

Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)" en condiciones radiactivas

Molecular characterisation of Colombian yam germplasm by "DNA amplification fingerprinting (DAF)" in radioactive conditions

Silvia L. Bustamante*, Mónica Guzmán* *, Gustavo Buitrago* **

RESUMEN

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de la colección de ñame (*Dioscorea* spp.) de la Universidad de Córdoba y algunas muestras provenientes del IITA (International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria), con el fin de caracterizarlas molecularmente y complementar la información que se tiene de ellas. Dada la importancia del cultivo del ñame para los pequeños productores de la costa atlántica, surgió la propuesta de iniciar estudios moleculares en una primera etapa empleando técnicas como los AFLP. En este trabajo, utilizando DNA amplificación "fingerprinting" (DAF), técnica basada en la PCR que utiliza oligos aleatorios que generan patrones de bandeo característicos de cada individuo, se encontró que la diversidad de la población fue 0.0413 con una media de similaridad de 0.9587, lo cual indica que la colección de ñame existente en el país posee muy poca diversidad genética, y esto puede explicar parcialmente la vulnerabilidad del cultivo a plagas y enfermedades, como sucedió a finales de la década de 1980 cuando la antracnosis prácticamente acabó con el cultivo en la costa atlántica colombiana. Es recomendable continuar con los estudios de caracterización utilizando una técnica de mayor poder de discriminación.

Palabras clave: DAF, diversidad, *Dioscorea* spp, dendograma

ABSTRACT

Samples from the Universidad de Córdoba's yam collection (*Dioscorea* spp.) and others originating from IITA (International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria) were molecularly characterised to complement existing information about them. The yam (*Dioscorea* spp.) represents a basic crop for small-scale farmers on the Colombian Atlantic Coast who sow around 20,000 hectares per year. Even though they are dioecious species, only one sex is represented in Colombia; it must also be stated that climatic conditions are not propitious for its flowering. This situation has caused difficulty for work in yam breeding. The yam species and varieties used in the Colombian ABP (Agricultural Biotechnology Programme) have been molecularly characterised by AFLPs in a previous publication describing a preliminary study emerging from the need to broaden the characterisation of those accessions kept at the Universidad de Córdoba. Comparisons have also been done with some African accessions donated by IITA. In this article, samples were molecularly characterised by another fingerprinting technique, the DAF technique (DNA Amplification Fingerprinting) based on PCR, using random oligonucleotides for generating characteristic band patterns from each individual. The results showed 0.0413 population diversity with 0.9587 average similarity, indicating that the yam collection studied had very little genetic diversity and, probably, this could be why the crop is vulnerable to plagues and diseases, as happened at the end of the 1980s when anthracnose practically devastated the crop on the Colombian Atlantic coast. Similarity was also found between those

* Investigadora Instituto de Biotecnología, Laboratorio de Virus Vegetales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. E-mail: slbustamanter@unal.edu.co

** Profesora Instituto de Biotecnología, Laboratorio de Virus Vegetales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. E-mail: mmguzmanb@unal.edu.co

*** Profesor Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. E-mail: gbuitragoh@unal.edu.co

Recibido: Noviembre 20 de 2002. **Aceptado:** Junio 3 de 2003.

Colombian and African samples analysed, agreeing with low diversity and less distance between common ancestors. The molecular results suggest the need for using other molecular techniques having a greater power of discrimination and also the need to broaden the genetic diversity in yam crops for providing greater sustainability for small-scale Colombian yam farmers.

Key words: DAF, diversity, *Dioscorea* spp, dendrogram

INTRODUCCIÓN

Bajo el nombre de ñame, *Dioscorea* spp, se conocen más de 600 especies caracterizadas por ser plantas primitivas, de hábito trepador y normalmente se propagan en forma vegetativa (Ayensu, 1972). De las 600 especies pertenecientes al género *Dioscorea*, sólo 12 son utilizadas en comerciales, entre las cuales *Dioscorea alata* L. es la más distribuida en el mundo (Coursey, 1976b). En Colombia, *Dioscorea rotundata* también es utilizada por los productores de ñame. Esta especie, originaria del sudeste asiático, se cultiva en América y en Colombia desde la llegada de los primeros barcos españoles cargados de esclavos africanos; por tanto es normal encontrar este cultivo asociado a las culturas negras (IITA, 1993). En nuestro país el ñame ha sido un cultivo básico tradicional en pequeña y mediana escala de cultivadores de la costa atlántica para abastecer el consumo propio y el mercado local. En 1989 la producción se vio afectada por la antracnosis, enfermedad foliar causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Álvarez, 1991). A partir de 1992 se ha observado un incremento en las áreas sembradas y en el consumo per cápita (Ministerio de Agricultura, 2000). Se realizan exportaciones de algunos excedentes a Venezuela y Estados Unidos.

