

Caracterización molecular de algunas especies y variedades de ñame presentes en la Costa Atlántica colombiana

Molecular characterisation of some species and varieties of yam present on the Colombian Atlantic Coast

Silvia L. Bustamante R. *, Mónica Guzmán B. *, Gustavo Buitrago H.*

RESUMEN

En Colombia el ñame (*Dioscorea data* y *Dioscorea rotundata*) es un cultivo de importancia para los pequeños productores de la Costa Atlántica. El Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola (PBA) de Ñame tiene el objetivo de incrementar la sostenibilidad de grupos de campesinos de la región, adelantando investigaciones participativas en diferentes aspectos relacionados con el cultivo. En el presente trabajo, el objetivo principal fue caracterizar molecularmente las ocho variedades de ñame utilizadas en el PBA, a través de marcadores moleculares tipo AFLP para determinar si existe concordancia entre la taxonomía morfológica establecida para la clasificación de las especies y variedades con la discriminación y agrupación de los individuos por sus perfiles de bandas moleculares aportados por los AFLP. Para la obtención de los patrones de AFLP se utilizaron los kits de Gibco-BRL, New York Analysis System I y Analysis System II, siguiendo los manuales de instrucción. Para el análisis estadístico se realizaron matrices de presencia ausencia, se determinaron las similitudes a partir del índice de similaridad de Dice con el paquete estadístico Gel Stats. Posteriormente, las matrices se transformaron en matrices de distancia, y a partir de éstas se construyeron los dendogramas utilizando como estrategia de agrupamientos UPGMA (Unweighted Pare Group Method Average). Finalmente se realizó una comparación entre matrices utilizando el análisis de permutaciones de Mantel. Los resultados muestran que de las siete variedades de *Dioscorea alata* analizadas solamente tres de ellas presentan polimorfismos que permiten diferenciarlas. Las otras cuatro se agruparon como una sola variedad.

Palabras clave: AFLR caracterización, ñame, *Dioscorea* spp, dendograma.

ABSTRACT

Seven varieties of the *Dioscorea alata* specie (but only one variety of the *Dioscorea rotundata* specie) have been morphologically characterised in Colombia. These varieties have been used in the Colombian Yam Agricultural Biotechnology Programme (ABP) to increase the sustainability of groups of poor rural workers from the Colombian Atlantic Coast by providing them with plants having good organoleptic characteristics and increased tuber yield. This work's main objective was the molecular characterisation of those varieties of yam from the Colombian Atlantic Coast used in the ABP, through Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) molecular markers. This aimed at determining if there is conformity between that morphological taxonomy established for the classification of ABP programme species and varieties with the discrimination and grouping of individuals by their molecular band profiles provided by AFLP. Seven varieties of *D. alata* specie and the sole variety of the *D. rotundata* specie were characterised. Gibco-BRL, New York Analysis System I and Analysis System II kits were used to obtain AFLP patterns, following handbook instructions. Presence/absence matrices were constructed for the statistical analysis; similarity was determined from the Dice similarity index by using the Gel Stats statistical package. Later matrices became distance matrices and dendograms were constructed from these by using UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) for grouping strategy. Comparison was then made between matrices by using Mantel permutation analysis. The results show that only three of all the seven *Dioscorea alata* varieties analysed presented polymorphism allowing them to be differentiated. The other four varieties were

* Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. E-mail: moguzman@ibun.unal.edu.co

grouped as a sole variety or belonged to a single variety. These results have great importance for widening information concerning yam in Colombia, particularly for the Colombian ABR since it makes it possible to reduce collection and maintenance costs, leading to information regarding each accession to Colombia's germplasm banks to be increased. This is the first molecular characterisation work carried out in Colombia on yam species (*Dioscorea spp.*).

Key words: AFLPJ characterisation, yam, *Dioscorea spp.*, dendogram.

