y M.P. Reddy. 2009 b. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. Molecular Biology Report 37:2249-2257.

Parawira, W. 2010. Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A review. Scientific Research and Essays 5(14):1796-1808.

Pharmawati, M.; G. Yan e I. McFarlane. 2004. Application of RAPD and ISSR markers to analyse molecular relationships in *Grevillea* (Proteaceae). Australian Systematic Botany 17:49-61.

Reddy, M.; N. Sarla y E. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-17.

Schmook, B. y L. Seralta-Peraza. 1997. *J. curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula of Mexico. In G. M. Gübitz, M. Mittelbach, & M. Trabi (Eds.). biofuels and industrial products from *Jatropha curcas* (pp. 53-57). DBV Graz. **

Skroch P.; J. Nienhuis; S. Beebe; J. Tohme; F. Pedraza. 1998. Comparison of Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) core and reserve germplasm collection. Crop Science 38(2):488-496.

Subramanyam, K.; D. Muralidhararao y D. Devanna. 2009. Genetic diversity assessment of wild and cultivated varieties of *Jatropha curcas* (L.) in India by RAPD analysis. African Journal of Biotechnology 8(9):1900-1910.

Wolfe, A. 2010. Molecular systematic and molecular evolution (en línea). Department of Evolution Ecology and Organismal Biology. The Ohio State University. Consultado 26 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/>

Zietkiewicz, E.; A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics 20:176-183.