Entre las estrategias para aumentar la producción se debe contar con variedades seleccionadas que incrementen la sostenibilidad y el nivel de vida de los productores de ñame colombianos, propósito que se enmarca en los objetivos de la Corporación para el Desarrollo Participativo de los Pequeños Agricultores Colombianos, PBA. La obtención de dichas variedades por medio del fitomejoramiento sólo es posible si se conoce la diversidad genética del ñame en Colombia. Existen dos colecciones parciales que incluyen gran parte de la diversidad de ñame; sin embargo, dichas colecciones deben ampliar la caracterización, fortaleciendo el banco de germoplasma y la obtención de información encaminada a futuros trabajos de mejoramiento. Por estas razones se caracterizaron las variedades de ñame utilizadas en campo pertenecientes a una de las colecciones existentes, así como al-

gunas muestras de especies silvestres con una técnica de biología molecular: "DNA Amplification Fingerprinting (DAF)" (Caetano-Anollés *et al.*, 1991). Esta técnica incluye amplificaciones del ADN genómico por "PCR" con un único oligo de secuencia aleatoria, lo que permite obtener bandas discretas utilizadas para la caracterización de cada individuo.

En este trabajo se utilizaron las condiciones de baja y alta concentración de template de ADN y oligo, respectivamente, reportados por el autor de la técnica. Éstas se han empleado para estimar la variación genética de plantas (*Cornus florida* L.), (Caetano-Anollés *et al.*, 1999) y evaluar la estabilidad genética de dos importantes cultivares de pastos *Tifgreen* y *Tifdwarf*, y más recientemente para el mapeo del genoma de trigo (*Triticum aestivum*) (Caetano-Anollés, 1998, Gupta *et al.*, 1999), guisantes (*Pisum sativum* L.) (Men *et al.*, 1999) y garbanzo (*Cicer arietinum* L.) (Winter *et al.*, 1999).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 71 accesiones de diferentes cultivares de ñame, recolectadas en diferentes locaciones de la costa atlántica colombiana, pertenecientes al banco de germoplasma de ñame de la Universidad de Córdoba (Durango *et al.*, 1998), 40 accesiones del banco de germoplasma de ñame africano, generosamente donadas por el IITA (International Institute of Tropical Agriculture Ibadan-Nigeria), y las accesiones *D. vitatta* y *D. sansibarensis*, obtenidas de la colección de la Universidad de Frankfurt (tabla 1).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el procedimiento reportado por Asemota (1991) para el aislamiento de ADN de tubérculos de ñame, con algunas modificaciones, entre ellas la más importante fue el uso de DTT (ditiotreitól) como reductor de proteínas en remplazo del β -mercaptoetanol.

Tabla 1. Origen del Material vegetal

Especies	c.v	Origen	Especies	c.v	Origen
<i>D.alata</i>	9805003	Córdoba	<i>D.alata</i>	Da11	África (IITA)
	9503004	Sucre		Da12	África (IITA)
	9503005	Sucre		Da13	África (IITA)
	9503006	Sucre		Da14	África (IITA)
	9503007	Córdoba		Da15	África (IITA)
	9503008	Córdoba		Da16	África (IITA)
	9504009	Córdoba		Da17	África (IITA)
	9506016	Córdoba		Da18	África (IITA)
	9506019	Córdoba		Da19	África (IITA)
	9506020	Córdoba	<i>D.rotundata</i>	9603041	Córdoba
	9506021	Córdoba		9605060	Sucre
	9502022	Córdoba		9804075	Córdoba
	9506024	Bolívar		9804078	Córdoba
	9506028	Atlántico		9804080	Córdoba
	9602034	Córdoba		9804084	Córdoba
	9602035	Córdoba		9804085	Córdoba
	9603037	Córdoba		9404087	Córdoba
	9603040	Córdoba		9804092	Córdoba
	9603042	Córdoba		9903093	Córdoba
	9603043	Córdoba		9903094	Córdoba
	9701043	Córdoba		Dr22	África (IITA)
	9605044	Córdoba		Dr24	África (IITA)
	9605045	Bolívar		Dr30	África (IITA)
	9605047	Bolívar		Dr32	África (IITA)
	9605049	Bolívar		Dr33	África (IITA)
	9605052	Magdalena		Dr34	África (IITA)
	9605053	Magdalena		Dr35	África (IITA)
	9605054	Magdalena		Dr36	África (IITA)
	9505059	Sucre		Dr37	África (IITA)
	9605061	Bolívar		Dr38	África (IITA)
	9605063	Córdoba		Dr39	África (IITA)
	9605064	Antioquia		Car 1	Córdoba
	9605065	Córdoba	<i>D. trifida</i>	9805001	Córdoba
	9505066	Antioquia	<i>D. bulbifera</i>	9507030	Córdoba
	9605070	Córdoba	<i>D.vittata</i>		Colección de la U. de frankfurt
	9701071	Córdoba	<i>D.sansibarensis</i>		Colección de la U. de frankfurt

