

## PRESENCIA DE APOMIXIS EN CRUZAS DE NOPALES MEXICANOS Y SU IDENTIFICACIÓN MOLECULAR PRELIMINAR

### APOMIXIS IN CROSSES OF MEXICAN PEAR CACTUS, PRELIMINARY MOLECULAR IDENTIFICATION

Candelario Mondragón Jacobo<sup>1\*</sup> y Bruce B. Bordelon<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Programa de Nopal y Frutales, Campo Experimental Norte de Guanajuato, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Nopal 259, Col. Arboledas. C.P. 76140 Querétaro, Qro. México. Correo electrónico: jacob077@hotmail.com <sup>2</sup> Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University 47907-1165 West Lafayette, IN, U.S.A.

\* Autor responsable

#### RESUMEN

El nopal es endémico de México y se ha convertido en cultivo alternativo para producir fruta, verdura y forraje en zonas semiáridas; solamente cinco variedades soportan el mercado nacional de tuna. A nivel comercial el nopal es propagado vegetativamente, pero para su mejoramiento se requiere la propagación sexual. A diferencia de otros cultivos propagados por semilla, una limitante sería del mejoramiento genético del nopal es la apomixis, ya que dificulta la selección de individuos obtenidos de cruces y complica los estudios genéticos, y disminuyen la eficiencia de los programas de mejoramiento. En este artículo se examina la presencia de plántulas apomícticas obtenidas de 17 progenies sobresalientes. El origen somático de las plántulas apomícticas provenientes de individuos de dos cruces se corroboró por medio de la técnica RAPD. Las plántulas apomícticas se separaron con base en tiempo de emergencia y tamaño, el cual podría ser utilizado como marcador morfológico. Se detectó la presencia de efectos maternos asociados a la variedad CDO en la incidencia de plántulas apomícticas. La autopolinización incrementó significativamente el número de apomícticos en las variedades Amarilla CNF, Reyna y Rosalito.

**Palabras clave:** *Opuntia ficus-indica*, nopal, RAPD, selección, mejoramiento genético.

#### SUMMARY

Priokly pear cactus is endemic to México and has become an alternative crop with uses as fruit, vegetable and forage in semiarid areas. Only five varieties support the national cactus pear market. This cactus is propagated asexually for commercial purposes, but sexual seed propagation is essential for breeding. Unlike other crops propagated by sexual seed, apomixis represents a serious constraint to cactus pear breeding. Apomixis difficults the screening of individuals obtained from crosses, complicates genetic studies and diminishes the efficiency of breeding programs. This paper discusses the extent of apomixis of 17 breeding populations. Somatic origin of apomicts from two crosses was verified with the RAPD technique. It was posible to separate apomictic seedlings based on emergency time and size. The presence of maternal effects associated to the variety CDO on the expression of apomixis was observed. Selfing increased significantly the number of apomicts en Amarilla CNF, Reyna and Rosalito varieties.

**Index words:** *Opuntia ficus-indica*, cactus pear, RAPD, selection, breeding.

#### INTRODUCCIÓN

El nopal es el frutal de temporal o secano más importante de la Altiplanicie Mexicana del cual existen más de 50 mil hectáreas plantadas (ASERCA 1999). También es muy apreciado en Italia, Chile, Brasil y países del norte de África sobre todo en las zonas semiáridas. En México la producción comercial se basa en cinco variedades, dos en Italia y una en Chile, todas ellas derivadas de las introducciones que se hicieron después de la conquista de México (Mondragón 2001).

Los nopales cultivados pertenecen en su mayoría a la especie *O. ficus-indica*; otras especies de importancia hortícola son: *O. robusta* y *O. megacantha*, que son poliploides (Pimienta, 1990) y apomícticas facultativas, lo que significa que la misma planta produce semillas con embriones cigóticos o de origen sexual y apomícticos o asexuales. Los individuos apomícticos son derivados del tejido nucelar (Vélez y Rodríguez 1996) por lo que se trata de un caso de embrionía adventicia. De acuerdo con Koltunow *et al.* (1995), la apomixis ocurre en el óvulo, lo que da como resultado una progenie genéticamente idéntica al progenitor femenino, debido a que la fertilización es innecesaria para producir los embriones apomícticos.

