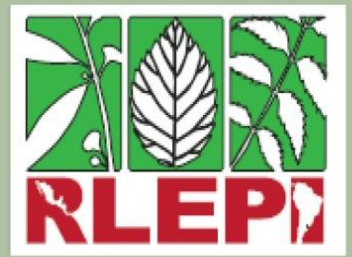


BOLETÍN  
DE LA



# RED LATINOAMERICANA PARA EL ESTUDIO DE PLANTAS INVASORAS

Volumen 2, Número 2



Boletín de la Red Latinoamericana para el Estudio de  
Plantas Invasoras  
Volumen 2, número 2  
Diciembre 2012

Editores

Ileana Herrera

Ramiro Bustamante

Silvia Ziller

Foto de la portada: Plantas y Flor de *Stapelia gigantea* invadiendo en zonas semi-áridas del norte de Venezuela (por: Jorge Vega)

Depósito Legal N° ppi201103MI713

## Ensayos preliminares con microsatélites de *Kalanchoe daigremontiana* sugieren baja variabilidad genética en localidades colonizadas en la Región Caribeña

ADRIANA GARCÍA – RIVAS<sup>1\*</sup>, GUSTAVO M. MORI<sup>2</sup>, JOSE GONZÁLEZ – CARCACÍA<sup>1</sup>, JULISSA ROJAS-SANDOVAL<sup>3</sup>, ANETE PEREIRA DE SOUZA<sup>2</sup>, JESÚS MAVÁREZ<sup>4</sup> y JAFET M. NASSAR<sup>1</sup>

1: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Laboratorio de Biología de Organismos, Centro de Ecología, Venezuela.

2: Universidade Estadual de Campinas, Laboratório de Análise Genética e Molecular, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Brasil.

3: Center for Applied Tropical Ecology and Conservation, University of Puerto Rico.

4: Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Laboratorio de Ecología y Genética de Poblaciones, Centro de Ecología, Venezuela.

\*[adrianagarci@gmail.com](mailto:adrianagarci@gmail.com)

Las invasiones de plantas constituyen una de las principales amenazas que afectan la biodiversidad y el funcionamiento de los ecosistemas (Richardson y Pyšek 2006; Ward *et al.* 2008); y a su vez, las actividades humanas constituyen uno de los factores catalizadores de los procesos de invasión más importantes (Elton 1958; Mooney y Hobbs 2000; Kolar y Lodge 2001; Keane y Crawley 2002). De hecho, en los últimos años, la tasa de invasiones biológicas se ha incrementado considerablemente debido al aumento del comercio y de la globalización de la economía (Miura 2007). Por lo tanto, uno de los más grandes retos que enfrentarán los organismos públicos y privados responsables de los asuntos ambientales a nivel mundial en las próximas décadas será el manejo y control de las especies de plantas invasoras.

Un aspecto que ha llamado la atención es que el éxito invasor de una planta no está necesariamente asociado a la presencia de elevada diversidad genética (Sakai *et al.* 2001). Por lo general, las especies invasoras, durante el proceso de introducción, experimentan uno o varios cuellos de botella poblacionales, generando así una fuerte reducción de la diversidad genética en las poblaciones al disminuir el número de genotipos introducidos y al actuar la deriva génica (Hartl y Clark 1997; Miura 2007). Esto se hace aún más evidente cuando dichas especies son transportadas por humanos y solo una muy pequeña fracción de la población fuente coloniza una nueva localidad (Hartl y

