

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El presente estudio de variabilidad genética de *Jatropha curcas* L. mediante la utilización de técnicas moleculares tiene el carácter de preliminar, debido a que existen pocos antecedentes de investigaciones moleculares de esta especie en nuestro país, incluso en América, a pesar de que su cultivo cada vez toma mayor importancia en el área de los biocombustibles (Kumar *et al.*, 2008).

Este análisis permitirá conocer el potencial genético de *Jatropha curcas* L., siendo un punto de partida para subsecuentes investigaciones moleculares que busquen la correlación entre la genética y la morfología de *Jatropha curcas* L. con el objetivo final de obtener nuevas variedades productivamente eficientes en cuanto a la cantidad de aceite mediante el mejoramiento genético (Divakara *et al.*, 2009).

### 4.1 Extracción y cuantificación de ADN

La obtención de ADN genómico de buena calidad, mediante protocolos rápidos, simples y baratos, es un prerrequisito esencial en estudios de análisis molecular, en especial cuando se cuentan con gran cantidad de muestras (Dieffenbach & Dveksler, 2003; Tatikonda *et al.*, 2009). La extracción y purificación de ADN constituyen un verdadero reto cuando la especie a analizarse, como *Jatropha curcas* L., posee en su estructura compuestos (alcanoides, flavonoides, polisacáridos, ácidos grasos y látex) que co-precipitan con el ADN y que pueden interferir en la acción de la Taq polimerasa, limitando de esta manera el número de fragmentos de ADN amplificados (Khanuja *et al.*, 1999; Narayanan *et al.*, 2006).

El protocolo modificado de extracción de ADN (Khanuja *et al.*, 1999) utilizado en este estudio resultó muy eficiente en cuanto a la cantidad y pureza de ADN obtenido en la gran mayoría las muestras (*Resultados*, ver apartado 3.1). Esto se debe principalmente a que el tampón de extracción contiene porcentajes altos de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) y de PVP (polivinilpirrolidona), siendo éstos 2.5% y 1%, respectivamente. Esto permitió formar complejos en gran cantidad con las moléculas de polisacáridos, de látex y de fenol existentes en las muestras de piñón. Los complejos formados se acumularon en la interfase resultante de mezclar y posteriormente centrifugar la solución de extracción junto con el cloroformo alcohol isoamílico 24:1 (Michiels, Ende, Tucker, Riet & Laere, 2003). Esta remoción de contaminantes fue mejorada al aumentar un segundo lavado con la solución de cloroformo alcohol isoamílico 24:1.

Michiels *et al.* y sus colaboradores (2003), afirman que la cantidad y la calidad de ADN dependen de la temperatura (baja) y de la duración (alta) de la precipitación de ADN, lo cual también justifica los buenos resultados obtenidos en la presente investigación, pues las soluciones de ADN fueron precipitadas a -20 °C por 24 horas. Además, es preciso mencionar que el Tris-HCl adicionado en el tampón de extracción confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH, evitando de esta forma la degradación de ADN (Somma, 2002).

La calidad del ADN extraído se aseguró mediante la resuspensión del pellet en la solución TE y de su refrigeración a - 20 °C. La solución TE contiene EDTA que es un componente que se une al magnesio, evitando que las DNAsas presentes actúen sobre el ADN, pues el magnesio es un cofactor de las mismas (Somma, 2002).

La cuantificación de las muestras de ADN extraído se realizó tanto en geles de agarosa como en el fluorómetro. Mediante la corrida electroforética se puede estimar la concentración de ADN y visualizar la cantidad de contaminantes (Somma, 2002). Sin

embargo muchas veces esta estimación es relativa al operador, por lo que es preciso utilizar la fluorimetría para obtener valores exactos de concentración de ADN. Pese a que éste método no permite analizar la contaminación presente (Held, 2006). De esta forma se fortalecen las capacidades de ambas técnicas utilizadas.

