

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Rubus glaucus* Benth CON MARCADORES MOLECULARES (RAPD)

GENETIC DIVERSITY CHARACTERIZATION OF *Rubus glaucus* Benth USING MOLECULAR MARKERS (RAPD)

Marta Leonor Marulanda¹ y María del Pilar Márquez¹

Resumen

Se estudiaron 44 accesiones de *Rubus glaucus* y 15 de *Rubus* sp., mediante marcadores RAPD, con el fin de calcular los índices de similitud entre las dos especies y analizar la variabilidad intraespecífica. Los doce cebadores seleccionados produjeron 38 bandas polimórficas con pesos moleculares entre 0.805 y 11.501 Kb. El análisis RAPD permitió diferenciar las dos especies, las cuales evidencian 55% de similitud. El grupo formado por *R. glaucus* presenta índices de similitud altos; fue posible agrupar las procedencias por regiones geográficas, lo que evidenció también que hay variación entre individuos dentro de las procedencias.

Palabras clave: *Rubus glaucus*, mora de Castilla, diversidad genética, marcadores moleculares, RAPD.

Abstract

Forty four accessions of *Rubus glaucus* and fifteen of *Rubus* sp. were examined with RAPD markers, in order to calculate the similarity coefficients between the two species and to evaluate the intraspecific variability. The twelve primers used for the evaluation gave thirty eight polymorphic bands with molecular weights between 0.805 and 11.501 Kb. The RAPD analysis allowed to differentiate the two species which a similarity of 55%. The group formed by *R. glaucus* showed high similarity, it was possible to grupe the provenances by geographic areas, and was clear that there is variation between individuals within the provenances.

Key words: *Rubus glaucus*, blackberry, genetic diversity, molecular markers, RAPD.

INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* es uno de los más diversos del reino vegetal. Comprende cerca de 500 especies altamente heterocigotas, su nivel de ploidía va desde diploides hasta dodecaploides y la mayoría son apomíticas. Ha sido subdividido en doce subgéneros y sólo algunos de ellos han sido domesticados. Al subgénero *Idaeobatus* pertenecen los "raspberries", que se distribuyen en Europa y Norteamérica (Graham y McNicol, 1995), y al subgénero *Rubus* pertenecen los blackberries, que se distribuyen en el centro y el norte de Europa (Nybon y Kraft, 1995).

La mora de Castilla (*Rubus glaucus*), nativa de los Andes tropicales, es una especie que combina características de los subgéneros *Idaeobatus* y *Rubus*, y es además un anfidiplóide fértil (Jennings, 1988).

El desarrollo de la biología molecular ha dado como resultado mayor entendimiento de las relaciones entre especies del género *Rubus*, acertada clasificación taxonómica y mayor habilidad para identificar especies y cultivares. Estas técnicas también permiten entender y utilizar mejor la di-

Recibido: septiembre de 2000; aprobado para publicación: enero de 2001.

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, apartado 97. E-mail: ubioteve@andromeda.utp.edu.co.

versidad genética por parte de los mejoradores (Graham y McNicol, 1995).

La clasificación de especies y cultivares del género *Rubus*, basada en caracteres morfológicos, puede ser difícil debido a las características botánicas de la especie. Técnicas como las isoenzimas no han sido una herramienta útil (Cousineau y Donnelly, 1989). Otros marcadores, como las sondas de ADN de cloroplastos, tampoco fueron eficientes en detectar la variación en cultivares de raspberry (Waugh *et al.*, 1990), y los minisatélites de ADN y los RFLP, aunque son marcadores muy informativos, requieren el uso de radioisótopos (Nyborg y Kraft, 1995; Graham y McNicol, 1995).

Entre los diferentes marcadores moleculares conocidos, los RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) son muy útiles para desarrollar huellas digitales de ADN cuando se requiere identificar variedades dentro de una especie, determinar el parentesco de un material de mejoramiento, y caracterizar y clasificar el material clonal obtenido por el cultivo *in vitro* (Karp *et al.*, 1997). Se conocen varios trabajos sobre la caracterización molecular en el género *Rubus* con marcadores RAPD, como los realizados por Parent y Fortin (1993), quienes estudiaron quince genotipos de *R. idaeus* del programa de certificación de la provincia de Quebec utilizando diecinueve cebadores seleccionados al azar, y Parent y Page (1998), que estudiaron trece cultivares de *R. idaeus* y dos de *R. occidentalis* empleando cinco cebadores, con los cuales obtuvieron marcadores RAPD polimórficos.