INTRODUCCIÓN

En Colombia se cultiva ñame desde la Colonia con diferentes especies denominadas comúnmente ñame criollo- *Dioscorea alata*; ñame espino- *Dioscorea rotundata*; ñame papa- *Dioscorea bulbifera*; ñame azúcar- *Dioscorea esculenta*, y ñampin-D/oscórea *trífida*. Se considera que *D. alata* y *D. rotundata* son las especies de mayor importancia para el consumo humano, tanto por el área sembrada como por la demanda del tubérculo, seguidas por *D. trífida* (Álvarez, 2000; Lev y Shrider, 1997). La clasificación de las diferentes especies y variedades de ñame se ha realizado casi exclusivamente por los rasgos agromorfológicos (Dansi *et al.*, 1998-1999) existiendo discrepancias para la identificación de algunos ejemplares (Álvarez, 2000). Como una iniciativa dentro del Plan de Biotecnología Agrícola Colombiano (PBA) de Ñame, que tiene el objetivo de incrementar la sostenibilidad de grupos de campesinos pobres de la Costa Atlántica colombiana aportando plántulas con buenas características organolépticas y que aumenten el rendimiento del tubérculo, surge la necesidad de caracterizar molecularmente algunas variedades de ñame *D. alata* y *D. rotundata* que se cultivan más comúnmente en la costa caribe colombiana.

La caracterización molecular de plantas, por medio de técnicas de *fingerprinting* (huella dactilar) como los RLFP, RAPO, AFLP, entre otras, se ha utilizado como herramienta importante para definir la individualidad o diversidad biológica de las especies (Vos *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1995). Recientemente, la caracterización molecular de ñame ha sido utilizada también por Mignouna, (1995), Asemota *etal.* (1996), Ramsereía/. (1997), Asiedu *et al.* (1998) Mignouna *et al.* (1998), Dansi *et al.* (2000).

La caracterización por primera vez de algunas especies y variedades de ñame cultivadas en Colombia, utilizando la técnica de AFLP, complementará el conocimiento que se tiene sobre los marcadores taxonómicos agromorfológicos usados para diferenciar

las variedades del género *Dioscorea* que fueron seleccionadas como blanco del programa PBA-Ñame. Además, permitirá establecer si las diferentes metodologías taxonómicas, morfológicas y moleculares son congruentes (Mignouna *etal.*, 1995), y se podrá contribuir con el mantenimiento y desarrollo del banco de germoplasma de ñame aportando elementos que enriquezcan los futuros programas de fitomejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la caracterización molecular se emplearon siete variedades de *D. alata* procedentes de la colección de la Universidad de Córdoba (Montería) identificadas como oso-005, palomero-003, diamante-027, canilla-040, pico de botella-022, ICA1172, CDC 8, y la especie *D. rotundata*, todas ellas utilizadas usualmente para el consumo humano en la costa Atlántica colombiana. Para la caracterización molecular se utilizó la técnica AFLP puesto que detecta un gran número de polimorfismos, lo cual permite discriminar entre individuos requiriendo pequeñas cantidades de ADN genómico. Además es una técnica de gran reproducibilidad (Vos *et al.*, 1995; Innan *et al.*, 1999).

Dentro del protocolo de estandarización se utilizó inicialmente un individuo de cada una de las siete variedades de ñame de la especie *D. alata*, un individuo de la especie *D. rotundata* y un individuo de yuca (*Mandioca* sp). En una caracterización posterior se utilizaron siete variedades de la especie *D. alata* con diez individuos por variedad, la variedad de la especie *D. rotundata* con diez individuos y se utilizó, como grupo externo, la especie *D. trífida*, también con diez individuos.

Extracción del ADN:

El ADN se extrajo de hojas maceradas con nitrógeno líquido siguiendo la técnica de Dellaporta *et al.* (1983) en la que se emplea CTAB. Para optimizar la obtención

y concentración de ADN, por el alto grado de contaminación con polisacáridos y fenoles oxidantes se realizó una segunda precipitación con isopropanol y acetato de amonio (3M) durante toda la noche, posteriormente se realizaron dos lavados con etanol al 70%, se secó el pellet y se diluyó en buffer TE. La etapa de extracción de DNA se realizó en el Instituto de Biotecnología.