#### **4.2 Amplificación de fragmentos de ADN mediante primers ISSRs**

El análisis molecular de la mayoría de investigaciones empieza con la amplificación de bandas usando varios primers, con el fin de escoger aquellos que presentan el mayor número de bandas definidas (Ranade, Srivastava, Rana, Srivastava & Tuli, 2008). En ciertos estudios comienzan con 100, 65 o 10 primers y se seleccionan, 48, 13 o 9, respectivamente (Basha & Sujatha, 2007; Dong *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2008). En el presente estudio se analizaron 10 primers y se eligieron solamente 6 debido a la disponibilidad de reactivos (*Resultados*, ver apartado 3.2.1).

A partir de los 6 primers designados se llevaron a cabo distintos ensayos para determinar las mejores condiciones de PCR tomando en cuenta las condiciones descritas por Ochoa *et al.* (2008). Es importante señalar que si las reacciones de PCR se realizan sin previa estandarización, pueden dar lugar a bandas inespecíficas y poco definidas, y peor aún ningún producto puede ser amplificado. Así, se puede señalar que algunos de los parámetros que afectan el rendimiento y la especificidad de la PCR son concentración de MgCl<sub>2</sub>, primer, dNTP's, Taq polimerasa, número de ciclos, temperatura de alineamiento entre otros, de los cuales la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la temperatura de alineamiento provocan el mayor impacto en la acción y en la fidelidad de la Taq polimerasa (Dieffenbach & Dveksler, 2003).

En la estandarización de la PCR se presentaron muy pocos inconvenientes, pues los resultados obtenidos del ensayo de concentración de MgCl<sub>2</sub>, de temperatura de alineamiento y de número de ciclos muestran perfiles de bandas amplificadas muy

similares entre las respectivas variaciones (*Resultados*, ver apartado 3.2.2), con lo que se comprueba la correcta optimización de la PCR con estos primers en anteriores trabajos (Ochoa *et al.*, 2008). Solamente el primer 844A presentó 4 bandas inespecíficas en las dupletas (*Resultados*, ver apartado 3.2.3). Según Bonin *et al.* (2007) estos errores pueden ser consecuencia de la poca cantidad de ADN, daños en los equipos, contaminación del tubo de ensayo, errores humanos, entre otros, sin embargo en este caso se descartan los dos primeros. Así, este número de bandas inespecíficas se consideró poco importante y se continuó con el análisis, pues pudo deberse a un error del operador. El único parámetro que se modificó fue la concentración de ADN de 20 ng/ul a 5 ng/ul debido a que en comparación con las soluciones de ADN de Ochoa *et al.* (2008), las soluciones de ADN para este estudio presentaban mayor cantidad de moléculas contaminantes, por lo que fue necesario diluir dichas soluciones diluyendo también la contaminación y evitando de esta manera la inhibición de la Taq polimerasa (Narayanan *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos de la amplificación de fragmentos de ADN con los 6 primers utilizando todas las muestras de ADN (*Resultados*, ver apartado 3.2.3) mostraron que los marcadores ISSRs son altamente reproducibles pues el perfil de bandas era igual en la gran mayoría de las dupletas (Culley *et al.*, 2007). El registro de algunas bandas resultó complicado por la proximidad a la que se encontraban y por las diferencias de intensidad que presentaban entre individuos o entre geles. Estos problemas fueron superados en parte mediante la utilización del programa Dolphin-View Band Tool que facilitó en gran forma la lectura de las bandas (Bonin *et al.*, 2007).

### 4.3 Análisis de datos

#### 4.3.1 Características y atributos de los primers ISSRs

La utilización de un gran número de marcadores es primordial para determinar con veracidad la estructura y la variabilidad genética de las poblaciones, sin embargo a veces es complejo cumplir con esta característica (Bonin *et al.*, 2007), como es el caso de este estudio en donde se utilizó solamente 6 primers ISSRs. A pesar de ello, resaltamos la importancia de los resultados obtenidos pues al ser un estudio pionero en el área molecular de *Jatropha curcas* L. dentro del país, la información inferida es muy válida.