El nopal es propagado por medio de fracciones de tallo con fines comerciales; sin embargo, la propagación por semilla sexual es esencial en el mejoramiento genético. Una limitante sería que dificulta el mejoramiento es la apomixis, fenómeno frecuente en numerosas *Opuntia*. No se conocen todavía aspectos específicos sobre la herencia ni penetrancia de la apomixis en nopal.

En cultivos que dependen de las semillas híbridas, la apomixis representa una herramienta muy importante que se estudia intensamente, por las posibilidades de reproducir híbridos sin problemas de segregación. La apomixis fija un genotipo debido a que la meiosis no es necesaria para producir un embrión o un pseudocigoto, lo cual elimina la posibilidad de la recombinación genética (Koltunow *et al.*, 1995).

La semilla de nopal puede incluir embriones asexuales derivados de los tejidos maternos (Pimienta, 1990; Mondragón, 2001). Tisserat y Murashige (1979) observaron apomixis en siete especies de *Opuntia* incluyendo *O. ficus-indica*, la más importante de las especies cultivadas. De acuerdo con Pérez (1993) la presencia de semillas en pruebas de germinación con más de un embrión varió de 10.9 a 18.5 % en *O. streptacantha* y sus híbridos, y de 3.6 a 24.7 % en *O. robusta*. En la tuna también se observan semillas fusionadas, pero éstas son fáciles de separar, en variedades mexicanas, Mondragón y Pimienta (1995) reportaron un rango de 0.2 hasta 7 % del total de semillas dobles o triples. El cruzamiento artificial puede incrementar la presencia de individuos de origen apomíctico en aquellas especies que presentan el fenómeno de manera natural (Brown, 1975).

El origen nucelar de embriones apomícticos en nopal fue reportado por Vélez y Rodríguez. (1996) mediante el uso de microscopios de luz y de barrido, lo que permitió observar que todos los embriones somáticos estaban confinados a la región micropilar del óvulo. Se observaron hasta 15 embriones por semilla en todas las etapas de desarrollo, pero únicamente aquéllos que contaban con suspensorios germinaron. Las fotomicrografías obtenidas por estos autores muestran que los embriones de origen cigótico son de mayor tamaño que los de origen nucelar, lo cual probablemente les confiera una mayor velocidad de germinación y crecimiento. Yeung y Meinke (1993) también reportaron que la presencia de suspensorios bien desarrollados permiten la maduración y germinación de los embriones nucleares más grandes y viejos, dado que este órgano juega un papel activo en el desarrollo temprano del embrión.

Los embriones apomícticos, excluyendo la posibilidad de mutaciones, tienen una constitución genética idéntica a la del progenitor materno (Koltunow, 1993). Por tanto, la presencia de embriones somáticos que crecen al lado de embriones cigóticos dificulta la selección de individuos obtenidos de cruzas, lo que complica los estudios genéticos. Los costos del programa de mejoramiento aumentan debido a los individuos adicionales mantenidos en vivero y campo, y la eficiencia del programa en general se reduce.

Algunos indicadores de la presencia de apomixis son: progenies uniformes o individuos de apariencia similar a la madre en especies de polinización cruzada, plantas de apariencia similar a la madre entre progenies F1; variación limitada o ausencia de ella en progenies F2 en cruzas de padres de apariencia contrastante; alta fertilidad de cruzas de aneuploides, triploides o cruzas amplias de otras plantas que se esperaría fueran estériles, y múltiples plántulas por semilla, entre otros caracteres morfológicos (Hanna y Bas-haw 1987). En la producción de portainjertos de cítricos las plantas apomícticas son preferidas por ser uniformes y vigorosas, Anderson *et al.* (1991), reportaron que con el uso de los marcadores morfológicos tamaño y hábito de crecimiento pudieron separar los individuos de origen materno de citrumelo (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*).