Obtención de los AFLP:

Para la obtención de los AFLP a partir del extracto de ADN se siguió la metodología básica de Vos *et al.* (1995), utilizando los kits de Gibco-BRL, New York Analysis System I y Analysis System II (de cada uno de ellos siete combinaciones de primers) siguiendo las instrucciones del manual. El tiempo de corrido de los geles de poliácridamida al 6% fue de 1 hora y 30 minutos, en una cámara de secuenciación marca Bio Rad (sequigen cell 38x50) con fuente de poder (power pac 3000 Bio Rad) a 100 watos constantes. Los geles se tiñeron con nitrato de plata. La obtención de AFLP se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira-Colombia, bajo la supervisión del doctor Joe Tohme.

Para la caracterización preliminar se hizo una preamplificación del ADN con un nucleótido seleccionante (+1) y posteriormente se realizaron las amplificaciones a partir de tres nucleótidos seleccionantes (+3+3), con seis combinaciones de primers diferentes para cada uno de los fragmentos obtenidos a partir de las enzimas de digestión, *Eco RI* y *Mse I*. Las seis combinaciones de primer fueron las siguientes: (1) E-AAG, M-CAC; (2) E-AAC, M-CAG; (3) E-AAC, M-CTA; (4) E-ACC, M-CAA; (5) E-ACC, M-CAC; (6) E-ACG, M-CAA. El segundo análisis se realizó con el Analysis System II a partir de una preamplificación igual (+1) y siete combinaciones de primers, utilizando en este caso dos nucleótidos seleccionantes para la enzima *Eco RI* y tres para la *Mse I* (+2+3). Las combinaciones de primers fueron las siguientes: (1) E-AG, M-CAT; (2) E-AG, M-CTA; (3) E-AG, M-CTC; (4) E-AC, M-CAC; (5) E-AC, M-CTG; (6) E-AC, M-CTT; (7) E-AA, M-CTG.

Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se realizaron matrices de presencia-ausencia de bandas con cada uno de los

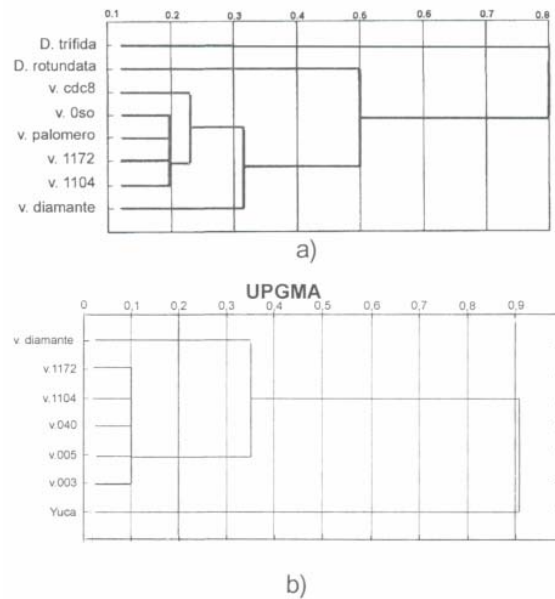


Figura 1. a) Dendrograma obtenido de los resultados finales a partir del análisis de agrupamiento UPGMA. Dendrograma de similitudes entre las especies de ñame, *Dioscorea rotundata*, *Dioscorea trifida* y las variedades de *Dioscorea alata* (cdc8, oso, palomero, 1172, 1104 y diamante) b) Dendrograma entre las variedades de *D. alata* y la yuca

resultados obtenidos de las diferentes combinaciones de primers. Se determinaron las matrices de similitud con el índice de similitud de Dice-Nei (1987) utilizando el paquete estadístico Gel Stats (Pelikan y Rogstad, 1996); posteriormente con las matrices de distancia se construyeron los dendrogramas utilizando el paquete estadístico MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) con la estrategia de agrupamientos UPGMA (Unweighed Pair Group Meted AVERAGE) (Sudhir *et al.*, 2001). Finalmente se realizó una comparación entre matrices utilizando el análisis de permutaciones de Mantel, (Doyle *et al.*, 1993; Nei *et al.*, 1979; Sneath *et al.* 1973).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los Analysis System I y System II se obtuvieron los resultados que se agrupan en la tabla 1.

Los resultados sugirieron que las combinaciones (+2,+3) aportados por el Analysis System II ofrecen mejor discriminación entre los individuos, pues permiten detectar un mayor número de bandas polimórficas, comparado con el Analysis System I.

