

UTILIDAD DE MARCADORES RAPD EN LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE QUEQUISQUE (*Xanthosoma spp.*) DE NICARAGUA. ESTUDIO PRELIMINAR

Guillermo Reyes-Castro

PhD. Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria, km 12 ½ carretera norte, Managua. Email: Guillermo.Reyes.Castro@una.edu.ni Tel: (505) 2233-1845



RESUMEN

El quequisque es un cultivo de importancia en los trópicos y subtrópicos por ser fuente de alimento y recursos para productores. Nicaragua está ubicada en el centro de origen del género *Xanthosoma*, donde pueden encontrarse muchas especies silvestres de uso potencial. Sin embargo, la información sobre la relación genética inter e intra específica es escasa. Se evaluó el uso de los marcadores moleculares generados por 40 cebadores RAPD (kits B y D, Operon technologies) en la caracterización de especies del género *Xanthosoma* colectados en Nicaragua. Con tal fin se extrajo ADN de vitropiantas de tres especies *Xanthosoma* silvestres y cuatro cultivadas, cuatro *Alocasia* ornamentales y tres *Colocasia* cultivadas. Los marcadores moleculares generados fueron sometidos al análisis fenético utilizando el programa Neighbour joining. Catorce de los cebadores revelaron polimorfismo entre los genotipos. El dendrograma generado agrupó las *Xanthosoma* cultivadas y silvestres, exceptuando *X. mexicum*. Las especies *Colocasia* y *Alocasia* no formaron un grupo claro. Este estudio confirma la variación genética en las especies *Xanthosoma* silvestres y cultivadas creciendo en Nicaragua. Los marcadores moleculares generados por los catorce cebadores RAPD pueden ser utilizados para la caracterización molecular del banco de germoplasma del género *Xanthosoma* colectado en el país.

Palabras clave: *Xanthosoma*, marcadores moleculares, diversidad genética, RADS

Abreviaturas: RAPD, técnica del ADN polimórfico amplificado al azar.

ABSTRACT

Cocoyam is an important crop located in tropic and sub-tropic because it provides food and incomes to peasant. Nicaragua is in the centre of origin of *Xanthosoma* genus where wild species with potential use can be found. Nevertheless, the information about the genetic relationship among and within genera is scarce. The use of molecular markers generated from 40 RAPD primers (B and D kits Operon technologies) in the characterization of *Xanthosoma* species grown in Nicaragua was evaluated. With this purpose DNA from four cultivated and three wild *Xanthosoma*, four ornamental *Alocasia*, and three cultivated *Colocasia* genotypes was extracted. The generated molecular markers were submitted to phenetic analysis using the Neighbour joining program. Fourteen of all the primers revealed polymorphism between the genotypes. Dendrogram generated grouped the cultivated and wild *Xanthosoma* together excepting *X. mexicanum*. The *Colocasia* and *Alocasia* species did not form any clear group. This study confirms the genetic the variation in wild and cultivated *Xanthosoma* family grown in Nicaragua. The polymorphic molecular markers generated for the 14 RAPD primers can be used for the molecular characterization of the *Xanthosoma* germplasm collected in Nicaragua.

Key words: Genetic diversity, RAPD markers, *Xanthosoma*

Quequisque (*Xanthosoma* spp.), la segunda *Araceae* comestible más importante en el mundo (Bown, 2000), suministra carbohidratos, proteínas, grasas y vitaminas (Tambong *et al.*, 1997; Mayo *et al.*, 1997) y recursos a los productores (Tambong *et al.*, 1997).

El género *Xanthosoma* pertenece a la tribu *Caladieae*, y es originario de América Tropical y Subtropical, donde se distribuyen 57 especies (Mayo *et al.*, 1997; Bown, 2000). En Nicaragua, ubicada en el centro de origen de *Xanthosoma*, el quequisque se cultiva a nivel nacional y es la segunda raíz y tubérculo en áreas de producción (Reyes *et al.*, 2009). En la producción nacional se emplean relativamente pocos cultivares, ninguno de ellos resistente a las principales plagas y enfermedades que causan drásticas reducciones en la producción.

