

Caracterización molecular de zarzaparrilla (*Smilax regelli* y *Smilax vanilliodora*)

Johnny Peraza M.¹
Claudia Zúñiga V.²
Tomás Palma Z.³

Los resultados obtenidos con las pruebas de las condiciones de las electroforesis para especies de Smilax son satisfactorios. Tanto los buffers de extracción como los de electroforesis utilizados permiten el análisis poblacional con este tipo de muestras.

Palabras clave

Smilax, isoenzimas, RAPD, zarzaparrilla, *S. regelli*, *S. vanilliodora*

Resumen

El género *Smilax* es un grupo taxonómicamente complicado, por lo que se consideró necesario incursionar en el análisis bioquímico (isoenzimas) y molecular (RAPD) para aclarar el panorama filogenético de las “especies” que tradicionalmente se han clasificado como *S. vanilliodora* y *S. regelli*, con fines de explotación futura de sus ingredientes activos.

Los resultados obtenidos con las pruebas de las condiciones de las electroforesis para especies de *Smilax* son satisfactorios. Tanto los *buffers* de extracción como los de electroforesis utilizados permiten el análisis poblacional con este tipo de muestras.

El análisis de distancias genéticas resultado de las electroforesis no indican al menos alguna relación de grupo, de acuerdo con la clasificación inicial. Una relación que pareciera indicar el dendograma se refiere, sobre todo, a las muestras colectadas en el bosque, las cuales tendieron a formar un solo grupo independiente: si eran *S. regelli* o *S. vanilliodora* (según clasificación morfológica inicial).

Los resultados obtenidos con PAPD, específicamente con los imprimadores CO-01, A-09, A-01, E-01 y E-03, no permiten establecer diferencias entre las supuestas especies diferentes de *S. vanilliodora* y *S. regelli*, lo que está de acuerdo con lo propuesto por Ferrufino (2003), quien considera que *S. regelli* es probablemente un isolectotipo de *S. grandifolia* y la descarta como otra especie del género.

Introducción

Smilax (*Smilacaceae*) es un género muy diverso, que se localiza en zonas

1 Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: jperaza@itcr.ac.cr
2 Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: czuñiga@itcr.ac.cr
3 Escuela de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica

templadas, tropicales y subtropicales del mundo (Huft 1994; Judd *et al.* 2002). En Costa Rica, se le han asignado entre 13 y 14 especies, sin existir consenso entre los investigadores sobre el verdadero número de especies presentes (Standley 1937; Huft 1994). Recientemente, Ferrufino (2003) en un estudio morfológico y fenológico detallado, reduce a siete las especies del país. También indica que las especies presentes se caracterizan por ser bejucos leñosos o herbáceos, dioicos de pequeña y mediana longitud, con hojas simples, alternas, glabras o pubescentes, con un pecíolo bien diferenciado y cuyos frutos son bayas globosas, que varían de tamaño entre los bejucos de la misma especie.

A *Smilax*, también conocida como cuculmecayzarzaparrilla, se le han asignado numerosas propiedades medicinales, relacionadas con infecciones de la piel y los riñones, problemas estomacales y artritis, entre otras (Ocampo 1994, Gupta 1995). Lamentablemente, existe mucha desinformación sobre las especies a las que se les han asignado propiedades particulares, lo que representa un gran obstáculo para comercializar la especie, así como para utilizarla en las investigaciones que apoyan la reforestación y protección de áreas naturales, como es el caso del programa de “Desarrollo de sistemas de manejo de productos no maderables del bosque”, que se realiza en el Instituto Tecnológico de Costa Rica desde hace varios años.

En esta investigación, se trató de diferenciar por métodos basados en proteínas y análisis de ADN, las “especies” que tradicionalmente se han clasificado como *S. vanilliodora* y *S. regelli*, con fines de explotación futura de sus ingredientes activos.

Una de las técnicas utilizadas fue el análisis de isoenzimas, el cual se escogió porque permite establecer directamente relaciones genéticas de los patrones de bandas observados; asimismo, porque es una técnica relativamente barata y

accesible, que permite evaluar parámetros como frecuencias genotípicas y alélicas (Kreutzer *et al.* 1983).

También se aplicó el análisis de RAPD, desarrollado por Williams y colaboradores (1990), porque es un protocolo rápido y sencillo, que no requiere información previa de las secuencias del organismo de interés. Además, utiliza cantidades mínimas de ADN para el análisis genotípico de un individuo y no requiere instalaciones sofisticadas de laboratorio (Grattapaglia *et al.* 1995).