Por tanto, en la caracterización final de diez individuos por variedad se utilizaron 64 combinaciones de primers del Analysis System II, con segregantes agrupados que mostraron polimorfismos en el total de diez individuos por cada variedad y por especie.

El análisis estadístico de matrices de similitudes permitió establecer el dendograma que se ilustra en la figura (1).

La técnica de AFLP permitió encontrar diferencias entre las bandas polimórficas de las especies de ñame estudiadas, *D. alata*, *D. rotundata*, *D. Trífida*, y se pudo diferenciar también claramente la yuca (*Mandioca* sp).

Dentro de las especies de ñame, los resultados estadísticos de las matrices derivadas de los patrones de AFLP mostraron diferencias claras entre las especies *D. rotundata* y *D. trifida*. Sin embargo, cuando se analizaron las siete variedades de *D. alata* utilizadas en el programa PBA, éstas se congregaron en tres grupos, teniendo en cuenta los polimorfismos presentes: un primer grupo que incluye la variedad cdc8; un segundo grupo que incluye las variedad diamante-22, y un tercer grupo que incluye las variedades oso, canilla, pico de botella, palomero, ICA1172, las cuales presentaron patrones de bandas idénticos.

En otras palabras, las siete variedades de *Dioscorea alata* diferenciadas a partir de marcadores agromorfológicos se agrupan solamente como tres variedades diferentes, desde la óptica molecular. Los resultados son consistentes en la medida en que fueron reproducibles en los diez individuos de cada especie o variedad analizada.

Tabla 1. Número de bandas polimórficas obtenidas con los distintos primers de los Análisis System I y II.

Analysis System I		Analysis System II	
Combinación de primers (+3,+3)	Total bandas	Combinación de primers (+2,+3)	Total bandas
E-AAG, M-CAC	48	E-AG, M-CAT	77
E-AAC, M-CAG	52	E-AG, M-CTA	85
E-AAC, M-CTA	36	E-AG, M-CTC	69
E-ACC, M-CAA	42	E-AC, M-CAC	47
E-ACC, M-CAC	34	E-AC, M-CTG	50
E-ACG, M-CAA	33	E-AC, M-CTT	42
		E-AA, M-CTG	49

CONCLUSIONES

Se puede decir entonces que la caracterización molecular realizada no es totalmente concordante con la caracterización agromorfológica de partida, y es bastante probable que existan menos variedades de las reportadas para las variedades de *D. alata* cultivadas en la costa Atlántica colombiana. Éstos son los primeros resultados sobre caracterización molecular de ñame en Colombia y sugieren que posiblemente hay una menor variabilidad del ñame cultivable en la costa Caribe con relación a los criterios de diversidad manejados por los pequeños agricultores. De otra parte, faltaría establecer una colección de *Dioscorea* más amplia sobre la base de muestrear las diferentes zonas propicias para el cultivo del ñame, con el objeto de ampliar nuestro conocimiento sobre la diversidad del ñame en nuestro país.

Los resultados del presente trabajo son de gran importancia para el estudio del ñame en Colombia, puesto que con ellos se puede ampliar la información sobre las especies de ñame (*Dioscorea* spp) en general y particularmente apoyan al PBA colombiano y al banco de germoplasma, pues se podrían reducir costos en el mantenimiento de colecciones, evitando duplicados, y de otra parte se incrementa la información de cada accesión en los bancos de germoplasma de ñame del país.