Los primers utilizados en esta investigación generaron un 98.36% de polimorfismo, que es un porcentaje bastante alto comparado con otros estudios moleculares de la misma especie en donde se han encontrado valores de 33.5% y 35.5% solamente (Basha & Sujatha, 2007; Basha *et al.*, 2009). El porcentaje de polimorfismo observado indica que los 6 primers ISSRs tienen un poder discriminatorio muy grande (Venkatachalam *et al.*, 2008). La detección de 46 bandas únicas y de 8 bandas raras puede servir en la identificación y selección de distintas accesiones de piñón mediante el uso del primer 17899A que fue el que dio lugar a más bandas únicas. Para el grupo 4 (Pedernales - Canoa Km 4) se obtuvo la mayoría de bandas únicas (36) sugiriendo una diferencia marcada de este grupo con los demás. Las 66 bandas compartidas y similares constituyen una importante herramienta para relacionar perfiles moleculares de accesiones con sus respectivas localidades y así deducir los posibles orígenes geográficos de las accesiones desconocidas (Tatikonda *et al.*, 2009).

Los valores obtenidos de resolución de primer (RP) van desde 4.08 para el primer 17899A hasta 8 para el primer 17899B, siendo éste último el que influyó de gran manera en la agrupación de genotipos. Al comparar estos valores con los valores de RP obtenidos en otra investigación de piñón usando AFLP (Tatikonda *et al.*, 2009), podemos afirmar que el rango de RP observado en este estudio es mucho menor. Sin

embargo, Venkatachalam *et al.* (2008) resalta que el valor de RP puede variar entre distintas especies y entre diferentes grupos de primers.

#### 4.3.2 Distancias genéticas y agrupamientos

Los valores de similaridad obtenidos mediante el coeficiente de Dice (*Resultados*, ver apartado 3.4.2) se encuentran en un rango de 0.32 a 0.98. La similaridad mínima (0.32) de este estudio es un valor medio comparado con las similaridades obtenidas en otras investigaciones de *Jatropha curcas* L. realizadas con accesiones provenientes de la India y de México. Basha & Sujatha (2007) obtuvieron valores de similaridad de 0.573 a 0.97 utilizando ISSRs y el coeficiente Dice. En cambio, Basha *et al.* (2009) lograron valores de 0.198 a 0.949 con la diferencia que utilizaron el coeficiente de Jaccard. Esta comparación indica que la similaridad genética de piñón varía ampliamente entre accesiones de distintas procedencias del mundo.

Debido a que no se cuenta con datos pedigree o históricos de las poblaciones analizadas de *Jatropha curcas* L., se puede afirmar que los valores de similaridad genética más altos indican una probabilidad enorme de que los individuos tengan un mismo ancestro (Tatikonda *et al.*, 2009). Como se puede apreciar en la Tabla 3.6 (*Resultados*, ver apartado 3.4.2) los valores de similaridad más altos en este estudio se encuentran entre individuos de las poblaciones Pichincha – Quiroga (grupo 12) y Manta – Puerto Cayo (grupo 15) revelando que dichos individuos pudieron haber descendido de pocas plantas de piñón mediante una acción antropogénica (Basha *et al.*, 2009). Esto puede llevar a la ocurrencia del fenómeno conocido como efecto fundador que es un caso extremo de deriva génica en donde se establece una población a partir de un grupo pequeño de individuos provenientes de una población más grande. El efecto fundador aumenta la homocigocidad en la población recién fundada (Slatkin, 2004; Mancera, 2007).

En cambio los valores más bajos de similaridad se muestran entre los individuos de la población Pedernales - Canoa Km 4 (grupo 4), lo que revela que estos individuos pueden tener orígenes distintos a los demás. Inclusive puede ser que el grupo 4 constituya el centro de origen de las demás poblaciones, sin embargo es necesario realizar investigaciones filogenéticas para poder aseverar esto de una manera concluyente.