Debido a las afectaciones por el Dasheen Mosaic Virus (DsMV), *Pythium myriotylum*, (mal seco) y los cambios climáticos, la producción quequisquera nacional ha disminuido significativamente en los últimos años, por lo que urge iniciar trabajos de mejora genética en búsqueda de cultivares resistentes. Una importante acción orientada a encontrar genes de resistencia ha sido la colecta y el establecimiento del banco de germoplasma de la especie *Xanthosoma* realizada por García (2007). Dicho banco está conformado por 61 accesiones de 6 especies (*Xanthosoma violaceum*, *X. sagittifolium*, *X. atrovirens*, *X. mexicanum*, *X. wendlandii* y *X. robustum*). Veintitrés de las accesiones son cultivadas comestibles y 22 son parientes silvestres cercanas de las cultivadas. Todas las accesiones han sido caracterizadas morfológicamente, sin embargo, se requiere la caracterización molecular para complementar los estudios de premejora.

Hasta hace pocos años la información generada en términos de la diversidad genética del género *Xanthosoma* era escasa. En la actualidad las técnicas moleculares han permitido el incremento en el número de estudios de diversidad genética en *Xanthosoma* y géneros relacionados. La técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, por sus siglas en inglés) ha generado información valiosa en estudios de diversidad genética y parentesco entre especies. La evaluación de la diversidad genética del género *Xanthosoma* en Nicaragua utilizando marcadores moleculares podría revelar la relación genética entre especies cultivadas y silvestres a nivel intra e interespecífica y entre el género *Xanthosoma* y otros géneros dentro de la familia de las *Aráceas*. Lo anterior es de gran valor práctico para propósitos de conservación, propagación y mejora genética del quequisque.

Considerando la necesidad de ampliar el conocimiento de la diversidad genética del quequisque para los fines

prácticos antes mencionados, se llevó a cabo el presente estudio cuyo objetivo fue evaluar la utilidad de marcadores moleculares generados por 40 cebadores RAPD en el estudio de la diversidad genética de varias especies del género *Xanthosoma*. La información generada servirá para la caracterización molecular del banco de germoplasma del género *Xanthosoma* colectado en Nicaragua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se colectaron cormos y cormelos de plantas de tres especies silvestres y cuatro cultivadas del género *Xanthosoma*, cuatro especies ornamentales de *Alocasia* y tres especies cultivadas de *Colocasia*. Todo el material vegetal antes descrito se colectó en diferentes zonas de Nicaragua (tabla 2). Yemas aisladas de cormos y cormelos se establecieron *in vitro* en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA). Las plantas fueron trasladadas en tubos de ensayo al Departamento de Biología de Plantas y Genética Forestal de la Universidad de Ciencias Agrícolas de Suecia (SLU, por sus siglas en sueco). Se colectaron muestras de las hojas jóvenes por genotipo y se les extrajo el ADN genómico con el kit de extracción de ADN DNeasy™ Plant Minikit. El ADN de las muestras fue mantenido a -20 °C.

Reacción PCR. Se evaluaron 40 cebadores de los kits Operon B y D (Operon Technologies, Alameda, CA). La reacción de amplificación se realizó siguiendo las recomendaciones de Williams *et al.*, (1990). La mezcla de la reacción PCR consistió en 2.5 µl de 10 X buffer sin MgCl₂ (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3 a 20 °C); 2.4 µl de MgCl₂ (2.5 mM); 1 µl de solución de nucleótidos (100 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 0.5 µl de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas™ 500 unidades); 15.1 µl de agua bidestilada-desionizada estéril, 2.0 µl de cebador específico y 1.5 µl de la muestra de ADN.