La identificación completa de individuos apomícticos de nopal basada solamente en el fenotipo es difícil debido a la duración de la etapa juvenil (4 a 6 años). La identificación de caracteres fenotípicos presentes en la etapa juvenil podría acortar el tiempo dedicado a esta actividad. Desde el punto de vista práctico, la selección es más sencilla cuando se cuenta con marcadores fenotípicos de la apomixis. La identificación morfológica es más difícil si los padres están emparentados. Las huellas genéticas podrían ser una herramienta precisa para revelar el origen genético de un individuo; sin embargo, el procedimiento se dificulta cuando se trabaja con un gran número de cruzas y se manejan progenies grandes en cada generación.

La combinación de caracteres fenotípicos y de RAPD ha sido reportada por Ur-Rahman *et al.* (1997) para evaluar la similaridad genética entre plántulas apomícticas y el progenitor materno en dos especies de *Malus*; la misma técnica fue usada por López *et al.* (1997) en mango. En ambos casos la identificación se facilitó al usar los patrones de bandas RAPD. En el caso de zarzamora (*Rubus* Subgen. *Rubus*) la técnica de hibridación del ADN con la sonda M13 produjo huellas genéticas muy efectivas en la separación de individuos apomícticos e híbridos interespecíficos (Antonius y Nybom 1995).

Los objetivos del presente trabajo fueron: determinar la presencia de apomixis en individuos de poblaciones de cruzas selectas, mediante la utilización de la técnica de RAPD en la separación de individuos por su origen genético, y correlacionar la información obtenida con caracteres de plántula fáciles de registrar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Se usaron semillas provenientes de 17 cruzas (Cuadro 1) efectuadas en 1997 del Programa de Mejoramiento de Nopal y Frutales del Campo

Experimental Norte de Guanajuato, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INI-FAP). Las semillas se seleccionaron por su apariencia, descartando las fusionadas y abortadas. Se escarificaron sumergiéndolas dos veces en agua caliente (80 °C) hasta llegar a temperatura ambiente y dejándolas en remojo por 24 horas (Mondragón, 2001). Posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio 10 % por 10 minutos y se enjuagaron finalmente con agua purificada. Previo a la siembra, la semilla se trató con el fungicida Banroot (Etridiazol + Thiophanato de metilo) 20 g/kg, para prevenir la pudrición suave (*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., etc.). Se usaron charolas con sustrato estándar para la germinación de las semillas. El experimento fue conducido en los invernaderos de la Universidad de Purdue, manteniendo una temperatura diurna de 27 °C y nocturna en 15 °C. Se usaron 200 semillas por población divididas en cuatro bloques de 50. Las charolas se mantuvieron con humedad constante y con un régimen de 14 horas de luz dado por lámparas de vapor de sodio. Se registró el tiempo y la tasa de germinación, color y orientación de los cotiledones, presencia de espinas y color del cladodio inicial a los 100 días. Las plántulas fueron marcadas de acuerdo con el momento de emergencia. El registro de la germinación se suspendió a los 120 días.

Cuadro 1. Germinación de semillas de poblaciones de nopales mexicanos y cruza selectas.

Progenie	Peso de 100 semillas (g)	Germinación (%)	Plántulas "apomícticas" (%)	Germinación (días)
Cristalina (CRIS)	2.44	67 a	17 a	71
Copa de Oro (CDO)	2.23	70 a	20 a	42
Reyna (REY)	1.70	10 c	5 cd	26
Rosalito (ROS)	2.00	54 ab	2 d	70
CDO autopolinizada	2.04	70 a	15 b	82
REY autopolinizada	1.62	38 bc	13 b	49
ROS autopolinizada	2.07	52 ab	3 d	86
CDO x ROS	2.25	50 b	18 a	74
ROS x CDO	2.20	47 b	1 d	47
CRIS x ROS	2.25	79 a	8 bc	37
ROS x CRIS	1.65	49 b	2 d	36
CDO x ACN	1.50	78 a	19 a	61
REY x ACN	1.75	50 b	6 cd	61
CDO x REY	1.95	66 a	16 b	60
ROS x REY	1.80	55 b	2 d	61
REY x ROS	1.75	62 b	6 cd	32
CRIS x ACNF	2.50	16 c	2 d	74