La variabilidad genética (1 – similaridad) calculada para todos los individuos de las tres poblaciones analizadas fue de 28%, siendo éste un valor bajo comparado con el valor obtenido por Basha & Sujatha (2007) que fue 36%. De ello se asevera que la cantidad de variabilidad observada en conjunto de las tres poblaciones de Manabí, es moderada. Sin embargo, es preciso afirmar que el 60% de la variabilidad total corresponde a los individuos de la población Pedernales - Canoa Km 4 (grupo 4). La variabilidad genética baja en una especie que posee cruzamiento cruzado como es el caso de *Jatropha curcas* L. puede deberse a que se han cultivado individuos a lo largo del país mediante propagación vegetativa (Basha *et al.*, 2009), que es la forma más común de multiplicación de piñón en el Ecuador, debido a que las cercas vivas se construyen mediante estacas (Anzules, 2008; Muñoz y Jiménez, 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante los análisis de agrupamiento UPGMA y Njoin (*Resultados*, ver apartado 3.4.3) se determina que los individuos de la población Pichincha – Quiroga (grupo 12) y de la población Manta – Puerto Cayo (grupo 15) se agrupan muy cercanamente, a diferencia de los individuos de la población Pedernales - Canoa Km 4 (grupo 4) que se encuentran alejados de los demás individuos y formando dos grupos distintos. Esto indica que la mayoría de individuos tienden a agruparse de acuerdo a su población, a excepción de los individuos del grupo 4.

Estos resultados son corroborados con el análisis de componentes principales (ACP), el cual describe el 23.74% de variabilidad en el primer componente y el 10.92%

de variabilidad en el segundo componente formando 4 conjuntos bien definidos de individuos. Además se puede apreciar que los individuos de la población Pichincha – Quiroga (grupo 12) están muy agrupados entre sí junto con dos individuos de la población Manta – Puerto Cayo (grupo 15). La población de Manta – Puerto Cayo se encuentra menos aglomerada pero aún así forma un solo grupo junto con un individuo del grupo 4. A diferencia de los individuos de la población de Pedernales - Canoa Km 4, los cuales no se mantienen en un solo grupo sino más bien forman dos, con poca aglomeración, reiterando que los individuos de esta población son muy diferentes entre sí y entre los individuos de las otras dos poblaciones.

Es importante mencionar que los principales polinizadores de la especie *Jatropha curcas* L. son abejas *Apis* spp. (Divakara *et al.*, 2009), las cuales según Lienert (2002) muestran un recorrido de polinización específico de 20 km a la redonda. Además es preciso indicar que la población Pedernales - Canoa Km 4 (grupo 4) se encuentra cercana a cinco poblaciones de *Jatropha curcas* L. las cuales se localizan a 2.21, 10.26, 11.28, 19.3 y 21.35 km, respectivamente. La población Pichincha – Quiroga (grupo 12) se encuentra cerca de otra población a 20.66 km, a diferencia de la población Manta – Puerto Cayo (grupo 15), la cual está separada por 31.55 km de otra población de piñón (Anzules, 2008).

Los individuos de la población Pichincha – Quiroga y de la población Manta – Puerto Cayo al encontrarse cerca sólo de una población de piñón impiden que las abejas realicen la polinización y por ende que ocurra el flujo génico con individuos geográficamente distantes. Esto implica que ambas poblaciones pueden estar experimentando la autofecundación en la misma flor y entre flores vecinas, lo cual es muy común en grupos pequeños de plantas pues la probabilidad de aparearse entre individuos cercanos es alta (Griffiths *et al.*, 2005). Además, los niveles altos de endogamia aumentan la homocigocidad al igual que el efecto fundador. Esto se relaciona con la mediana variabilidad genética que tienen estas poblaciones según los resultados obtenidos. Varias investigaciones muestran que la homocigocidad conduce a una depresión endogámica en las plantas las cuales producen pocas flores, semillas



pequeñas y con bajo porcentaje de viabilidad, baja altura, tamaño pequeño de hojas o menor cantidad de biomasa, teniendo consecuencias directas en el vigor, fertilidad y rendimiento de cultivos agrícolas (Lienert, 2002; Gardner *et al.*, 2003). Es importante entonces correlacionar la información genética con la información morfológica del piñón, a fin de conocer si estas poblaciones están experimentando una depresión endogámica.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos mediante las distancias genéticas y los análisis de agrupamiento, la población Pedernales - Canoa Km 4 puede estar experimentando una reproducción al azar con otras poblaciones cercanas mediante los polinizadores. Además, a esto se suma la probabilidad de que estos individuos provengan de distintos orígenes y que la recombinación que ocurre en la meiosis aumente la variabilidad de los mismos (Griffiths *et al.*, 2005). Otra fuerza que induce a cambios en el ADN y por lo tanto a la variabilidad entre individuos son las mutaciones, pero su efecto en cualquier población es mínimo y puede ser detectado a lo largo de mucho tiempo, acumulando de esta forma consecuencias evolutivas considerables (Lienert, 2002; Gardner *et al.*, 2003). Sin embargo, en este caso consideramos que el cultivo de esta especie en las poblaciones analizadas tiene relativamente poco tiempo (Anzules, 2008), por lo que excluimos la mutación como responsable de la variabilidad alta encontrada en la población Pedernales - Canoa Km 4. Además, es preciso recalcar que los resultados obtenidos en esta investigación no fundamentan estas afirmaciones.