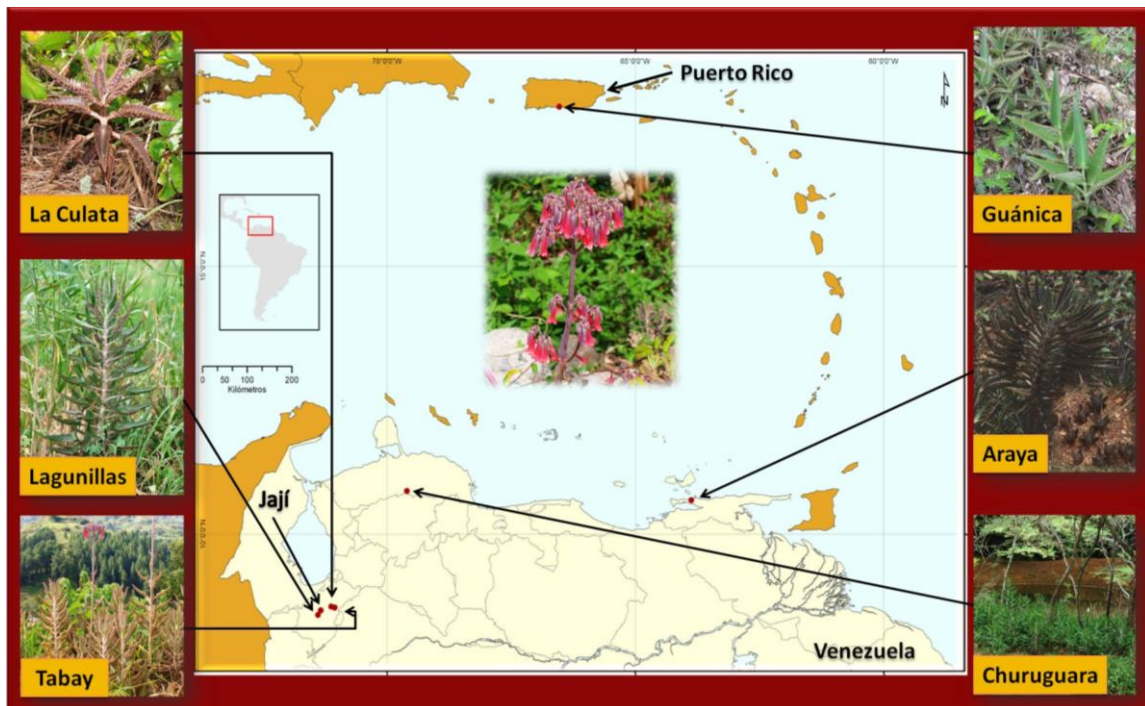
Clark 1997). Algunas de las soluciones potenciales a este dilema incluyen la reproducción asexual o la auto-fertilización, altas tasas reproductivas, la purga de alelos deletéreos que causan depresión por endogamia, o altas tasas de migración donde repetidas introducciones ocurren superando la baja diversidad genética y la endogamia (Frankham 2005).

No obstante lo anterior, conocer la magnitud de la variabilidad genética, así como su distribución espacial en ambientes invadidos, podría indicarnos el potencial evolutivo de las poblaciones invasoras y la probabilidad de generar resistencias ante un control biológico o ante el uso de herbicidas (Sakai *et al.* 2001; Allendorf y Lundquist 2003). Aún cuando la variación genética cuantitativa en los rasgos fenotípicos es requerida para la evolución adaptativa, el empleo de marcadores moleculares neutrales ha permitido hacer aproximaciones adecuadas de la variabilidad genética total y de cómo ésta cambia posterior a los eventos de introducción (Marrs *et al.* 2008). Dado que la tasa de cambios en respuesta a la selección natural es proporcional a la cantidad de variación genética existente (Fisher 1930), la heterocigosidad o diversidad alélica asociada a los marcadores moleculares neutrales examinados en una especie invasora puede ser indicativa de la cantidad de variabilidad genética presente en los loci que potencialmente podrían estar involucrados en la respuesta de dicha especie a un agente de control (Allendorf y Lundquist 2003). Los microsatélites constituyen uno de los marcadores moleculares empleados con mayor frecuencia en la actualidad en estudios de genética poblacional por tener un elevado grado de polimorfismo. Estos marcadores presentan altas tasas de mutación, lo cual permite diferenciar individuos estrechamente emparentados dentro de una población (Aranguren-Méndez *et al.* 2005; Zhang 2004). Usualmente son más variables que cualquier otro marcador molecular y, por lo tanto, permiten tener una mayor resolución para diferenciar las poblaciones nativas de las especies invasoras (Miura 2007).