Estas técnicas se han utilizado mucho para la elaboración de mapas genéticos, determinar la variabilidad genética del grupo de interés y estudios de distribución de las diferentes poblaciones, orientados hacia la conservación de especies comerciales, así como de especies nativas en peligro de extinción (Parker *et al.* 1998). Cuando se conoce la variabilidad genética de las poblaciones, se pueden desarrollar programas para proteger a las especies de la homogeneidad genética, aumentar la fortaleza contra los cambios ambientales o la aparición de nuevas plagas y para mantener bancos de genes de las especies de interés. En este caso en particular, la desaparición acelerada de los bosques tropicales justifica que se investigue sobre plantas no maderables, que están sufriendo grandes pérdidas en su diversidad genética. Dicha Información podría tener importancia para ayudar a conservar el bosque y servir como fuente de ingresos, si se da un manejo sostenible (Grattapaglia *et al.* 1995; Xiaomei, 1999).

Estos marcadores también permiten describir los patrones genéticos que se dan en las poblaciones, así como analizar su estatus ecológico. Y proveen información que contribuye a dilucidar los procesos evolutivos de las poblaciones de plantas y a orientar las estrategias de conservación de las especies (Cruzan 1998).

En esta investigación, se trató de diferenciar por métodos basados en proteínas y análisis de ADN, las “especies” que tradicionalmente se han clasificado como S. vanilliodora y S. regelli, con fines de explotación futura de sus ingredientes activos.

Materiales y métodos

Análisis de isoenzimas

Recolección de muestras

Muestras foliares de diferentes individuos de *Smilax* se colectaron en San Carlos, Alajuela. Un grupo de muestras se obtuvo del bosque ubicado en la zona y otro grupo se tomó de la colección que se mantiene en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en San Carlos. Las muestras se colocaron inmediatamente en bolsas plásticas humedecidas y se

mantuvieron en hielo hasta que se llevaron al laboratorio. Posteriormente, se efectuó el procesamiento de las muestras.

Prueba y selección de buffer de extracción

Se realizaron extracciones iniciales con dos diferentes protocolos de *buffer* de extracción (Cuadro 1). Estas extracciones se comprobaron por medio de electroforesis, utilizando dos diferentes sistemas enzimáticos.

Cuadro 1

Recetas de los *buffer* de extracción examinados.

Buffer de extracción	Receta	Fuente
Buffer N° 1	Tris-HCl, pH 8.3 0.05M Sacarosa 20% PVP-40 5% Tritón X-100 0.5% 2-mercaptoetanol 0.1%	CATIE
Buffer N° 2	Tris HCl 1M pH 7,8 al 0.5 % Glicerol 20% 2-mercaptoetanol 0.4% PVP-40 5%	

Evaluación de soluciones amortiguadoras para la electroforesis

Se evaluaron dos tipos de soluciones amortiguadoras, sugeridas por Soltis y Soltis (1989) (Cuadro 2).

Preparación de las muestras para electroforesis

Las muestras foliares se maceraron con aproximadamente el doble del volumen

del *buffer* de extracción (Tris HCl 1M pH 7,8 al 0.5 %, Glicerol al 20%, 2-mercaptoetanol al 0.4%, PVP-40 al 5%), en nitrógeno líquido. Una parte del extracto resultante se usó para las evaluaciones electroforéticas y otra parte fue almacenada a -20° C. En el momento de la corrida electroforética, las muestras se centrifugaron y se mantuvieron en hielo hasta que se colocaron en el gel respectivo.

Cuadro 2

Soluciones amortiguadoras de corrida y gel utilizadas en la electroforesis.

Nombre	Amortiguador del electrodo	Amortiguador del gel	Sistemas que se pueden visualizar
Tris - Citrato	0.148 M tris, 0.047 M ácido cítrico. pH 7.03	11 – 12% concentración, 0.038 M tris, 0.012 M ácido cítrico	PGI, PGM, IDH, MNR, SKDH, MDH, 6-PGDH, ADH
Morfolina citrato	Ácido cítrico 7.7 g, morfolina 10 ml, agua dest. 1 litro, pH 6.1	9 – 10% concentración, 0.065 M I – Histidina, 0.0057 M ácido cítrico. pH 6.5	PGI, PGM, IDH, MDH, 6 – PDG, ADH, MNR, SKDH

Electroforesis de isoenzimas en geles de almidón

La preparación del gel de almidón se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido por Araya (2001), a una concentración del 10%. Los amortiguadores utilizados se muestran en el Cuadro 1. Estos amortiguadores se evaluaron con la finalidad de escoger el que brinde resultados más satisfactorios.