#### **4.3.3 Diferenciación genética y Test de Mantel**

La estructura genética de los individuos fue analizada mediante el AMOVA, el cual indica que el 67% de la variación total se debe a la variabilidad existente dentro de las poblaciones y el 33% corresponde a la variabilidad entre las 3 poblaciones de *Jatropha curcas* L. analizadas, lo que muestra que los individuos tienen una diferenciación poblacional moderada entre ellos (Dong *et al.*, 2007).

El coeficiente de endogamia o  $F_{IS}$  tiene valores que van desde -1 a +1, indicando exceso de heterocigocidad cuando el valor es negativo y mostrando homocigocidad cuando el valor es positivo (Gardner *et al.*, 2003). Según los resultados mostrados en la Tabla 3.8 (*Resultados*, ver apartado 3.4.4), la población que presenta mayor homocigocidad es Pichincha – Quiroga (grupo 12), seguida por la población Manta – Puerto Cayo (grupo 15) y por último la población Pedernales - Canoa Km 4 (grupo 4). Estos resultados indican que el grupo 12 es casi 2 veces más homocigoto que el grupo 15 y 10 veces más homocigoto que el grupo 4. Estos datos permiten cuantificar y reiterar los resultados discutidos anteriormente.

Los valores del índice de fijación o de  $F_{ST}$  menores a 0.05 indican diferenciación genética insignificante es decir no hay subdivisión en la población total debido a que ocurren apareamientos al azar, mientras que valores de  $F_{ST}$  mayores a 0.25 muestran una diferenciación genética muy grande dentro de la población analizada (Dorak, 2009). Los coeficientes  $F_{ST}$  y su análogo  $G_{ST}$ , resultantes de los análisis en este estudio muestran valores muy similares (0.327 y 0.291 respectivamente), que a su vez revelan una estructura poblacional demasiado marcada entre las poblaciones, discrepando así con los resultados del AMOVA, donde se obtuvo una diferenciación genética moderada.

Los valores obtenidos de  $F_{ST}$  y de  $G_{ST}$  pueden encontrarse sobreestimados y posiblemente no demuestran la verdadera situación de los individuos analizados. Esto se debe a que  $F_{ST}$  y  $G_{ST}$  se basan en las frecuencias alélicas, las mismas que no son calculadas con tanta veracidad, cuando se trabaja con marcadores dominantes (Bonin *et al.*, 2007). De acuerdo a los resultados obtenidos y a las consideraciones pertinentes podemos afirmar que este estudio determina una diferenciación genética moderada en los individuos y que una mayor diferenciación genética debe ser confirmada con marcadores codominantes (Guo *et al.*, 2007).

Esta moderada estructura poblacional puede justificarse con la migración a la que están expuestas las poblaciones de piñón. El nivel de flujo génico  $Nm$  es de 1.213, que según Dong *et al.* (2007) éste es un valor alto que muestra una importante migración entre las poblaciones. Esto concuerda con el valor de correlación  $R^2$  (0.4882) resultante del Test de Mantel, mediante el cual se determinó que no existe una relación entre las matrices de distancias genéticas y de distancias geográficas de los individuos, es decir ambas son independientes. En el caso del piñón la migración sucede principalmente por acciones antropogénicas que están sujetas a situaciones poco controladas, dispersando así, el material genético sin ningún patrón geográfico determinado, esto podría posiblemente justificar la poca relación obtenida con el Test de Mantel (Dong *et al.*, 2007). Li *et al.*, (2008) demuestra que existe una correlación bastante grande cuando se realiza el Test de Mantel en poblaciones que se encuentran muy bien establecidas y aisladas, es decir su tasa de migración es baja o casi nula, situación contraria a lo que podría estar sucediendo con *Jatropha curcas* L.