El presente estudio forma parte de un proyecto de investigación que persigue examinar la diversidad y estructura genética de la especie invasora *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) en zonas áridas y semiáridas de Venezuela y en otros países tropicales invadidos, con el fin de estimar el potencial de evolución y adaptación de esta planta en ambientes áridos en la Región Caribeña. Específicamente, se tiene por objeto evaluar de forma preliminar la variabilidad genética de *K. daigremontiana* en algunas de las localidades. Se pretende también optimizar las condiciones metodológicas de amplificación de los microsatélites desarrollados para *K. daigremontiana* (Hannan – Jones *et*

al. 2005) y de evaluar su eficiencia para genotipar las muestras de los sectores invadidos.

Fueron colectadas muestras de tejido de 11 a 15 individuos de seis localidades dentro del territorio venezolano, Araya (Edo. Sucre), Churuguara (Edo. Falcón), Lagunillas (Edo. Mérida), Tabay (Edo. Mérida), La Culata (Edo. Mérida), Jají (Edo. Mérida) y 10 individuos de la localidad Guánica en Puerto Rico (Figura 1).



**Figura 1.** Ubicación de las poblaciones de *Kalanchoe daigremontiana* estudiadas en Venezuela y Puerto Rico.

De cada muestra se extrajo el ADN genómico del tejido de hojas jóvenes de *K. daigremontiana* siguiendo un protocolo basado en CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) de Doyle y Doyle (1990). Se evaluó la integridad y la concentración del ADN total por muestra mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % con una solución tampón TAE (1X). Para la tinción y revelado de los geles se empleó bromuro de etidio y una cámara con luz ultravioleta.

Se realizaron pruebas para optimizar las condiciones de amplificación de los nueve microsatélites previamente desarrollados para la especie y se evaluó su eficiencia para el genotipaje. Para ello se hicieron modificaciones en las concentraciones de ADN,  $MgCl_2$ , polimerasa y glicerol en las reacciones de cadena de la polimerasa (PCR) y en las condiciones de temperaturas más adecuadas para la amplificación de los cebadores, modificando los programas de PCR en gradiente o touchdown.

El rendimiento de los productos de las PCR fue evaluado mediante geles de agarosa al 3% en la solución tampón TBE 1X. Se registraron los genotipos por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (polyacrilamide gel electrophoresis, PAGE) en condiciones desnaturalizantes en una solución tampón TBE 1X. La tinción de los geles se hizo con nitrato de plata.

La diversidad genética para los nueve loci seleccionados se evaluó mediante los siguientes estimadores: porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ), número de alelos por locus ( $A$ ), por locus polimórfico ( $AP$ ), alelos efectivos ( $A_e$ ), alelos privados ( $A_p$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), así como el contenido de información polimórfica (PIC). Se emplearon los programas GenAlEx 6.41 (Peakall y Smouse 2006), Genepop en la web (<http://genepop.curtin.edu.au/>, Raymond y Rousset 1995), Popgene32 (Yeh *et al.* 1997) y Microsatellite Toolkit (Park 2001).