***c.v** : cultivar número o nombre del clon

Nota: IITA, International Institute for Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.

DNA amplification fingerprinting en condiciones radiactivas

Los perfiles de DAF fueron generados con 8 diferentes oligos (tabla 2), siguiendo el procedimiento de Caetano-Anollés *et al.* (1991), con las modificaciones pertinentes para realizarlos en condiciones radiactivas. Las reacciones de PCR de 10 µl contenían 10ng de ADN genómico, 0.2 mM de dCTP, dGTP y dTTP respectivamente, 0.02 mM de dATP, 0.065 µl de [α^{32} P]-dATP, 40 pmol de oligo y 0.25 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Biotherm, Gene Craft). Un termociclador (Eppendorf Mastercycler® gradient) fue programado para 40 ciclos, con un paso de denaturación de 15 s, 94 °C, con una temperatura de anillamiento de 35 °C durante 20 s y un paso extensión con una temperatura de 72 °C durante 1 min. Después de la amplificación, las muestras fueron diluidas en agua en proporción 1:1, colocadas para separación en un gel de secuenciación con una concentración de 4% de poliacrilamida y 40% de úrea con un tiempo de corrido de 3 h a 100 w, al cabo del cual se expuso 12 h con películas de rayos X (Kodak™X-ray) sin pantallas intensificadoras (Sambrook *et al.*, 2000).

ANÁLISIS DE DATOS

Bandas registradas con DAF de manera inequívoca fueron transformadas en una matriz binaria con 1 para presencia y 0 para ausencia de la banda en una posición particular. A partir de esta matriz, empleando el índice de similaridad de Dice, se calculó una matriz de similaridad que se computó directamente con el paquete estadístico GELSTATS ("GELSTATS versión 2.6" University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, 1996) de acuerdo con Nei y Li (1979). El dendograma final se construyó utilizando la estrategia de agrupamiento UPGMA con el paquete estadístico STATISTICA (1984-1999 Stat Soft. Inc., Dhillon *et al.*, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron todas las accesiones con 8 diferentes oligos. Se obtuvieron patrones de bandeo diferentes muy reproducibles con todos los oligos utilizados. Un ejemplo de los patrones obtenidos se muestra en la figura 1, correspondiente a la fotografía del gel obtenido con el oligo

Tabla 2. Oligos utilizados para la caracterización con DAF

Oligos	Secuencia 5' - 3'
OPM-2	ACAACGCCTC
OPI-16	TCTCCGCCCT
OPH-1	TCTCCGCTTG
OPD-6	ACCTGAACGG
OPG 14	GGATGAGACC
R 470-3	CTGTCCGGCTC
R 260-4	CTGTCCGGCTC
OPH-11	GTCCCGTGGT

OPH-11. Realizada la revisión de los geles, se observaron 84 bandas totales, de las cuales 33 fueron monomórficas, lo que corresponde al 40% del total de las bandas. Se observó un rango de 2.5 bandas polimórficas por oligo utilizado.