Amplificación PCR. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador PCR Express Thermal Cycler (Hybaid) el cual se programó para el precalentamiento por tres minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 35 segundos a 95 °C, 35 segundos a 35 °C, y 1.2 minutos a 72 °C, y finalmente el paso de elongación por 10 minutos a 72 °C.

Aproximadamente 15 µl de los productos PCR amplificados se depositaron en un gel de sacarosa (0.8%) y separados por electroforesis en un búfer de 0.5 X Tris-Borate EDTA a 5 V cm⁻¹. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y los productos PCR visualizados con luz ultravioleta, y fotografiados con una cámara Gel Doc 2000 cámara (BIO-RAD). Un marcador molecular Ladder de 100 pares de bases fue incluido en todos los

geles como indicador del peso molecular aproximado de las bandas.

Análisis de los datos RAPD. Con el objetivo de contabilizar las bandas reproducibles e inequívocas, todas las muestras de ADN se amplificaron dos veces con el mismo cebador en rondas PCR independientes. Las bandas registradas que diferían entre dos o más individuos eran consideradas ADN polimórficas y fueron utilizadas como marcadores genéticos. La presencia o ausencia de productos amplificados se registraron utilizando el sistema binario de 1 = banda presente y 2 = banda ausente. La matriz de doble entrada generada (bandas por genotipos) fue utilizada para calcular el coeficiente de similitud de Jaccard con el programa SIMQUAL. Posteriormente mediante el análisis de agrupamiento, utilizando la técnica de ligamiento promedio no ponderado UPGMA (por sus siglas en inglés), se obtuvo un gráfico de la relación genética entre los genotipos en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Catorce de los 40 cebadores evaluados (35%), fueron altamente informativos, generaron desde una (OPD-15) hasta 20 bandas (OPD-3) con rangos de tamaño de 0.25 a 3 kb (tabla 1). En total se obtuvieron 173 bandas. Los cebadores de las series D: 03, 05, 07, 08, 11, 13, 18, 19 y 20; y el cebador B-20 produjeron de 10 a 20 bandas. Estos cebadores pueden ser utilizados para diferenciar las especies *Xanthosoma* de otros géneros.

Tabla 1. Cebadores más informativos.

Cebadores	Bandas generadas	Rango de bandas por genotipo	Promedio de bandas por genotipo	Secuencia de nucleótidos
OPB-1	7	1-7	3.3	GTTTCGCTCC
OPB-11	8	0-8	3.5	GTAGACCCCTT
OPB-20	10	0-7	9.1	GGACCCCTTAC
OPD-3	20	2-10	6.1	GTCGCCGTCA
OPD-5	11	3-10	5.7	TGAGCGGACA
OPD-7	12	0-8	3.6	TTGGCACGGG
OPD-8	14	0-9	4.3	GTGTGCCCCA
OPD-11	19	2-11	6.6	AGCGCCATTG
OPD-13	17	0-4	8.3	GGGGTGACGA
OPD-15	1	0-1	0.4	CATCCGTGCT
OPD-17	8	0-4	2.4	TTTCCCACGG
OPD-18	13	2-8	4.3	GAGAGCCAAC
OPD-19	16	0-11	3.9	ACCCGGTCAC
OPD-20	17	0-18	9.1	ACCCGGTCAC

El cebador OPD-15 consistentemente amplificó una banda en los cuatro genotipos *Xanthosoma* cultivados y dos silvestres (Xa-S1 y Xa-S2). Ejemplos del patrón de bandas y los tipos de polimorfismo generado se presentan en la Figura 1.