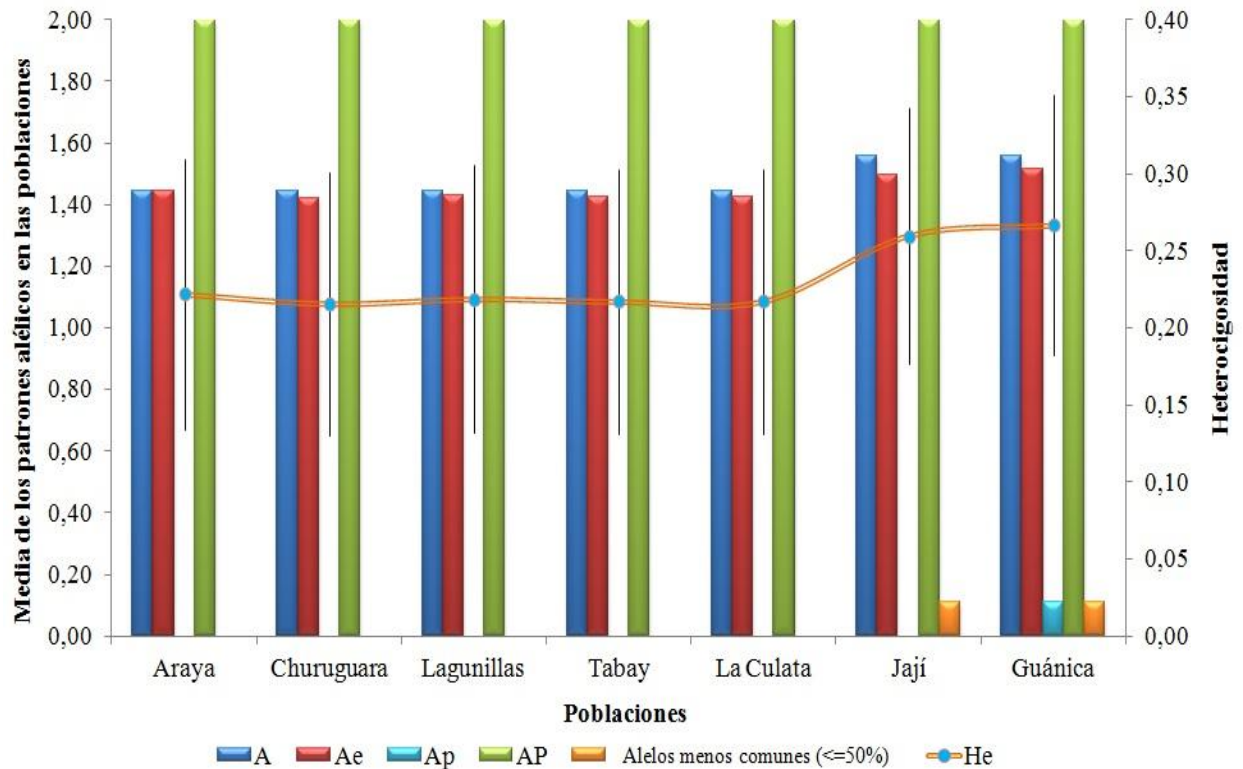
Los resultados indicaron que cuatro de las siete poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabay, Jají, La Culata y Guánica) y no hay desequilibrio por ligamiento entre los loci examinados ( $p > 0,05$ ). Esto indica que la reproducción sexual puede tener una contribución importante en estas localidades.

Se observó una tendencia clara hacia valores bajos de variabilidad genética a nivel de especie y a nivel poblacional en las localidades colectadas (Figura 2). Estos resultados son comparables con la especie hermana *Kalanchoe delagoense*, que posee una mayor riqueza de alelos de 3 a 13 alelos en Madagascar (zona de origen), 1 a 9 alelos en Australia (zona invadida) y valores de diversidad genética ( $H$ ) de 0,40 y 1,00 en cada localidad (Hannan – Jones *et al.* 2005).

Los niveles de información atribuidos a cada microsatélite, reflejados por el contenido de polimorfismo detectado de cada loci a través de todas las poblaciones, permiten evaluar si la información que aportan los microsatélites, es suficiente como para establecer comparaciones entre poblaciones, y si es un buen indicador de diferencias o no. Estos resultados indican que en líneas generales seis de los nueve loci son poco o moderadamente informativos (Figura 3).

Los resultados preliminares mostrados en la Tabla 1 sugieren que la invasión de *K. daigremontiana* en estas localidades pudiera estar reflejando diferentes escenarios del proceso de introducción: (a) múltiples introducciones de diferentes poblaciones fuentes; por ejemplo: Guánica, Jají y Culata, donde un alto porcentaje de los genotipos son únicos; (b) múltiples introducciones de diferentes poblaciones fuentes con un mayor intercambio entre ellas; por ejemplo: Churuguara, Lagunillas y Tabay, las cuales presentan un alto porcentaje de

genotipos repetidos entre las poblaciones; y (c) población originada de la combinación de los genotipos de todas las demás poblaciones; por ejemplo: Araya, donde el 100 % de los genotipos son repetidos pero solo con las poblaciones de Venezuela.