Después de hacer el análisis estadístico de los resultados se obtuvo una diversidad de la colección de 0.0413, con una media de similaridad de 0.9587, valores que se encuentran entre 0 y 1. Estos datos corresponden a la comparación total de las muestras utilizadas en este estudio. Si se tiene en cuenta que los rangos de similaridad cercanos a 1 indican altos grados de similitud y que valores de diversidad

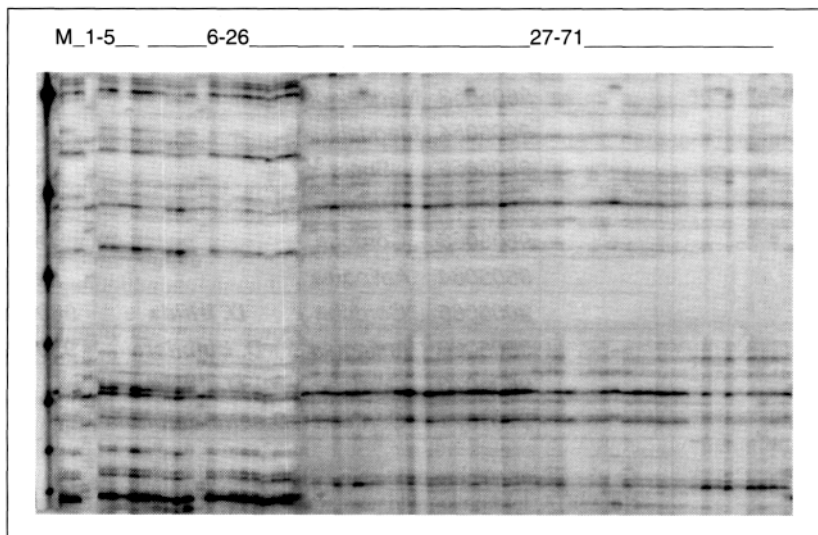


Figura 1. Patrones de Fingerprinting obtenidos con el "primer" OPH-11. de DAF con la colección de *D. alata* y *D. rotundata*. M: Marcador de peso molecular 25pb, MBI Fermentas, 1- 5: *D. trifida*, *D. bulbifera*, *D. vittata*, *D. sansibarensis*. Car1, 6 - 26: *D. rotundata*, 26 - 71: *D. alata*

cercanos a 0 señalan baja diversidad, puede sugerirse, de estos resultados, que se refleja claramente una baja diversidad genética, aun cuando la técnica aquí reportada se estandarizó, en nuestro caso en condiciones radiactivas, para aumentar el poder de discriminación de la misma, y que la poca diversidad presentada en los agrupamientos observados en el dendograma (figura 2) obedecen a la separación entre especies, obviamente esperada.

polimórficas por ensayo, lo que ocasiona agrupamientos cerrados claramente observados en el dendograma.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden estar relacionados con el hecho de que el ñame es una planta dioica, con flores imperfectas producidas en plantas diferentes (Amirato, 1984); por tanto, existen plantas masculinas y plantas femeninas. Como se trata de un cultivo de propagación vegetativa por parte de los cultivadores, se tienen clones o cultivares masculinos y femeninos, y otros que no florecen (Abraham *et al.*, 1987). En general, se considera que las dificultades para obtener reproducción sexual en el ñame se deben fundamentalmente a fenómenos de poliploidía que han llevado a la especie a una virtual esterilidad sexual (Martin *et al.*, 1969).

Debido a que ésta es una especie introducida en Colombia, sólo se han identificado algunas plantas masculinas y se han reconocido pocos cultivares femeninos, razón por la cual no se han realizado cruzamientos, y los trabajos de mejoramiento genético han estado limitados a evaluaciones agronómicas de los materiales presentes en las dos colecciones existentes (Álvarez, 2000). Esto podría explicar, en cierta proporción los resultados obtenidos con la caracterización molecular.