Graham y McNicol (1995) realizaron una revisión de la clasificación taxonómica del género, para lo cual utilizaron veinticuatro accesiones pertenecientes a trece especies de tres subgéneros (*Idaeobatus*, *Eubatus*, *Anoplobatus*), y todos los cebadores empleados fueron polimórficos. Graham *et al.* (1997a, 1997b) analizaron la variabilidad genética presente en poblaciones cultivadas de *R. idaeus* y las compararon con la variabilidad en poblaciones naturales en Escocia, utilizando cinco cebadores arbitrarios.

La mora de Castilla es una especie que se distribuye en Colombia y Ecuador y ha sido objeto de un creciente interés por parte de la industria de jugos en Colombia. La Corporación de Investigación Agrícola Colombiana (Corpoica) viene realizando esfuerzos de colecta y estudio del germoplasma presente en nuestro país, y en la Regional 9 en el departamento de Caldas se tiene establecido un banco de germoplasma de *R. glaucus* que cuenta con accesiones colombianas, provenientes de diferentes localidades.

Esta investigación se desarrolló con el fin de aplicar modernas técnicas de biología molecular al estudio de la diversidad genética de la mora, para tener mejor aprovechamiento de la especie y su futura conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de diversidad genética del banco de germoplasma de *R. glaucus* de Corpoica Caldas, se seleccionaron 40 accesiones de ocho procedencias, colectadas en municipios de los departamentos de Risaralda (Guática y Quinchía); Caldas (Riosucio, Anserma, Manzanares y Pácora) y Antioquia (Guarne y San Antonio) (figura 1), y quince accesiones de tres procedencias de *R. sp.* sin espinas (Thornless) cv Jumbo, Evergreen y Black satin. Se colectaron muestras de cinco individuos o accesiones por procedencia.

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN se usó el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), modificado por Gonzales *et al.* (1995). Los ADN totales se visualizaron en un gel de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio para constatar su calidad. La cuantificación de la concentración del ADN de cada accesión se determinó mediante fluorometría.

RAPD

Se utilizó el protocolo para RAPD de Gonzales *et al.* (1995). La mezcla de reacción de PCR de 25 μ l se preparó con buffer de reacción 1X, MgCl₂ 1.7 mM, dNTPs 0.12 mM, Taq polimerasa 1U/ μ l, cebador 0.48 mM y ADN genómico 5 ng/ μ l.

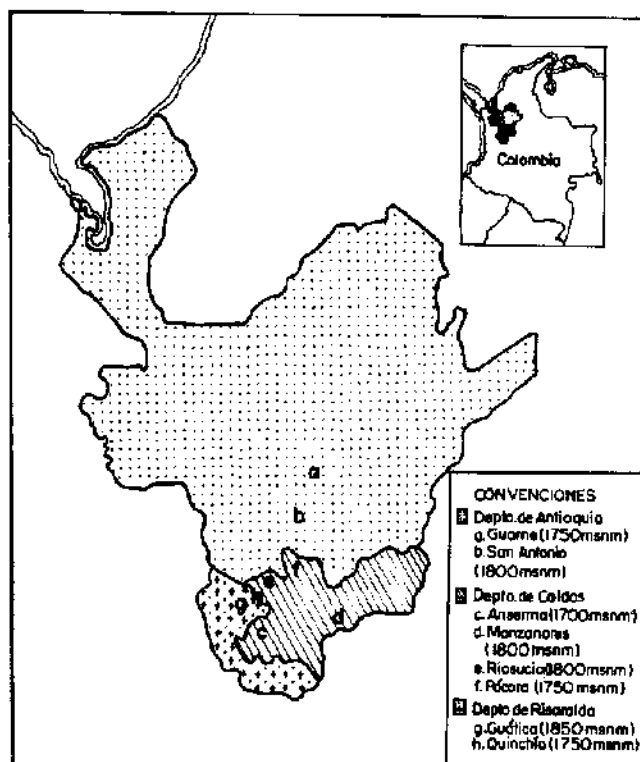


Figura 1. Localización de los sitios de colección de accesiones de mora de Castilla

Se evaluaron 71 cebadores sintetizados por Operon Technologies (Alameda, California). En cada amplificación se incluyeron controles positivos, con ADN de Gibco® y controles negativos. Para la electroforesis se tomaron 25 μ l de cada muestra y se cargaron en geles de agarosa al 1.0%, teñidos con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml. Las bandas de ADN se visualizaron con luz ultravioleta y las fotos de los resultados se tomaron con cámara digital y se archivaron en el programa Molecular Analysis. Para la identificación de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular ADN del fago lambda cortado con la enzima de restricción PstI.