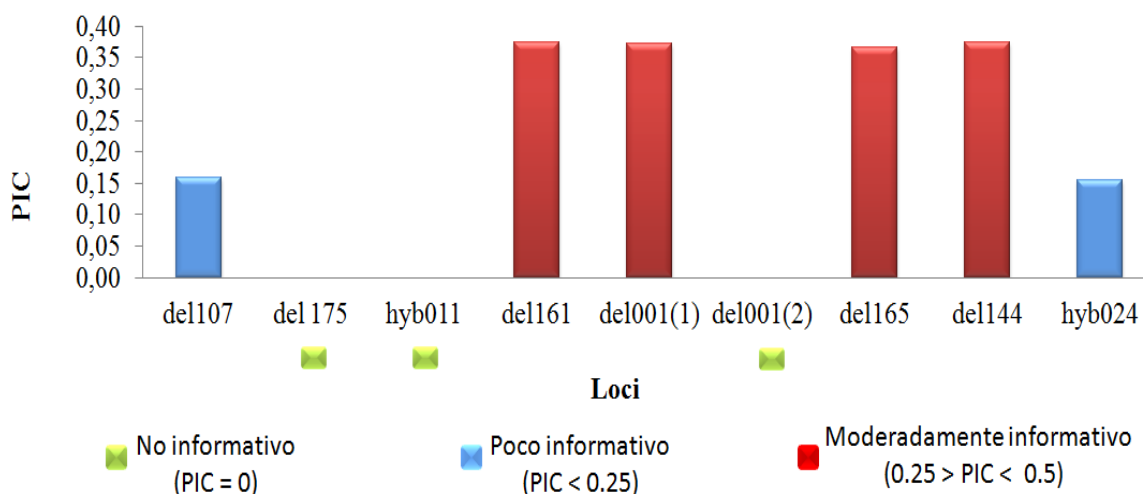


**Figura 2.** Variabilidad genética evaluada mediante los estimadores de porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ), número de alelos por locus ( $A$ ), por locus polimórfico ( $AP$ ), alelos efectivos ( $Ae$ ), alelos privados ( $Ap$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), en las poblaciones seleccionadas de Venezuela y Puerto Rico.

Es importante indicar que Guánica sólo comparte un genotipo con tres de las poblaciones de Venezuela (Jají, Tabay y Lagunillas). Esto pudiera ser interpretado como una evidencia de que hay una conexión histórica entre Venezuela y Puerto Rico. Sin embargo, no tenemos suficientes datos aun como para proponer la dirección del flujo de genes entre ambas localidades.

Las poblaciones de *K. daigremontiana* examinadas en la Región Caribeña presentan bajos niveles de variabilidad genética, posiblemente como resultado de un cuello de botella poblacional producto de uno o varios eventos fundadores. A pesar de ello, *K. daigremontiana* continua

propagándose exitosamente en la región, probablemente como resultado de la clonalidad característica de esta especie.



**Figura 3.** Contenido de Información Polimórfica (PIC) de cada locus analizado a partir de las muestras de *Kalanchoe daigremontiana* para todas las poblaciones.

**Tabla 1.** Número y proporción de genotipos observados en los individuos analizados de *Kalanchoe daigremontiana* dentro de cada población.

Poblaciones	N° G <sub>obs</sub>	N° G <sub>uni</sub> / N° G <sub>obs</sub>	N° G <sub>rep</sub> / N° G <sub>obs</sub>
Araya	7	0,00	100,00
Churuguara	9	33,33	66,67
Lagunillas	11	36,36	63,64
Tabay	11	45,45	54,55
Culata	12	58,33	41,67
Jají	11	63,64	36,36
Guánica	8	75,00	25,00

G<sub>obs</sub>= genotipos observados; G<sub>uni</sub>=genotipos únicos; G<sub>rep</sub>=genotipos repetidos.