Por último, sería deseable ampliar la caracterización molecular a un mayor número accesiones o de colecciones para enriquecer la información de fichas de las colecciones o del banco de germoplasma de ñame en Colombia, teniendo en mente los programas de mejoramiento de ñame que beneficien de manera directa los rendimientos de los cultivos de pequeños y medianos campesinos de la costa Atlántica.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al doctor Joe Tohme, director de la Unidad de Biotecnología del CIAT y a las biólogas Adriana Bohórquez y Eliana Gaitán del CIAT por su asesoría en la realización de este trabajo. Este trabajo contó con la financiación de CEGA- PBA-Ñame.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez A. 2000. Prácticas Agronómicas para el Cultivo del Ñame: *Producción de Semillas por Biotecnología*. (Capítulo 3) 2000. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Editorial Unibiblos.
- Asemota, H. N., Ramser, J., López Peralta, C., Weising, K., Kahl, G. 1996. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by random amplified polymorphic DNA analysis. *Euphytica*. 92(3): 341-351.
- Asiedu, R., NG S.Y.C., Wanyera, N. M. W. 1998. Genetic improvement of yams for the 21 st century. In: *Abstracts of oral presentations at 7th triennial symposium of the International Society for Tropical Root Crops -África Branch (ISTRC-AB)*, Cotonou, Benin, 11-17 October. ISTRC-AB, UTA. Ibadan, Nigeria, p. 50.
- Dansi, A., Mignouna, D., Zoundjhekpou, J., Sangare, A., Asiedu, R., Quin, M. 1998. Varietal identification key of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis* / *Dioscorea rotundata* complex) of Benin Republic. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 116:18-25.
- Dansi, A., Mignouna, D., Zoundjhekpou, J., Sangare, A., Asiedu, R., Quin, M. 1999. Morphological diversity, cultivar groups and possible descent in the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*/ *D. rotundata*) complex in Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 46:371-388.
- Dansi, A., Mignouna, D., Zoundjhekpou, J., Sangare, A., Ahoussou, N. and Asiedu, R. 2000. Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis* / *D. rotundata* complex) cultivars using Randomly Amplified Polymorphism DNA. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 47:619- 625.
- Dellaporta, S. L., Wood J. & Hicks J. B, 1983. A plant DNA miniprep: Versión II. *Plant Mol Biol Rep.* 1:9-21.
- Dice-Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- Doyle, J. J. 1993. DNA, phylogeny, and the flowering of plant systematics. *BioScience*, 43: 380-389.
- Innan, H., Terauchi, R., Kahl, G., Tajima, F. 1999. A method for estimating nucleotide diversity from AFLP data. *Genetics*. 151(3): 1157-1164.
- Kahl, G., Ramser, J., Kaemmer, D., Kost, S., Knobloch, I., Rompí, R., Huttel, B., Geistlinger, J. et al. 1992. Gene technology and yam improvement. In: *Biotechnology: enhancing research on tropical crops in África*. Edited by: G. Thottappilly, L. M. Monti, D. R. Mohán Raj, A. W. Moore Wageningen, Netherlands: Technical Centre for Agricultural and Rural Cooperation. pp. 217-220.
- Lev, L. S., y Shrider, A. L. 1997. A trend analysis of yam production, área, yield and trade (1961-1996). In: *L'igname plante séculaire et culture d'avenir*. Actes du seminaire International 3-6 Juin, Montpellier, France.
- Mignouna, H. D. 1995. *Application of molecular genetics to assist breeding of yams* (*Dioscorea rotundata* and *D. alata*). IITA/JIC/Gatsby Collaborative Biotechnology Research Projects. Ibadan, Nigeria. UTA.
- Mignouna, H. D., Noel, T. H., Knox, M., Asiedu, R., Quat, N. 1998. Analysis of genetic diversity in Guinea yams (*Dioscorea* spp) using ALFP fingerprinting. *Trop. Agri* (Trinidad) vol 75 No. 2: 224-229.
- Nei, M. and W.H. Li, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76: 5269-5273.
- Pelikan, S., and Rogstad, S. 1996. Gel Stats versión 2.6. University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio.
- Ramser, J., Weising, K., López Peralta, C., Terhalle, W., Terauchi, R., Kahl, G. 1997. Molecular marker based taxonomy and phylogeny of guinea yam (*D. rotundata* - *cayenensis*). *Cenóme*. 40(6): 903-915.

- Richardson, T., Caqto, S., Ramser, J., Khal, G and Weising, K. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acid Research*. 23 (18): 3798-3799.
- Sneath, P., and Sokal, R. O. 1973. *Numerical Taxonomy*. San Francisco: Freeman.
- Sudhir, K., Koichiro, T., Jakobse, I., and Nei, M. 2001. *MEGA 2. Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*. Arizona, USA: Arizona State University, Tempe.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijants, M., De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23(21): 4407-4414.
- Weising, K., Beyermann, B., Ramser, J., and Kahl, G. 1991. Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis*. 12:159-169.