Análisis estadístico

Las bandas de ADN se evaluaron en forma binaria (presencia/ausencia). Se calculó la similitud entre cada par de genotipos y la matriz de distancias genéticas con el índice de Nei y Li (1979). El agrupamiento de los genotipos se efectuó me-

dante el método UPGMA, con el paquete estadístico Ntsys, versión 2.02.

Con la matriz de distancias se realizó una correlación simple entre atributos y un análisis de componentes principales con el paquete estadístico Statgraph 3.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la evaluación de la diversidad genética del género *Rubus* se seleccionaron doce cebadores (tabla 1), que produjeron 38 bandas polimórficas que reflejan 86.6% de polimorfismo. Cada cebador produjo entre una y siete bandas, con pesos moleculares entre 11.501 y 0.805 kilobases (figura 2).

El análisis RAPD diferenció las dos especies estudiadas *R. glaucus* y *R. spp.* Todos los grupos se encuentran a un nivel de similitud de 0.55, lo cual evidencia un importante flujo de genes entre ellos.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la evaluación de diversidad genética en *Rubus*

Secuencia 5'-3'	No. de bandas totales	No. de bandas polimórficas
GGTCCTCAGG*	5	4
AGCCAGCGAA*	4	3
AATCGGGCTG*	3	3
CCACCGCCAG*	3	3
GTGCGTATGG	3	1
AAGGGCGAGT	3	2
ACATCGCCCA	5	5
TCGGCACGCA	3	2
CTG ATACGCC	7	7
CACAGAGGGA	4	4
AATGCCGCAG	5	4

* Cebadores recomendados por Graham y McNicol (1995) y McNicol *et al.* (1997a y 1997b).

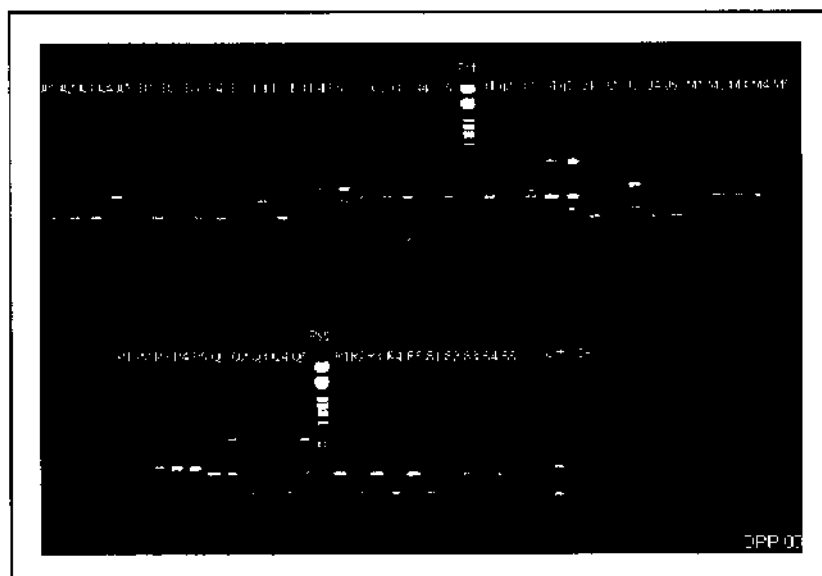


Figura 2. Marcadores obtenidos con el primer OPP 03. Las letras corresponden a las procedencias. El marcador de peso molecular es DNA del fago lambda cortado con la enzima PstI

En el dendrograma (figura 3) se observan dos grupos grandes, uno compuesto por *R. glaucus* y otro de sólo individuos de *R. sp.* La especie *R. glaucus* pertenece al subgénero *Idaeobatus*, y combina características tanto de los black raspberries como de los blackberries. La especie *R. sp.* ha sido descrita por Oligier *et al.* (1995) y Norton y Skirvin (1997) como blackberry. Basados en la similitud encontrada entre las dos especies en el presente estudio, y en los resultados

obtenidos por Graham y McNicol (1995), en los que al 50% de similitud se agrupan las especies pertenecientes al mismo subgénero, y al 25% y 35% se separan las especies de diferente subgénero, se puede suponer que *R. glaucus* y *R. sp.* pertenecen al subgénero *Idaeobatus*.