Literales iguales en columna indican valores estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

**Método de extracción de ADN.** Para la extracción de ADN se siguió la técnica reportada por Mondragón *et al.* (2000), específica para *Opuntia* y utilizando la punta del primer cladodio. La concentración de ADN se midió con un espectrofotómetro y la calidad del ADN fue evaluada mediante la relación de absorbancia  $A_{280}:A_{260}$ ; la respuesta de muestras del ADN obtenido se midió en corridas de

prueba de reacciones de amplificación de ADN (Polymerase Chain Reaction, PCR).

**Protocolo RAPD.** Se utilizó el protocolo reportado por Conner *et al.* (1997) en un estudio de variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh). Cada reacción incluyó 2.5 mL de bufer 10X para PCR; 1.25 mL de mezcla de dinucleótidos (2.5 mM); una unidad de Taq polimerasa, 1.5 mL de iniciador (10 mM) y 1.5 mL de Mg Cl<sub>2</sub> (25 mM); para completar un volumen de 25 mL se usó agua deionizada y destilada. Se agregaron de 20 a 40 ng de ADN genómico. Las reacciones de PCR se hicieron bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 5 minutos a 95 °C; desnaturalización a 95 °C por 30 segundos; extensión de 1 minuto a 72 °C; extensión final de 5 minutos a 72 °C. Para la amplificación se seleccionaron siete iniciadores arbitrarios; OPG-03, OPG-05, OPG-07, OPG-13, OPC-06, OPA-01 y OPM-12, obtenidos de Operon Technologies (Alameda, California). La reacción se corrió durante 40 ciclos. Las PCR se hicieron en un termociclador modelo PTC100 (MJ Research Inc.). Los productos de amplificación fueron separados en un gel de agarosa 0.6 % en bufer TBE, coloreados con bromuro de etidio y después fotografiados. Dos de las reacciones PCR fueron repetidas tres veces para comprobar su repetibilidad.

Se seleccionó una muestra de cinco plántulas de las cruza CDO x ROS, cuatro de CDO x REY, una de CDO x ACN para el estudio molecular. Las plántulas fueron seleccionadas de acuerdo con su fecha de emergencia y tamaño.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Germinación de semillas.** El porcentaje de germinación varió de 10 % obtenido en REY hasta 79 % observado en la cruza de CRIS x ROS; el promedio general fue de 54 %, (Cuadro 1) valor que es comparable con los valores reportados por Wang *et al.* (1996) quienes reportaron un máximo de 54 % con semillas colectadas de clones mexicanos y chilenos, cultivados en Kingsville, Texas y con los de Nieddu y Chessa (1997) quienes reportaron 49 % con semillas del cv. "Gialla" en Italia.

La germinación empezó de 7 a 10 días después de la siembra. El tiempo necesario para alcanzar el porcentaje máximo de germinación varió de 32 días en la cruza REY x ROS hasta 86 días en la semilla de ROS autopolinizada durante el periodo de 120 días considerado en el estudio. El tiempo necesario para alcanzar la máxima germinación no estuvo correlacionado con el porcentaje de germinación ( $r=0.12$ ), ni con el porcentaje de plántulas apomícticas ( $r=0.002$ ). No se encontró correlación significativa entre el porcentaje de germinación y el número de plántulas

apomícticas ( $r=0.27$ ). A diferencia de otras especies como los pinos (Kozłowski y Pallardy, 1997), el tamaño de semillas no se asoció con el porcentaje de plántulas apomícticas.