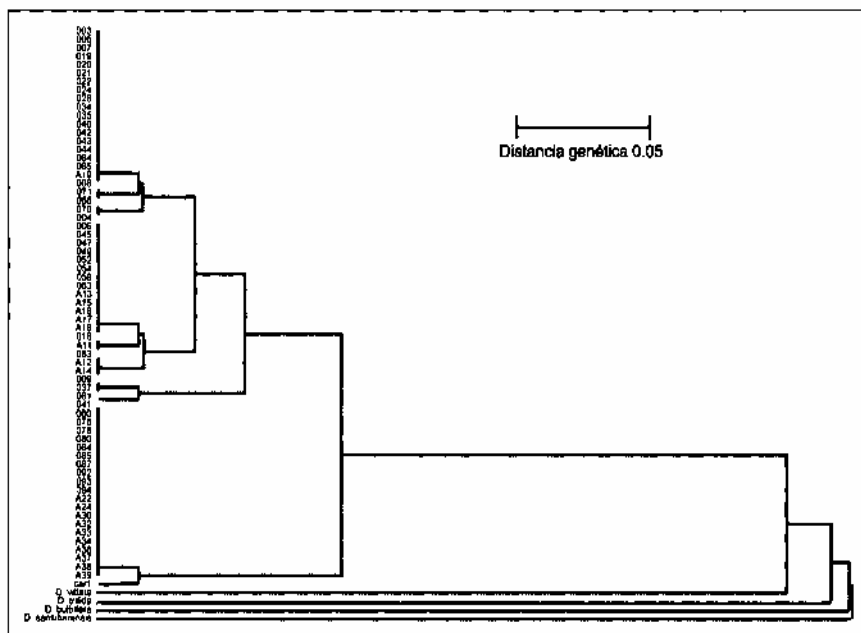


Figura 2. Dendograma obtenido con el análisis de agrupamientos por UPGMA.

Comparando los individuos de la especie *D. alafa* y *D. rotundata* pertenecientes a las colecciones colombiana y africana, se observó una elevada similitud, caso que puede ser explicado por la relación de las accesiones colombianas con sus ancestros africanos, ya que los individuos de la colección africana se agrupan claramente con los de la colombiana dentro de cada una de las especies (Coursey *et al.*, 1970, 1976a, 1976b). Cabe anotar, además, que los resultados de las accesiones colombianas concuerdan con resultados previos de caracterización molecular utilizando AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphisms, Bustamante *et al.*, 2001), en los que, de siete variedades reportadas, se encontró que sólo se podían diferenciar tres, lo que se puede relacionar con los valores de similitud y diversidad obtenidos aquí. Por otro lado la variación somaclonal, otra posible causa de variabilidad, también se encuentra en bajas proporciones pues de ocho caracteres analizados sólo se obtuvo un rango de 2.5 bandas

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo puede concluirse, en primera instancia, que la técnica utilizada no permitió establecer grandes diferencias en las especies de *Dioscorea* caracterizadas, pues la similitud encontrada entre los individuos fue muy alta aunque, como se mencionó, las condiciones de radiactividad aumentan el poder de discriminación de una técnica. Ahora bien, si se tiene en cuenta que las características agronómicas y sistemáticas del ñame, así como sus condiciones de propagación clonal y la característica especial de ser dioica, pueden influir directamente en este resultado ya que estas características hacen que la similitud aumente y la diversidad disminuya, cabe anotar entonces que

para efectos del cultivo comercial de ñame en Colombia esta situación es de gran importancia, pues la poca diversidad genética podría eventualmente aumentar la vulnerabilidad del cultivo en campo a plagas y enfermedades, de forma que el trabajo aquí realizado contribuye a complementar la información que se tiene de las colecciones de ñame existentes en Colombia con miras a establecer posibles soluciones para aumentar la diversidad del cultivo y conseguir, de esta manera, aumentar la sostenibilidad de los pequeños productores de ñame en la costa atlántica colombiana.

También se puede recomendar, a partir de los resultados de este trabajo, la utilización de una técnica con mayor poder de discriminación que la utilizada aquí, para confirmar los resultados o, si es el caso, para establecer posibles individuos de la colección con potencial para ser utilizados en campo. Sin embargo, lo obtenido aquí hace pensar en la necesidad imperiosa de iniciar estudios de fitomejoramiento genético del ñame en Colombia, pues es una posibilidad viable aumentar la diversidad del cultivo y disminuir la vulnerabilidad del mismo en campo, ya que los marcadores moleculares son herramientas utilizadas en estudios de mejoramiento (trigo) (Gupta *et al.*, 1999). Trabajos como este se podrían encaminar hacia ese objetivo en el cultivo de ñame.

Finalmente es pertinente completar la información que se tiene de la colección de ñame en la Universidad de Córdoba, de modo que se pueda establecer un banco de germoplasma bien estructurado y unificado que brinde a los pequeños productores variedades seleccionadas de buen comportamiento en campo. Esto es posible teniendo el máximo de información, entre ella conociendo la diversidad genética existente en Colombia, continuado con los trabajos de caracterización e iniciando los trabajos encaminados al fitomejoramiento.

AGRADECIMIENTOS

La investigación contenida en esta publicación fue llevada a cabo bajo el auspicio de la Corporación para el Desarrollo Participativo y Sostenible de los Pequeños Agricultores Colombianos, PBA, con el apoyo financiero del Ministerio de Desarrollo y Cooperación de Holanda y el apoyo logístico de CEGA, (La responsabilidad del contenido de las opiniones expresadas pertenecen solamente a los autores y no constituyen respaldo de CEGA ni de la agencia

aportante de los fondos). S. Bustamante agradece las becas de la Unesco (París, Francia) y de la Fundación para la Formación de Investigadores Internacionales de la Universidad Wolfgang Goethe de Frankfurt (Frankfurt am Main, Alemania). Los autores también agradecen a Diego Riaño (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia).