Las variedades Black Satin, Jumbo y Evergreen, pertenecientes a la especie *R. sp.* sin espinas, podrían corresponder a la descripción de Norton y

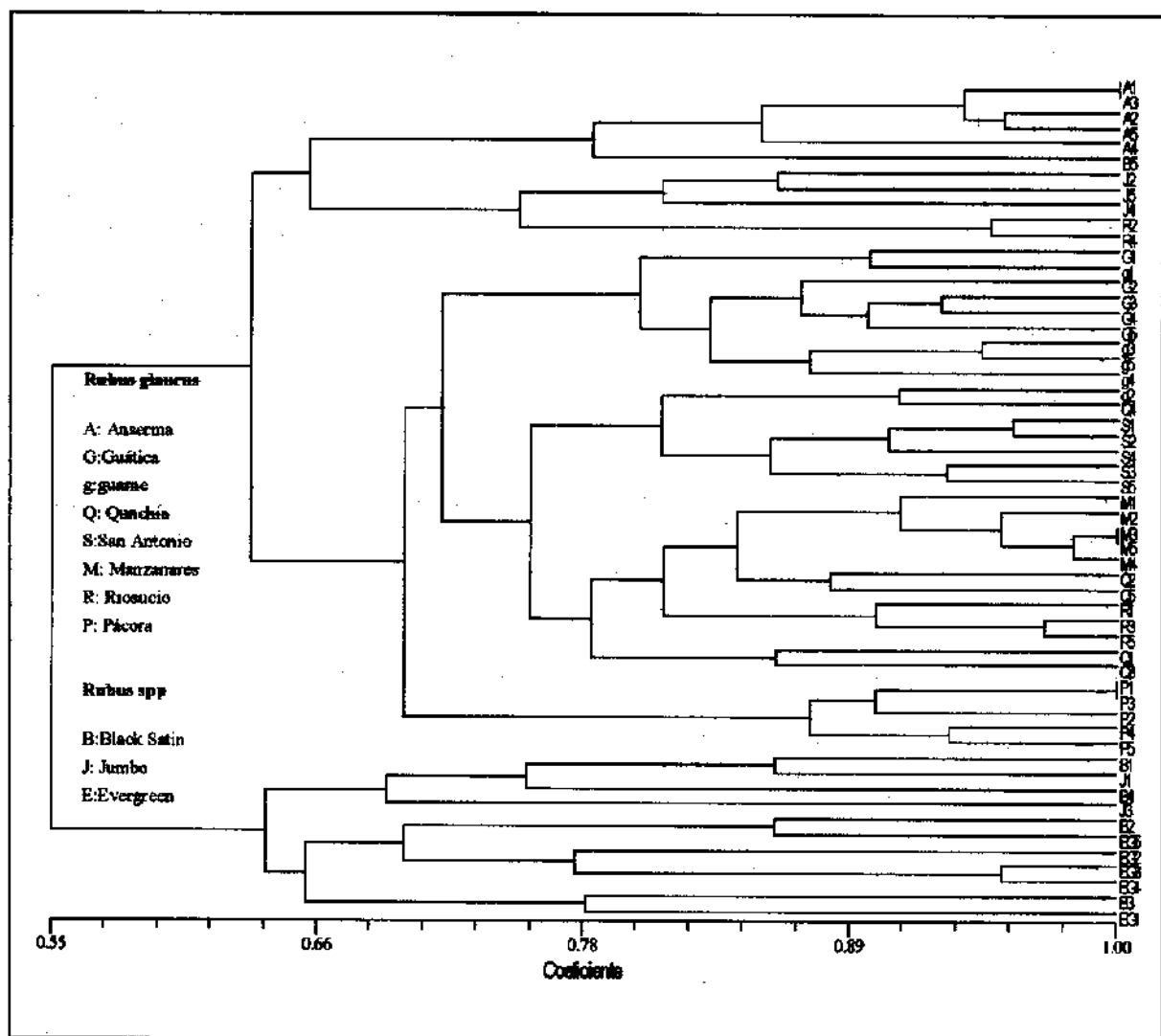


Figura 3. Dendrograma de *Rubus* sp., basado en 42 marcadores polimórficos. Las letras corresponden a las diferentes procedencias

Skirvin (1997) para *R. laciniatus* procedentes de Estados Unidos.