Las soluciones de tinción utilizadas en cada sistema fueron las siguientes: para **MNR** 10 ml de Tris – HCl 0.08 M pH 8.0, 10 mg NADH, 10 mg menadiona, 1 ml MTT; **GPI**: 10 ml de Tris – HCl 0.08 M pH 8.0, 10 mg NADP, 0.5 ml MgCl₂, 30 mg fructuosa - 6 – fosfato, 7 unidades glucosa – 6 – fosfato deshidrogenasa, 1 ml MTT, 1 ml PMS; **PGM**: 10 ml de Tris – HCl 0.08 M pH 8.0, 10 mg NADP, 0.5 ml 0.5 ml MgCl₂, 50 mg glucosa – 1 – fosfato, 7 unidades glucosa – 6 – fosfato, 1 ml MTT, 1 ml PMS; **MDH**: 10 ml de Tris – HCl 0.08 M pH 8.0, 10 mg NADP, 0.5 ml MgCl₂, 70 mg ácido málico, 1 ml MTT, 1 ml PMS; **6PGDH** 10 ml de Tris

– HCl 0.08 M pH 8.0, 0.5 ml MgCl₂, 5 mg de ácido 6-fosfogluconico, 10 mg NADP, 1 ml MTT, 1 ml PMS.

Análisis de RAPDs

Extracción del ADN

Se colectaron muestras foliares de cinco individuos de la especie *Smilax vanilliodora* provenientes de CoopeSanJuan, así como de 5 especímenes *in vitro*, de *S. regelli*, multiplicados en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico, ubicado en Santa Clara. Las muestras frescas se colocaron inmediatamente en bolsas plásticas y se mantuvieron en hielo en escamas hasta que se llevaron al laboratorio.

El ADN se extrajo de 0.5 g de material vegetal por el método Dellaporta *et al.* (1983). Los botones obtenidos se resuspendieron en 50ul de agua destilada y se congelaron a -20 °C.

Amplificación del ADN de las plantas

Se utilizaron las siguientes mezclas de reactivos para los PCRs: 2.0 ul MgCl₂,

2.0ul de dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 2.5mM cada uno: 5 ul a 10mM de cada imprimador, 0.3ul *Taq* polimerasa (Promega, EE.UU.), 2.5 ul del tampón 10x (Promega, EE.UU.), 8.2 ul de agua bidestilada estéril y 5ul de la muestra. El volumen total de la reacción fue de 25 ul. El ADN viral se amplificó en un termociclador Genius Buch & Hdm A/S por 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 C por 180 segundos, 40 ciclos de 94 C por 60seg, 35 C por 60 seg y 72 C por 120 seg, y un ciclo final de 72 C por 7 minutos en el termociclador Bio Rad. Los imprimadores utilizados fueron A-01, A-09, CO-01, CO-02, E-01 y E-03 de Operon Technologies, Inc (California). Se utilizó como control negativo agua destilada y como control positivo una muestra de raicilla (*Psychotria ipecacuanha*).

Detección de similitudes y diferencias entre individuos en un gel de agarosa

Los fragmentos de ADN amplificados se analizaron por la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1.4%, en tampón TAE 0.5X (tris borato, EDTA pH 8, 0.5M), a voltaje constante de 100v, durante 1 hora (Sambrook *et al.* 1989). A 5ul de

la muestra se le adicionó 1ul de tampón de carga de 6x (gliceroal al 5%, azul de bromofenol al 0.005% y xileno de cianol al 0.05%). Las bandas de ADN de los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio al 0.5ug/ml diluido con agua (Gibco BRL ®, EE.UU.), el cual, si se une al ADN, es fluorescente bajo la luz ultravioleta. Las bandas se visualizaron en un transiluminador ultravioleta de alta longitud de onda (300nm). Se tomó una fotografía utilizando una cámara digital Epson PC3100Z. La información obtenida fue analizada, con el propósito de encontrar diferencias entre las bandas.