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, K.; Nair, S.; Sreejumari, M.; Unnikrishnan, M.; Babu, L.; Palaniswami, M. 1987. Genetic resources of greater yam. *Technical Bulletin Series 9*. Central Tuber Crop Research Institute (CTCRI). Kerala. India, p. 24.
- Asemota H.N. 1995. A fast, simple, and efficient mini-scale method for the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea* spp.). *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 214-218.
- Álvarez, A. 1991. Control de la antracosis en ñame. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). El Carmen de Bolívar. Documento de trabajo, p. 15.
- _____. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. En: *Ñame: producción de semillas por biotecnología*. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Editorial Unibiblos.
- Ammirato, P. 1984. Yams. In: Ammirato, P.; Evans, D.; Sharp, W.; Yamada, Y. (Eds.) *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 3, New York: MacMillan, pp. 327 - 354.
- Ayenu, G. 1972. Anatomy of the Monocotyledons. VI. *Dioscoreales*. Oxford: Oxford University Press, p. 182.
- Bustamante, S.; Guzmán, M.; Buitrago, G. 2001. Molecular characterization of some species and varieties of yam present on the Colombian Atlantic Coast. *Rev Col Bio* 2: 38-43.
- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B.J.; Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 294-307.
- _____. 1998. Genetic instability of bermudagrass (*Cynodon*) cultivars 'Tifgreen' and 'Tifdwaif' detected by DAF and ASAP analysis of accessions and off-types. *Euphytica* 101:165-173.
- Caetano-Anollés, G.; Schlarbaum, S.E.; Trigiano, R.N. 1999. DNA amplification fingerprinting and marker screening for pseudo-testcross mapping of flowering dogwood (*Cornus florida* L.). *Euphytica* 106: 209-222.
- Coursey, D.G.; Martin, R.W. 1970. The past and future of yams as crop plants. In: *Proceedings Second Symposium of Tropical Root Crops*, Hawaii 1: 87-90; 99-101.
- Coursey, D.G. 1976a. Yams *Dioscorea* spp. (*Dioscoreaceae*). In: *Evolution of Crop Plants*. N.W. Simmonds (Ed.). London and New York: Longmans, pp. 70-74.
- Coursey, D.G. 1976b. The origins and domestication of yams in Africa. In: *Origins of African Plant Domestication*. Harlan, J.R.; de Wet, J.M.J.; Stemler, A.B.L (Eds.) The Hague, Mouton, pp. 383-403.
- Durango, R.; Padilla, A. 1998. Caracterización morfológica de un banco de germoplasma de ñame *Dioscorea* spp recolectado en la costa norte colombiana. Trabajo de grado. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.

- Dhillon, N.P.S.; Ishiki, K. 1999. Genomic variation and genetic relationship in *Ipomoea* spp. *Plant Breed* 118:161-165
- Gupta, P.K.; Varshney, R.K.; Sharma, P.C.; Armes, B. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed* 118: 369 -390.
- IITA International Institute of Tropical Agriculture. 1993. Yams (*Dioscorea* spp) Root and tuber improvement Program. Archival report (1989 - 1993). Ibadan. Nigeria.
- Martin, R; Delphin, H. 1969. Techniques and problems in the propagation of saponin-bearing yams from stem cuttings. *J. Agric. Univ. Puerto Rico*, 53:191 -198.
- Ministerio de Agricultura Colombiano. 2000. *Reporte Anual*.
- Men, A.E.; Borisov, A.Y.; Rozov, S.M.; Ushakov, K.V.; Tsyganov, V.E.; Tikhonovich, LA.; Gresshoff, P.M. 1999. Identification of DNA amplification fingerprinting (DAF) markers close to the symbiosis-ineffective *sym31* mutation of pea (*Pisum sativum* L). *Theor Appl Genet* 98:929-936.
- Nei, M.; Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 2000. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Winter, P.; Pfaff, T.; Udupa, S.M.; Hüttel B.; Sharma, P.C.; Sahi, S.; Arreguin-Espinoza, R.; Weigand, F.; Muehlbauer, F.J.; Kahl, G. 1999. Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. *Mol. Gen. Genet.* 262: 90-101.