La invasión de esta especie en Venezuela y Puerto Rico pudiera ser el producto de múltiples introducciones de diferentes poblaciones fuente. Este modelo de invasión podría explicar la variación genética encontrada en las dos regiones examinadas. Es posible que, aún



cuando la variabilidad genética disponible es baja, los genotipos introducidos en el Caribe le hayan conferido a esta planta parte de su capacidad para invadir en la región.

Para corroborar las tendencias sugeridas en este estudio, se requiere llevar a cabo ensayos adicionales para optimizar el PIC de cada locus, así como incrementar el número de muestras a analizar de otras aéreas invadidas en el Caribe.

### **Agradecimientos**

Al Programa de la Universidad de las Naciones Unidas/Biotecnología para América Latina y el Caribe (UNU-BIOLAC), por la beca otorgada para la pasantía en la Universidad de Campinas en Brasil. Al Laboratorio de Análisis de Genética Molecular de Campinas en Brasil, principalmente a Gustavo Maruyama Mori y la Dra. Anete Pereira de Souza. Al Dr. Jesús Mavárez y a la Msc. Carolaing Cabaldón del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por el suministro de reactivos y materiales, y por su colaboración en la preparación del material previo a la pasantía. A la Unidad de Ecología Genética (UEG) del IVIC, por permitir el uso de las instalaciones del laboratorio y a la institución como tal por brindar al apoyo necesario para llevar a cabo este trabajo.

### **Literatura citada**

- Allendorf FW y LL Lundquist. 2003. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. *Conservation Biology* 17:24-30.
- Aranguren-Méndez JA, R Román-Bravo, W Isea, Y Villasmil y J Jordana. 2004. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 13: 30-42.
- Doyle JJ y JL Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13.
- Elton CS. 1958. *The ecology of invasions by animals and plants*. Methuen and Co., London.
- Fisher RA. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon. 272 pp.
- Frankham R. 2005. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity* 94:385.
- Hannan-Jones MA, AJ Lowe, KD Scott, GC Graham, JP Playford y MP Zalucki. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from mother-of-

millions, *Bryophyllum delagoense* (Crassulaceae), and its hybrid with *Bryophyllum daigremontianum*, 'Houghton's hybrid'. *Molecular Ecology Notes* 5:770–773.

Hartl DL y AG Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3ra ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 542 pp.

Keane RM y MJ Crawley. 2002. "Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis" *Trends in Ecology and Evolution* 17:164–176.

Kolar CS y DL Lodge. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 199–204.

Marrs RA, R Sforza, RA Hufbauer. 2008. When invasion increases population genetic structure: a study with *Centaurea diffusa*. *Biological Invasions* 10:561–572.

Mooney HA y Hobbs RJ. 2000. *Invasive species in a changing world*. Island Press, Washington DC. USA. 457 pp.

Miura O. 2007. Molecular genetic approaches to elucidate the ecological and evolutionary issues associated with biological invasions. *Ecological Research* 22:876–883.

Park SDE. 2001. *Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic Effects of Selection*. Ph.D. thesis, University of Dublin.

Peakall R y PE Smouse. 2006. GENALEX (version 6.2): genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288–295.

Raymond M y F Rousset. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.

Richardson DM y P Pyšek. 2006. Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invasibility. *Progress in Physical Geography* 30:409–431.

Sakai AK, FW Allendorf, JS Holt, DM Lodge, J Molofsky, KA With, S Baughman, RJ Cabin, JE Cohen, NC Ellstrand, DE McCauley, P O'Neil, IM Parker, JN Thompson y SG Weller. 2000. The Population Biology of Invasive. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32: 305–332.

Yeh FC, RC Yang, TBJ Boyle, ZH Ye y JX Mao. 1997. *POPGENE32 (version 1.32): the user-friendly shareware for population genetic analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

Ward SM, JF Gaskin y LM Wilson. 2008. Ecological Genetics of Plant Invasion: What Do We Know? *Invasive Plant Science and Management* 1:98–109.

Zhang DX. 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *TRENDS in Ecology and Evolution* 19:507–509.