Resultados y discusión

Análisis de isoenzimas

Evaluación de Buffer de extracción

En términos generales, las dos recetas de *buffer* de extracción utilizadas mostraron adecuados patrones de bandas, para realizar evaluaciones con el género *Smilax*. Sin embargo los resultados muestran una mejor resolución y definición de las bandas con el *buffer* 2 (Cuadro 1). Por esto, se consideró conveniente utilizar este tipo de *buffer* para el resto de los análisis.

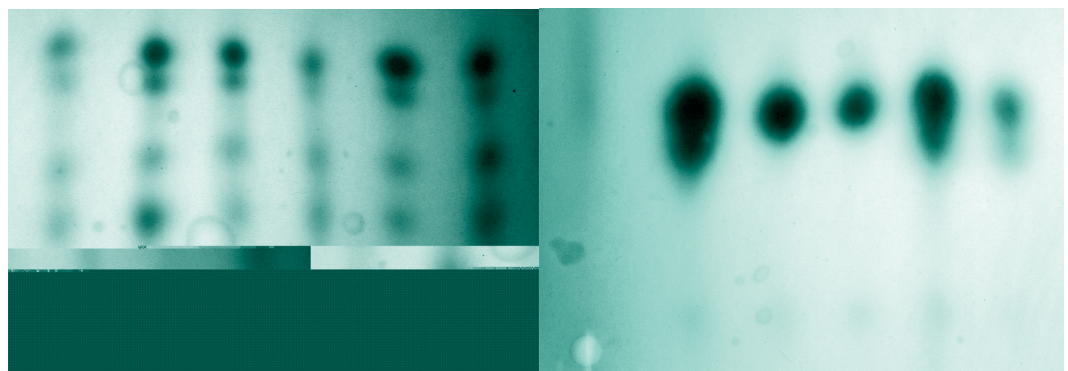


Figura 1

Electroforesis de isoenzimas con muestras de *Smilax* sp., que muestran diferentes patrones de bandas obtenidos con el buffer de electroforesis Tris-Citrato.

Evaluación de amortiguadores y electroforesis de isoenzimas

El objetivo de esta evaluación fue verificar cuál de los dos tipos de amortiguadores brindaba resultados más adecuados, de acuerdo con nuestras condiciones de trabajo. Los resultados de las tinciones indicaron que el *buffer* **Tris-Citrato** trabajó mejor que el **Morfolina-Citrato** (Fig. 1).

Las muestras utilizadas en el análisis electroforético fueron obtenidas de dos fuentes principales: la colección que se mantiene en las instalaciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en su sede en San Carlos, y el bosque localizado en CoopeSanJuan. Dichas muestras se clasificaron por sus características morfológicas como *S. regelli* o como *S. vanilliodora* (Cuadro 3).

Cuadro 3		
Muestras de Smilax sp. utilizadas en el análisis electroforético		
Codigo	Clasificación	Procedencia
VIC	<i>S. vanilliodora</i>	Colección ITCR
V2C	<i>S. vanilliodora</i>	Colección ITCR
V3C	<i>S. vanilliodora</i>	Colección ITCR
V4C	<i>S. vanilliodora</i>	Colección ITCR
V5M	<i>S. vanilliodora</i>	Bosque CoopeSanJuan
V6M	<i>S. vanilliodora</i>	Bosque CoopeSanJuan
V8M	<i>S. vanilliodora</i>	Bosque CoopeSanJuan
V9M	<i>S. vanilliodora</i>	Bosque CoopeSanJuan
V10M	<i>S. vanilliodora</i>	Bosque CoopeSanJuan
R1C	<i>S. regelli</i>	Colección ITCR
R2C	<i>S. regelli</i>	Colección ITCR
R3C	<i>S. regelli</i>	Colección ITCR
R4C	<i>S. regelli</i>	Colección ITCR
R5C	<i>S. regelli</i>	Colección ITCR
R6M	<i>S. regelli</i>	Bosque CoopeSanJuan
R7M	<i>S. regelli</i>	Bosque CoopeSanJuan

Las representaciones diagramáticas de los resultados obtenidos de las electroforesis se exponen en el Cuadro 4. Las distancias genéticas entre las muestras analizadas

fueron calculadas según el análisis de Jaccard, utilizando el programa INFOSTAT. El dendograma obtenido se muestra en la Figura 2.

Cuadro 4

Representación diagramática de las electroforesis obtenidas con las muestras de Smilax sp.