El origen genético de la semilla no afectó la germinación y las semillas derivadas de autopolinización germinaron de manera similar a las obtenidas de polinización abierta y de cruzas, las cuales presentaron valores cercanos al promedio, con excepción de la crusa CRIS x ACN que registró 16 %.

Las plántulas supuestamente "apomícticas" fueron visibles dos días después que las "cigóticas" y todas fueron reconocibles mientras los cotiledones estuvieron presentes. Estas plántulas fueron más pequeñas y fáciles de identificar. La diferencia en tamaño se redujo durante los siguientes cuatro meses, observándose que las más pequeñas alcanzaron un tamaño similar a las "cigóticas".

**Identificación molecular de muestras de plántulas de acuerdo con su tamaño.** Las Figuras 1A y 1B muestran los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores OPG-13 y OPM-12, respectivamente, de plántulas que emergieron tarde y que fueron arbitrariamente nombradas "apomícticas", contra dos muestras de DNA de plántulas que emergieron temprano y que fueron más grandes durante los primeros tres meses. El número total de bandas de los progenitores maternos mostró poca variación, indicación probable de parentesco cercano, aun cuando fenotípicamente son diferentes. Una banda adicional fue detectada para ROS cuando se compara con CDO y se aprecian dos bandas ausentes cuando se compara CDO con REY.

Dado que las cruzas comparten el mismo progenitor materno, los patrones de bandas pueden compararse entre sí y con CDO. Tanto para el iniciador OPM-12 como el OPG-03, los patrones de bandas entre individuos "apomícticos" son sensiblemente similares. Al comparar cualquiera de ellos con CDO (progenitor materno) en ambas cruzas la similitud se mantiene, por lo que se puede afirmar que las plántulas seleccionadas son de origen somático, ya que comparten las mismas huellas genéticas que la madre.

**Correlación entre caracteres fenotípicos y RAPDs.** Con excepción del tamaño de plántula ningún otro carácter fenotípico juvenil se asoció con su origen genético. La selección de plántulas de acuerdo con su tamaño podría ser útil en las cruzas estudiadas, ya que los patrones RAPD observados en las plántulas pequeñas fueron similares a los de la hembra, lo que corrobora su origen materno.