Los resultados del AMOVA se complementan con los resultados del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), de flujo génico ( $Nm$ ) y del Test de Mantel, lo que significa que el alto porcentaje de variación observado dentro de las poblaciones se debe al valor significativamente bajo de  $F_{IS}$  correspondiente al grupo 4, es decir la heterocigocidad alta de este grupo influye de gran manera en la estructura poblacional de los demás individuos del grupo 12 y 15 que poseen mayor homocigocidad. Además, esta diferenciación genética moderada puede deberse también al valor alto de flujo génico calculado ( $Nm$ ), que a la vez complementa los resultados obtenidos con el Test de Mantel. Los valores de  $F_{ST}$  y de  $G_{ST}$  no coinciden con los resultados descritos anteriormente, pues indican que los individuos analizados poseen una diferenciación genética bastante grande, lo cual se considera una desviación de la situación real de los individuos, tomando en cuenta la naturaleza de los marcadores dominantes.

#### 4.4 Naturaleza de los marcadores dominantes

De los tres posibles genotipos que se pueden encontrar en un organismo diploide, sólo dos de éstos (AA y Aa) son amplificados por los marcadores dominantes, mientras que los homocigotos recesivos (aa) no son amplificados, por lo que se los registra como ausentes. Es decir, la presencia de un fragmento ISSR indica que el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto, sin poder distinguirlos entre ambos. Esta limitación hace que el análisis de genética de poblaciones con marcadores dominantes no sea tan certero como con marcadores codominantes, los cuales sí diferencian entre los tres posibles genotipos (Hollingsworth & Ennos, 2004; Satovic *et al.*, 2004).

Esta restricción implica también que la obtención de frecuencias alélicas y de ciertos parámetros ( $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$ ,  $G_{ST}$ ,  $Nm$ ) que se calculan a partir de las mismas, sean deducidos e interpretados muy cuidadosamente, tomando en cuenta todas las hipótesis que se asumen previamente. Es decir, se debe considerar que el análisis asume un número infinito de poblaciones, las cuales tienen el mismo número de individuos. Además, la migración es igual para todas las poblaciones y no existe selección ni mutación (Bonin *et al.*, 2007).

Como vemos dichas situaciones son bastante hipotéticas, adicionándole a esto, las características que poseen los marcadores dominantes, el limitado número de primers ISSRs y la poca información histórica del piñón. A pesar de ello, los datos obtenidos son sumamente importantes pues nos permiten conocer aproximaciones de lo que está ocurriendo en realidad, en especial cuando existen pocos estudios genéticos preliminares, como es el caso de *Jatropha curcas* L.

La mayoría de trabajos moleculares de piñón muestran una alta variabilidad genética interespecífica (entre especies) dentro del género *Jatropha* (Ram *et al.*, 2008; Basha & Sujatha, 2009) y una baja variabilidad genética entre los individuos de *Jatropha curcas* L. (He *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Popluechai *et al.*, 2009), lo que implica que los resultados obtenidos en este estudio son muy relevantes pues muestran una variabilidad genética moderada en todos los individuos de piñón analizados, a diferencia de otros estudios. Cabe resaltar que de acuerdo a todos los análisis realizados, el grupo 4 (Pedernales - Canoa Km 4) es considerablemente diferente a los demás grupos, constituyendo una fuente importante de genes que pueden analizarse en posteriores investigaciones.

Además, es importante señalar que los resultados obtenidos en este estudio de variabilidad genética de *Jatropha curcas* L. no son precisamente los que se esperaban. Se debió encontrar poco o nada de variabilidad especialmente si consideramos que la propagación de esta especie se realiza principalmente por estacas. Sin embargo, las poblaciones manabitas analizadas, especialmente la población de Pedernales - Canoa Km 4, presentan una constitución genética compleja. Por lo que es necesario realizar estudios más profundos que sustenten estos resultados, para deducir la dinámica de las poblaciones de *Jatropha curcas* L. de una manera más confiable.