	V1C	V2C	V3C	V4C	V5M	V6M	V8M	V9M	V10M	R1C	R2C	R3C	R4C	R6M	R7M	R5C
GPI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDH	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MNR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

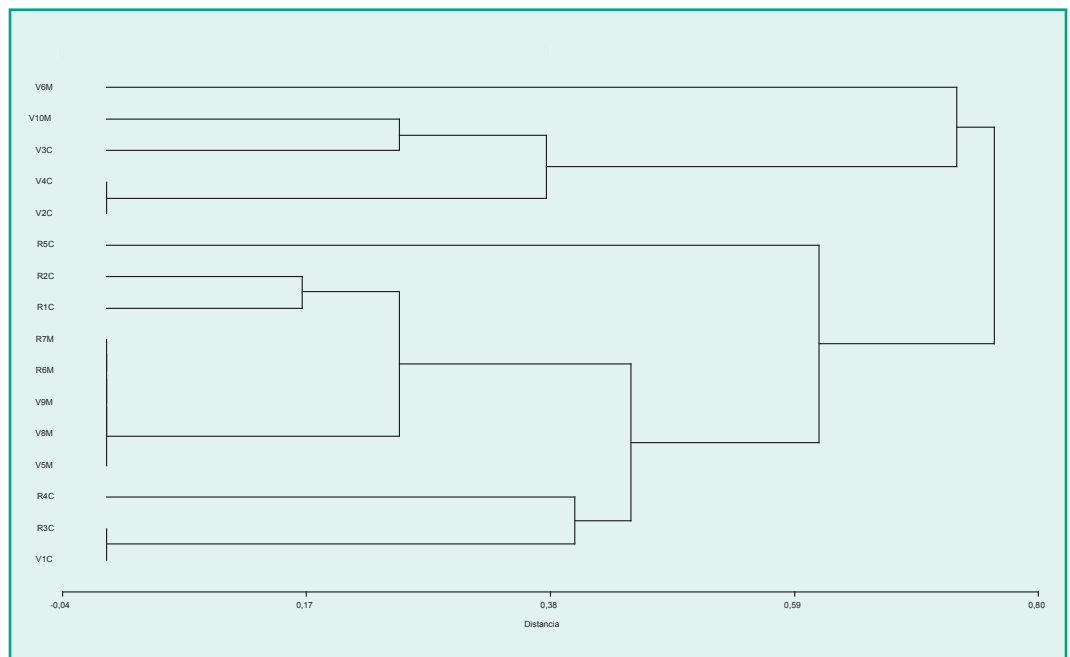


Figura 2
Dendrograma basado en el análisis de distancia genética de Jaccard con las muestras de Smilax sp.

El género *Smilax* es un grupo taxonómicamente complicado. Ésta es una de las razones por las cuales se considera necesario incursionar en su análisis bioquímico y molecular, para aclarar el panorama filogenético de las especies involucradas.

Los resultados obtenidos con las pruebas de las condiciones de las electroforesis para especies de *Smilax* son satisfactorios. Tanto los *buffers* de extracción como los de electroforesis utilizados permiten el análisis poblacional con este tipo de muestras.

Entre los factores más importantes que influyeron en los resultados de esta parte del estudio se cuenta lo referente a la toma e identificación de las muestras. Inicialmente, eran especímenes de campo, que tenían que ser debidamente clasificadas como muestras de *S. regelli* o como *S. vanilliodora*. Con base en

esta clasificación por morfología, se asignaron los grupos que se muestran en el Cuadro 3. Sin embargo, el análisis de distancias genéticas resultante de las electroforesis no indica ninguna relación de grupo, de acuerdo con la clasificación inicial. Una relación que pareciera indicar que el dendograma se refiere, sobre todo, a las muestras colectadas en el bosque, las cuales tendieron a formar un solo grupo, con independencia de si se consideraron como *S. regelli* o *S. vanilliodora* (según la clasificación morfológica inicial).

Análisis de RAPDs

Para lograr un análisis representativo de RAPD, se debe disponer al menos de siete ejemplares por especie. En esta oportunidad, fue bastante delicado obtener las muestras, principalmente por las dificultades que existen de localizar expertos para clasificar las especies.