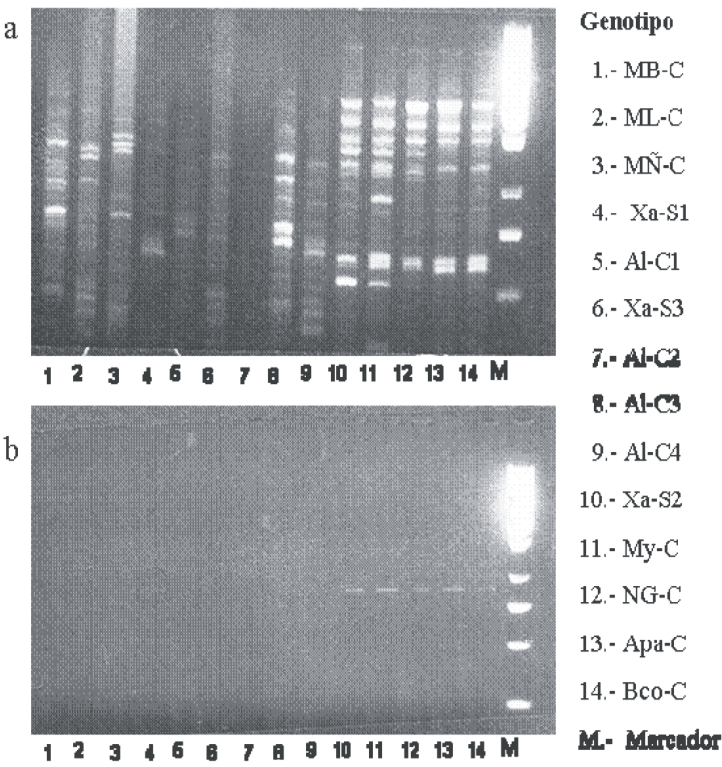


Figura 1. Amplificaciones obtenidas de los cebadores OPD-13 (a) y OPD-15 (b). Los números indican el orden en que fueron puestas las muestras de ADN de cada genotipo en los pocillos del gel de agarosa. Letra M: posición que ocupó el marcador molecular Ladder.

Los cebadores OPD-13 (Figura 1, a) reconocieron y amplificaron diferentes sitios en el ADN de las genotipos evaluados, exceptuando AL-C2 (pocillo 7 en el gel de agarosa). Varias bandas generadas fueron comunes solo para los genotipos y especies *Xanthosoma* (pocillos 4, 10, 11, 12, 13 y 14), otras eran comunes para la mayoría de genotipos, y otras solo eran compartidas por un

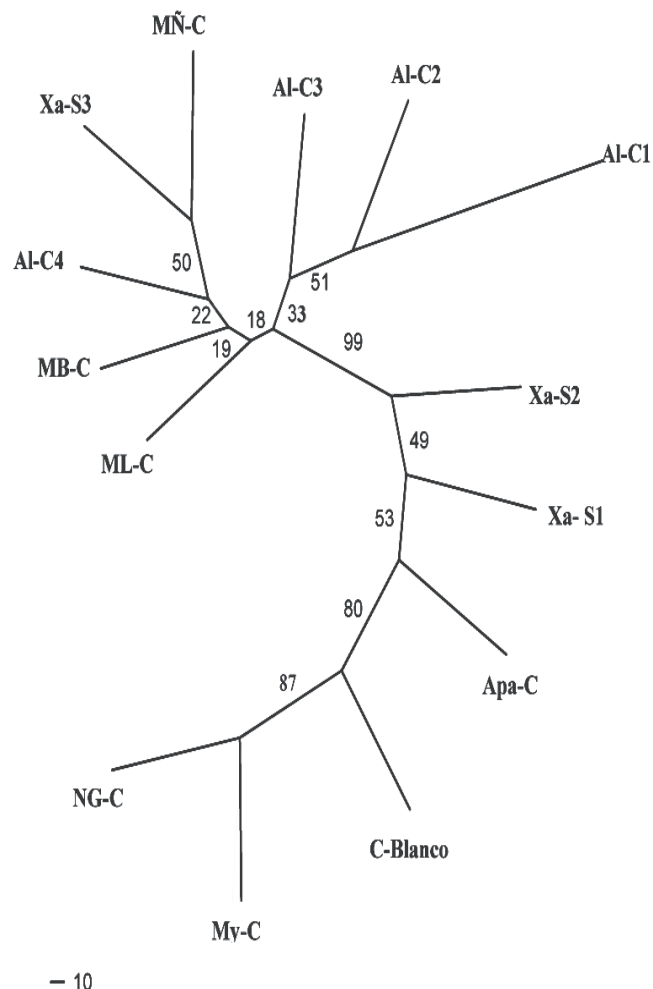


Figura 2. Análisis de los marcadores moleculares RAPD. La escala numérica indica la similitud genética. Los códigos de las accesiones corresponden con la Tabla 1.