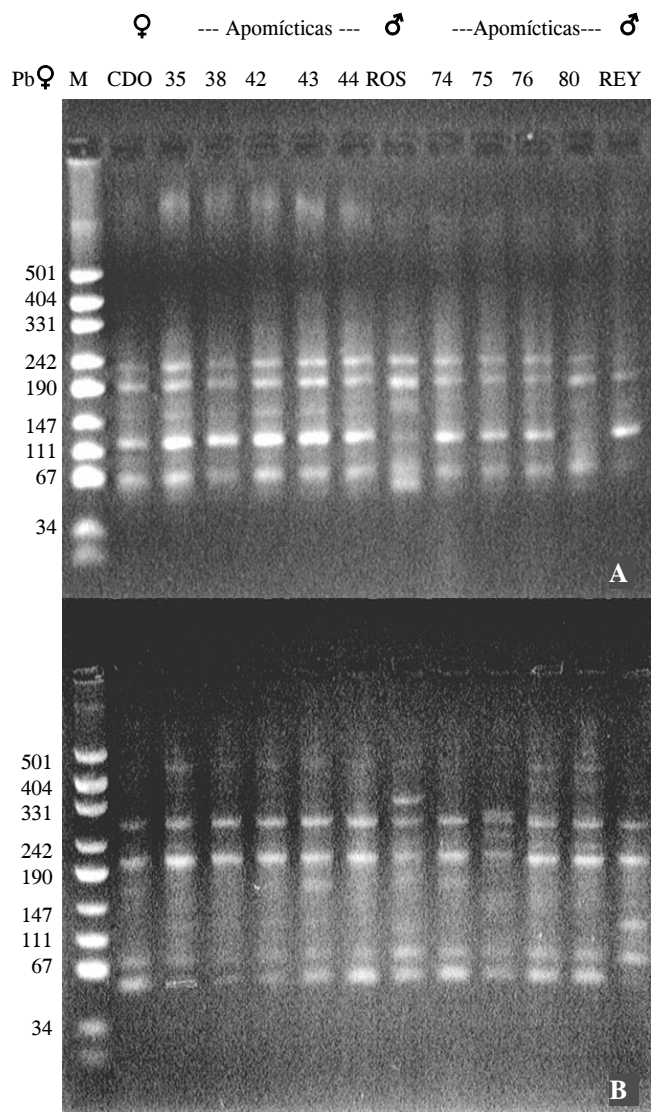


Figura 1. Productos de PCR de muestras de DNA de plántulas de nopal con los iniciadores OPG-13 (CTCTCCGCCA) (A) y OPM-12 (GGGACGTTGG) (B). (Pb: pares de bases; M es el marcador de tamaño de fragmentos de ADN: uPC 19 de Biosynthesis Inc.). Los números identifican las muestras de plántulas que emergieron tarde. Las flechas indican las bandas adicionales encontradas en uno de los progenitores femeninos.

**Efecto de la autopolinización en la presencia de apomícticos.** La autopolinización indujo un incremento de individuos apomícticos en entradas con poca tendencia a la producción de los mismos (ROS y REY en el Cuadro 1). Por otro lado, la autopolinización no incrementó la presencia de apomícticos de CDO (de polinización abierta), el cual presenta 20 % de plántulas de origen probablemente somático contra 18 % de apomícticos cuando se autopolinizó. En *Solanum (Phureja)* se ha identificado el efecto del polinizador en la inducción de dihaploides o asexuales (Montelongo y Rowe, 1969).

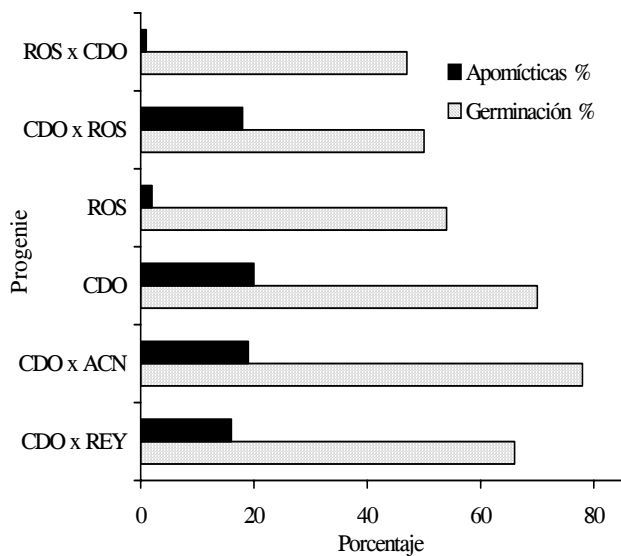


Figura 2. Efectos maternos en la expresión de apomixis en cuatro cruza de nopal.

**La fuente de polen afecta el porcentaje de plántulas apomicticas.** Los valores más altos de individuos apomicticos se encontraron asociados a entradas particulares. CDO presentó 20 % de apomicticos y fue consistente en todas aquellas cruza en las cuales se incluyó como hembra (Figura 2).

Cuando CDO se cruzó con ROS (una entrada que presentó baja incidencia de apomicticos, 1 %) el número de plántulas de origen materno incrementó significativamente (hasta 18 %). Un efecto similar fue observado cuando CDO se cruzó con ACN y REY, las cuales reportaron 19 y 16 % de plántulas apomicticas, respectivamente (Figura 2).

Cuando dos progenitores con baja incidencia de apomicticos se cruzaron, el número de ellos se incrementó pero no significativamente, como se observa en la cruza de ROS x REY, la cual presentó 2 y 5 % respectivamente en individuos de polinización abierta, y se incrementó a 6 % en la cruza (Cuadro 1). Estos resultados sugieren la posibilidad de un efecto materno, el cual es necesario caracterizar en estudios futuros para definir el modo de expresión de este carácter.