Cuadro 5	
Tipo de amplificación obtenida con los imprimadores utilizados para caracterizar a <i>S. regelli</i> o <i>S. vanilliodora</i>	
Imprimador OP	Tipo de amplificación
CO-01	No polimórfico
A-09	No polimórfico
A-01	No amplifica
E-01	No amplifica
E-03	No amplifica

Como se observa en el Cuadro 5 y en la Figura 3, los resultados obtenidos con los imprimadores CO-01, A-09, A-01, E-01 y E-03 no permiten establecer diferencias entre *S. vanilliodora* y *S. regelli*. No obstante, los resultados no

son concluyentes, porque en este tipo de análisis se acostumbra utilizar un número mayor de imprimadores. Villalobos (2000), por ejemplo, manipuló 28 imprimadores con la técnica de RAPDs para tres especies forestales.

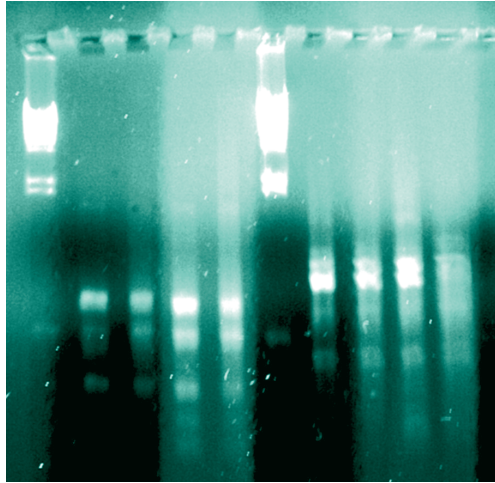


Figura 3

Análisis electroforético de muestras de *S. vanilliodora* y *S. regelli* amplificadas por la técnica de RAPD. Carril 1 Marcador de peso molecular (MPM), carril 2 y 3 *S. vanilliodora*, carril 4 y 5 *S. regelli*, utilizando el imprimador OPE A09. Carril 6 MPM, carril 7 y 8 *S. vanilliodora* y carril 9 y 10 *S. regelli*, utilizando el imprimador CO-01.

Sin embargo, estos resultados están de acuerdo con lo propuesto por Ferrufino (2003), quien hizo un estudio morfológico, filogenético y fenológico de ese género en Costa Rica y consideró que *S. regelli* es probablemente un isolectotipo de *S. grandifolia* y la descarta como otra especie del género, por lo que podría suponerse que la especie que se colectó fue únicamente *S. vanilliodora*.

Bibliografía

Cruzan, M.B. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology* 79(2):400-412.

Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.

Ferrufino A, L. 2003. Estudio morfológico, filogenético y fenológico de *Smilax* L. (Smilacaceae) en Costa Rica, con implicaciones sistemáticas. Tesis Magister Scientiae. Universidad de Costa Rica. 113 p.

Grattapaglia, D.; Bertolucci, F.L.; Sederoff, R.R. 1995. Genetic mapping of QTLs controlling vegetative propagation in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross strategy and RAPD markers. *Theor Appl Genet* (1995) 90:933-947

Guptag; M. P. 1995. Plantas medicinales iberoamericanas. CYTED-SECAB. Ed. Presencia Ltda. Colombia.

Huft, M.J. 1994. Smilacaceae. En: Davidse, G.; Sousa, M.; Arthur, S.; Chater, O. Ed. *Flora Mesoamericana*. p: 6-25.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P.F. 2002. *Plants systematics. A phylogenetic approach*. Sinauer, Publisher Sunderland. USA

Kreutzer, R.D., M.E. Semko, L.D. Hendricks y N. Wright. 1983. Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *Am.J.Trop.Med. Hyg.* 32:703-715.

Ocampo, R. A. 1994. Domesticación de plantas medicinales en Centro América. Colección Diversidad Biológica y Desarrollo Sustentable I. Especies Nativas. Turrialba, Costa Rica.

Parker, P. G.; Snow, A.A.; Schug, M.D.; Booton, G.C.; Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79 (2):361-382.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2 Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Book.

Soltis, D.E. y P.S. Soltis. 1989. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Oregon. 267pp.

Standley, P. C. 1937. *Flora of Costa Rica*. Fiel Mus. Nat. Hist. Bot. 8: 171-174

Villalobos B., H. 2000. Análisis genético molecular de tres valiosas especies nativas maderables de Costa Rica. Tesis Magister Scientiae. Universidad de Costa Rica. 109 pg.

Williams, J. G. K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids. Res.* 18: 6531-6535

Xiaomei, Z.; Rufa, L.; Jianping, H.; Rouru, C.; Jiangtao, Z.; Wenbin, L. 1999. Optimizing the Generation of Random Amplified Polymorphic DNAs in Buckwheat. Institute of Genetics, Beijing, China.