pequeño grupo de genotipos. Los cebadores OPD-15 sólo reconocieron y amplificaron un sitio en la cadena de ADN de las especies *Xanthosoma* (pocillos 4, 10, 11, 12, 13 y 14), (Figura 1, b).

El análisis de los datos generados por los marcadores RAPD conglomeró claramente las cuatro especies cultivadas y las dos silvestres (Xa-S1 y Xa-S2) del género *Xanthosoma* en un grupo en la figura 2. *X. mexicanum* junto a las *Colocasia* y *Alocasia* no formaron grupos que se definan claramente (Figura 2).

La caracterización de especies *Xanthosoma* utilizando descriptores morfológicos ha sido reportada por Tambong *et al.* (1997) y Milian *et al.* (2003). Sin embargo a pesar de su importancia, Arús *et al.* (2001) asocia la caracterización morfológica a varios inconvenientes: hay que esperar que la planta llegue a su estado adulto para ver su fenotipo, el número limitado de marcadores, los efectos deletéreos y los fenotipos indeseables asociados

con algunos marcadores, generalmente son de expresión dominante, frecuentemente enmascarados por efectos epistáticos e influencias ambientales.

Los marcadores moleculares del tipo RAPD han sido probados por su consistencia en la evaluación de colecciones de germoplasma de diferentes especies, y en estudios de estimación de relaciones genéticas. Tienen la ventaja de la simplicidad y habilidad para detectar relativamente pequeñas proporciones de variación genética. Sin embargo, se les cuestiona la baja reproducibilidad de sus bandas, la co-migración de diferentes productos amplificados y que detectan únicamente herencia dominante (Arús *et al.*, 2001). A pesar de estos inconvenientes los marcadores moleculares tipo RAPD tienen potencial de generar gran número de marcadores con relativa facilidad.

En el presente estudio se evaluó la habilidad de 40 cebadores RAPD en detectar y amplificar fragmentos de la cadena de ADN de las muestras, y que además, los productos de la amplificación mostraran polimorfismo. Catorce de los 40 cebadores amplificaron fragmentos de ADN, pero solo 13 de ellos produjeron bandas polimórficas en diferentes cantidades y facilitaron la diferenciación de las especies de *Xanthosoma* de las especies de los otras *Aráceas*. Por ser *Alocasia* y *Colocasia* géneros originarios de África y Asia, se preveía menor parentesco genético de ambos géneros con *Xanthosoma*, como efectivamente ocurrió.

Los cebadores más informativos reportados en este trabajo (Tabla 2), pueden ser utilizados de manera directa en estudios de relación genética entre las accesiones del banco de germoplasma del género *Xanthosoma* colectado en Nicaragua. Su utilización puede ayudar a disminuir entre aquellos cultivares de quequisque que existen en el país y que son nombrados de diferentes maneras.

CONCLUSIONES

Los marcadores tipo RAPD fueron efectivos en diferenciar las especies del género *Xanthosoma* de las especies de *Colocasia* y de *Alocasia*. El análisis fenético agrupó las cuatro *Xanthosoma* cultivadas junto con otras dos especies silvestres. *X. mexicanum* y las especies *Colocasia* no formaron grupo.

El estudio confirma la variación genética entre las especies *Xanthosoma* presentes en Nicaragua y establece la línea base para futuros trabajos de caracterización molecular y utilización de las accesiones del banco de germoplasma del género *Xanthosoma* en trabajos de mejoramiento genético de esta especie.