Es importante recalcar que cuatro de los cebadores recomendados por Graham y McNicol (1995) y McNicol *et al.* (1997a y 1997b) fueron utilizados en este estudio por ser altamente polimórficos en evaluaciones de diversidad en el género *Rubus*. La similitud encontrada entre las dos especies estudiadas es importante para futuros trabajos de mejoramiento de *R. glaucus*. La especie *R. sp.* posee la característica de no tener espinas, y la introducción de este gen en la especie *R. glau-*

cus podría lograrse por métodos tradicionales o biotecnológicos.

El análisis intraespecífico con marcadores RAPD diferenció las procedencias de mora (*R. glaucus*) y las agrupó por regiones geográficas, indicando que hay diferencias entre las accesiones de acuerdo con la ubicación geográfica donde fueron colectadas, lo que hace suponer que la variabilidad de la especie *R. glaucus* ha sido mantenida dentro de cada procedencia por los agricultores. Se evidenció que hay poca variación entre individuos dentro de las procedencias (figura 3), la cual

fluctúa entre 85 y 100% de similitud para los doce cebadores utilizados.

Debido a la importancia comercial de *R. glaucus*, ésta ha sido propagada clonalmente entre los agricultores tradicionales de la región andina durante décadas, lo que puede estar causando una disminución de la variabilidad genética en el material utilizado para cultivo, disminución que se refleja en altos niveles de similitud. Otro aspecto por resaltar para el futuro mejoramiento de la especie, es que el análisis molecular permitió detectar posibles accesiones duplicadas en el banco de germoplasma, como los individuos A₁ y A₂ de procedencia de Anserma, M₃ y M₅ de Manzanares y P₁ y P₃ de Pácora. Sería de gran interés incluir en un estudio futuro otras especies de *Rubus* silvestres con el fin de caracterizarlas, analizar su diversidad genética y ampliar la base genética de las variedades comerciales.

En la figura 4 se observa el resultado obtenido con el análisis de componentes principales. Los

individuos de la especie *R. sp.* se agrupan fuertemente entre ellos y muy cerca de la mayoría de los individuos de *R. glaucus*. A pesar de que el índice de similitud entre los individuos de *R. glaucus* es muy alto, en el análisis de componentes principales están distribuidos de una manera más laxa, reflejando la variabilidad intraespecífica. Los individuos de Anserma se alejan de las demás procedencias, lo que constituye una fuente de variabilidad mayor, que debe ser estudiada con mayor detalle. Así mismo, un individuo de Guarne y uno de Pácora se alejan del resto de los individuos de *R. glaucus*.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten concluir que a pesar de que *R. glaucus* es una especie que ha sufrido selección por parte de los agricultores, se mantiene una variabilidad genética entre las accesiones de tal manera que se pueden diferenciar mediante los marcadores RAPD según su ubicación geográfica.