## CONCLUSIONES

La presencia de más de una plántula por semilla fue observada en todas las poblaciones estudiadas independientemente de su origen genético.

La técnica de RAPD permitió la separación de plántulas de origen materno en las cruza seleccionadas para el

ensayo de PCR. Los patrones de bandas obtenidos fueron consistentes con la selección preliminar por tamaño de plántula. Sin embargo, es necesario hacer un estudio más extensivo antes de generalizar su aplicación como criterio de selección.

Se encontró que el progenitor CDO, cuando se incluyó como hembra en las cruza, indujo un mayor número de plántulas apomicticas, con lo cual se evidenció un probable efecto materno. La autopolinización también incrementó la presencia de plántulas de origen apomictico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson M C, W S Castle, G N Moore (1991) Isozymic identification of zygotic seedlings in swingle citrumelo *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* nursery and field populations. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 (9):322-326.
- Antonius K, H Nybom (1995) Discrimination between sexual recombination and apomixis/automixis in a *Rubus* plant breeding programme. Hereditas 123:205-213.
- ASERCA (1999). La tuna base del desarrollo de las culturas mesoamericanas. Rev. Claridades Agropec. 71:3-28.
- Brown G A (1975) Apples. In: Janick J, N J Moore (eds) Advances in Fruit Breeding. Purdue University Press. pp: 3-37.
- Conner J P, S K Brown, F N Weeden (1997) Random amplified polymorphic DNA based genetic linkage maps of three apple cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122(3):350-359.
- Hanna W W, E C Bashaw (1987) Apomixis: its identification and use in plant breeding. Crop Sci. 27:1136-1139.
- Koltunow M A (1993) Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. The Plant Cell 5:1425-1437.
- Koltunow M A, R A Bickwell, A M Chaudhury (1995) Apomixis molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization. Plant Physiol. 108:1345-1352.
- Kozlowski T T, G S Pallardy (1997) Physiology of Woody Plants. Academic Press. New York. 373 p.
- Lopez V J A, O Martínez, O Paredes L (1997) Geographic identification and embryo type identification in *Mangifera indica* L. cultivars using RAPD markers. Hort. Science 32:1105-1108.
- Mondragón J C, N Doudareva, B Bordelon (2000) DNA extraction from several cacti. Hort Science 35:1124-1126.
- Mondragón J C (2001) Cactus pear domestication and breeding. Plant Breeding Rev. 20:135-165.
- Nieddu G, I Chessa (1997) Distribution of phenotypic characters within a seedling population from *Opuntia ficus-indica* (Cv. Gialla). Acta Horticulturae 438:37-43.
- Mondragón J C, E Pimienta B (1995) Propagation. In: Agroecology Cultivation and Uses of Cactus Pear. Plant Production and Protection Paper 132. FAO. Rome.
- Perez R C (1993) Viabilidad de las semillas y poliembriónia en morfoespecies cultivadas y silvestres de nopal tunero (*Opuntia* sp) Tesis Profesional. Universidad de Guadalajara. México. 42 p.
- Pimienta B E (1990) El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 54 p.
- Tisserat B E B, T Murashige (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Reviews 1:1-78.
- Ur-Rahman H, D J James, A M Hadonou, P D S Caligari (1997) The use of RAPD for verifying the apomictic status of seedlings of *Malus* species. Theor. Appl. Genetics 95:1080-1083.
- Velez G C, B Rodriguez G (1996) Microscopic analysis of polyembryony in *Opuntia ficus-indica*. J. Profess. Assoc. Cactus Develop. 1. Kingsville, TX. pp: 43.

**Yeung E C, D W Meinke (1993)** Embryogenesis in angiosperms. Development of the suspensor. *Plant Cell* 5:1371-1381.

**Wang X, P Felker, A Paterson, Y Mizrahi, A Nerd, C Mondragon J (1996)** Cross-hybridization and seed germination in *Opuntia* species. *J. Profess. Assoc. Cactus Develop.* 1: 49-60.