Tabla 2. Descripción taxonómica y morfológica según especie y origen de los géneros *Xanthosoma*, *Alocasia* y *Colocasia*

Género	Especie	Código	Nombre	Origen	Descriptores morfológicos				
					Color de pecíolo	Orientación de la hoja	Pubescencia	Brillo foliar	Color de la pulpa
<i>Xanthosoma</i> Cultivadas	X. violaceum	My-C*	Masaya	Nicaragua	Verde	Hacia abajo	No	No	Lila
	<i>X. violaceum</i>	NG-C	Nueva Guinea	Costa Rica	Verde	“	“	“	Rojizo
	<i>X. violaceum</i>	Apa-C	Apali	Panamá	Verde	“	“	“	“
	<i>X. violaceum</i>	Bco-C	Blanco	Costa Rica	Verde	“	“	“	Blanco
	<i>sagittifolium</i>				claro				
	<i>X. spp.</i>	Xa-S1*	-	Nicaragua	Verde	“	“	“	“
	<i>X. spp.</i>	Xa-S2	-	Nicaragua	claro Verde	“	“	“	“
	<i>X. mexicanum</i>	Xa-S3	-	Nicaragua	claro Verde	“	Densa	No	Yellow
<i>Alocasia</i> Cultivadas	<i>A. spp</i>	Al-C1	-	Desconocido	Verde	Hacia arriba	“	Si	Blanco
	<i>A. spp</i>	Al-C2	-	“	Púrpura	“	“	Si	“
	<i>A. spp</i>	Al-C3	-	“	Verde	“	“	Si	“
	<i>A. spp</i>	Al-C4	-	“	V+ puntos lilas	3-dimensional	“	Si	“
<i>Colocasia</i> Cultivadas	C. esculenta	MB-C	Malanga Blanca	“	Verde	Hacia abajo	“	No	Blanco
	<i>C. esculenta</i>	ML-C	Malanga Lila	“	Verde	“	“	No	B + puntos lilas
	<i>C. e. antiquorum</i>	MÑ-C	Nampí	“	Verde	“	”	No	Blanco

* C = cultivadas; S = silvestres

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arús, P; Cubero, Ji; García, J; Rallo, L. 2001. Marcadores moleculares en genética y mejora de plantas. En: Introducción a la Biotecnología Vegetal: métodos y aplicaciones. Caballero, Valpuesta y Muñoz Ed.
- Bown, D. 2000. Aroids. Plants of the Arum Family. Second Edition. Timber Press. 392 p.
- García, C. 2007. Colecta y establecimiento de banco de germoplasma en colección viva e *in vitro* del género *Xanthosoma* en Nicaragua. Tesis de grado. Universidad Nacional Agraria. 62 p.
- Mayo, SJ; Bogner, J; Boyce, PC. 1997. The genera of Araceae. London, Royal Botanic Garden, Kew.
- Milián, M; Xiqués, X; Román, M; González, C; Sánchez, I; Nadal, M; Beovides Guerra; Guerra, D. 2003. Caracterización de la variabilidad del género *Xanthosoma* en Cuba, con el uso de descriptores morfoagronómicos, citogenéticos e isoenzimáticos. 61 p.
- Reyes, G; Ramsell, J; Nyman, M; Kvarnheden, A. 2009. Sequence characterization of Dasheen mosaic virus isolates from cocoyam in Nicaragua. Archives of Virology. 154:159–162. DOI 10.1007/s00705-008-0257-9.
- Tambong, Jt; Ndzana, X; Wutoh, Jg; Dadson, R. 1997. Variability and germplasm loss in the Cameroon national collection of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* Schott (L.). Plant Genetic Resources Newletters, No. 112:49-54.
- Williams J, GK; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers. Nucleic Acids Research, Vol 18, No 22: 6531-6535.