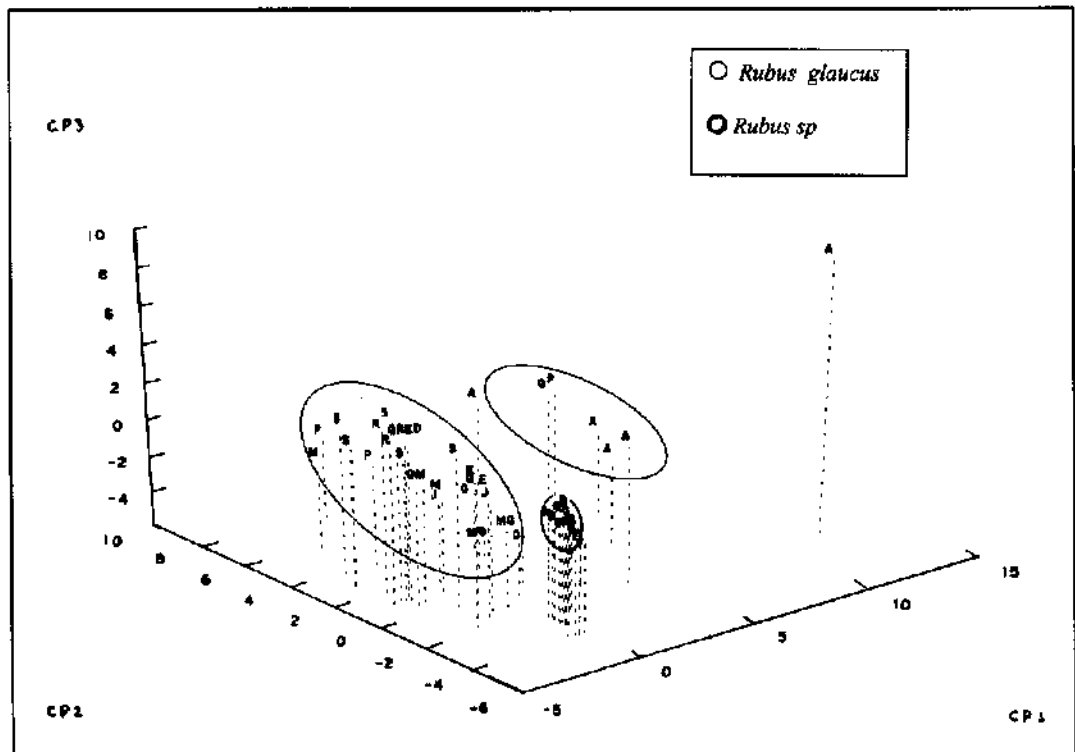


Figura 4. Análisis de componentes principales

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación de la investigación; a Corpoica, Caldas; al convenio UTP-GTZ

y a la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo institucional.

REFERENCIAS

- Cousineau J, Donnelly D.** 1989. Identification of raspberry cultivars *in vivo* and *in vitro* using isoenzyme analysis. *Hort Sci* 24:490-492.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB.** 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Reporter* 1(14):19-21.
- Gonzales D, Palacios N, Gallego G, Thome J.** 1995. Protocolos para marcadores moleculares. Unidad de Investigación de Biotecnología. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali (Colombia), 64 p.
- Graham J, McNicol RJ.** 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor Appl Genet* 90(7-8): 1.128-1.132.
- Graham J, Iasi L, Millam S.** 1997a. Genotype specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48(3):167-173.
- Graham J, Squire GR, Marshall B, Harrison RE.** 1997b. Spatially dependent genetic diversity within and between colonies of wild raspberry *Rubus idaeus* detected using RAPD markers. *Mol Ecol* 6(11):1.001-1.008.
- Jennings DL.** 1988. *Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth*. Academic Press, New York, USA.
- Karp A, Kresovich S, Ayad V, Hodgkin T.** 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. *Internat Plant Gen Res Institute IPGRI*. Technical Bulletin No 2. Italy, 47 p.
- Nei M, Li WH.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Nat Acad Sci USA*. 79:52.677-52673.
- Norton MA, Skirvin RM.** 1997. Somaclonal variation among *ex vitro* Thornless Evergreen trailing blackberries: the morphological status of selected clones after seven years of field growth. *J Am Soc Hort Sci* 122(2):152-157.
- Nybon H, Kraft T.** 1995. Applications of DNA fingerprinting of the taxonomy of European blackberry species. *Electroforesis* 16(9):1.731-1.735.
- Parent JG, Fortin MG.** 1993. Identification of raspberry cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Can J Plant Sci* 73(4):1.115-1.122.
- Parent JG, Page D.** 1998. Identification of raspberry cultivars by sequence characterized amplified region DNA analysis. *Hortscience* 33(1):140-142.
- Oliger P, Parraguez M, Gebauer, Arce P.** 1995. Micropropagation and *in vitro* regenerative studies in cultivated blackberry (*Rubus* sp.). *Ciencia e Investigación Agraria* 22 (3):123-130.
- Waugh R, Van de Ven WT, Phillips M, Powell W.** 1990. Chloroplast DNA diversity in the genus *Rubus* (Rosaceae) revealed by southern hybridisation. *Plant Syst Evol* 172:65-75.