



GOBIERNO NACIONAL DE LA
REPÚBLICA DEL ECUADOR

VIII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE SIRGEALC



Fecha: 21 al 23 de noviembre de 2011

Resúmenes de los Trabajos presentados

Quito – Ecuador 2011®

Número de Publicación Miscelánea No 191

No. De Derechos de Autor: 037819

ISBN 978-9942-07-215-3



Todos los derechos reservados
Prohibido la reproducción total o parcial

ARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE CAMOTE (*Ipomoea* spp.) DEL BANCO NACIONAL DE GERMOPLASMA DEL INIAP MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

G. Basantes¹, G. Miño¹, G. Cobeña² y E. Morillo¹

¹ INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. Departamento Nacional Biotecnología. Panamericana Sur km1. mail: biotecnologia.eesc@iniap.gob.ec

² INIAP. Estación Experimental Portoviejo (EEPO). Mail: gloria.cobena@iniap.gob.ec

Palabras claves: *Ipomoea*, camote, microsatélites, germoplasma, caracterización molecular

Introducción

La biotecnología moderna ha puesto al alcance de los fitomejoradores, herramientas que permiten dilucidar la estructura y variabilidad genética de una población o colección de germoplasma. El valor de las colecciones de recursos fitogenéticos reside en la utilización que de ellas se haga para producir nuevos cultivares, domesticar nuevas especies y desarrollar nuevos productos, para el beneficio de las actividades productivas. Las colecciones deben proveer a los mejoradores, genes o genotipos que les permitan responder a los nuevos desafíos planteados por los sistemas productivos, siendo para ello imprescindible conocer las características del germoplasma conservado. Esta investigación tuvo por objetivo caracterizar el polimorfismo de la colección Nacional de Camote del INIAP mediante marcadores microsatélites utilizando la tecnología M13-Tailing en el LI-COR 4300S.

Objetivos

Caracterizar molecularmente la colección nacional de camote (*Ipomoea spp.*) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSRs).

Metodología

Material vegetal: Se colectó material foliar de 59 accesiones de la colección de camote y 36 accesiones de especies silvestres del género *Ipomoea* del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP.

Extracción y cuantificación de ADN genómico: La extracción de ADN se realizó a partir de 0.5 g de tejido foliar deshidratado utilizando el protocolo de Doyle & Doyle (1998). La concentración y calidad de las muestras de ADN se analizaron por fluorescencia con bromuro de etidio (EtBr) mediante electroforesis. Las soluciones de ADN se normalizaron a una concentración de 5 ng/μl para los ensayos de amplificación.

Primers SSRs y metodología de análisis: Para el análisis se seleccionaron once primers de los publicados por Huamani *et al.* 2010. La técnica de detección de los SSRs empleada en el laboratorio se denomina "M13-Tailing", usando el equipo LI-COR 4300S. Las imágenes de las corridas son posteriormente procesadas en un software de lectura y registro de datos SAGA GT 4200-507 Version 3-3 R S/N 412^a, LI-COR Biosciences.

Estandarización del Genotipaje: Se obtuvieron cuatro combinaciones dúplex y tres primers se corrieron individualmente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Combinaciones múltiplex PCR y monoplex de primers SSR para el genotipaje de camote.

Combinación	Primers	Tamaño (pb)	Temp. Annealing	Marcaje IRDye
A	SSR-N18	188	59 °C	800
	SSR-N34	292	55°C	800
B	SSR-R10	177	60°C	800
	SSR-E5	220	60°C	800
C	SSR-N37	195	55°C	700
	SSR-Y46	144	55°C	700
D	SSR-R4	216	60°C	700
	SSR-R27	149	60°C	700
Monoplex	Primers	Tamaño (pb)	Temp. Annealing	Marcaje IRDye
M1	SSR-E14	110	57°C	700
M2	SSR-E27	130	57°C	700
M3	SSR-R19	181	65°C	700

Análisis estadístico:

a) *Distancias genéticas*: utilizando el software PowerMarker (Liu y Muse, 2005) se convirtió a la matriz de genotipos en una matriz de frecuencia con datos binarios (1 y 0), esto con el fin de obtener una matriz de distancia escogiendo la opción de alelos compartidos (*Shared Allele Distance, DAS*).

b) *Análisis de agrupamiento y multivariado*: La matriz binaria fue importada al programa NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002) para realizar un análisis de agrupamiento (*Cluster Analysis*). Se calculó la matriz de similitud utilizando el coeficiente SM y posteriormente mediante la aplicación "clustering" opción SAHN se obtuvo un árbol UPGMA (*Unweighted-Pair Group Method Arithmetic Average*) que grafica las relaciones entre genotipos. También se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCO).

c) *Test de asignación*: utilizando el programa STRUCTURA versión 2.0, se realizó un test de asignación no bayesiano con un valor predefinido de poblaciones de K=3, con el fin de determinar la estructura del germoplasma analizado y las relaciones genéticas entre los grupos conformados.

Resultados y discusión

Diversidad genética Los análisis estadísticos en Power Marker se realizaron con ocho primers que revelaron perfiles diploides, ya que los primers SSR-N37, SSR-Y46 Y SSR-R19, revelaron más de dos bandas (alelos) en algunas accesiones. En el análisis de la diversidad genética de 89 individuos con ocho loci microsatélites, se encontró un total de 68 alelos en toda la población estudiada, con un promedio de 8.5 alelos/locus, siendo un valor de riqueza media alélica significativamente alto. Los tamaños para estos alelos fluctuaron entre 178 pb y 317 pb. En cuanto a la diversidad genética de los materiales de camote el locus con mayor número de

genotipos fue el IbE 14, con 35 genotipos, a diferencia de los locus IbN34 e IbN27 que presento únicamente nueve genotipos. Otro parámetro analizado fue la heterocigosidad esperada (HE), en donde el locus IbE 14 presentó el valor más alto con 0.9284. El valor promedio de HE para todos los loci fue de 0.7050, mientras que se presentó una heterocigosidad observada (Ho), de 0.3104.

Análisis de Agrupamiento: el dendrograma de la Fig. 1 distingue la conformación de dos grupos en las 89 accesiones analizadas. El Grupo 1 está conformado por 2 subgrupos A y B; el subgrupo A incluye a materiales cultivados de camote, denominados como "G1". En el subgrupo B se encuentran los materiales silvestres del género *Ipomoea*, denominados como "S", dentro de los cuales se encuentran materiales sin identificación taxonómica (*Ipomoea spp.*). El grupo G2 abarca los materiales cultivados.

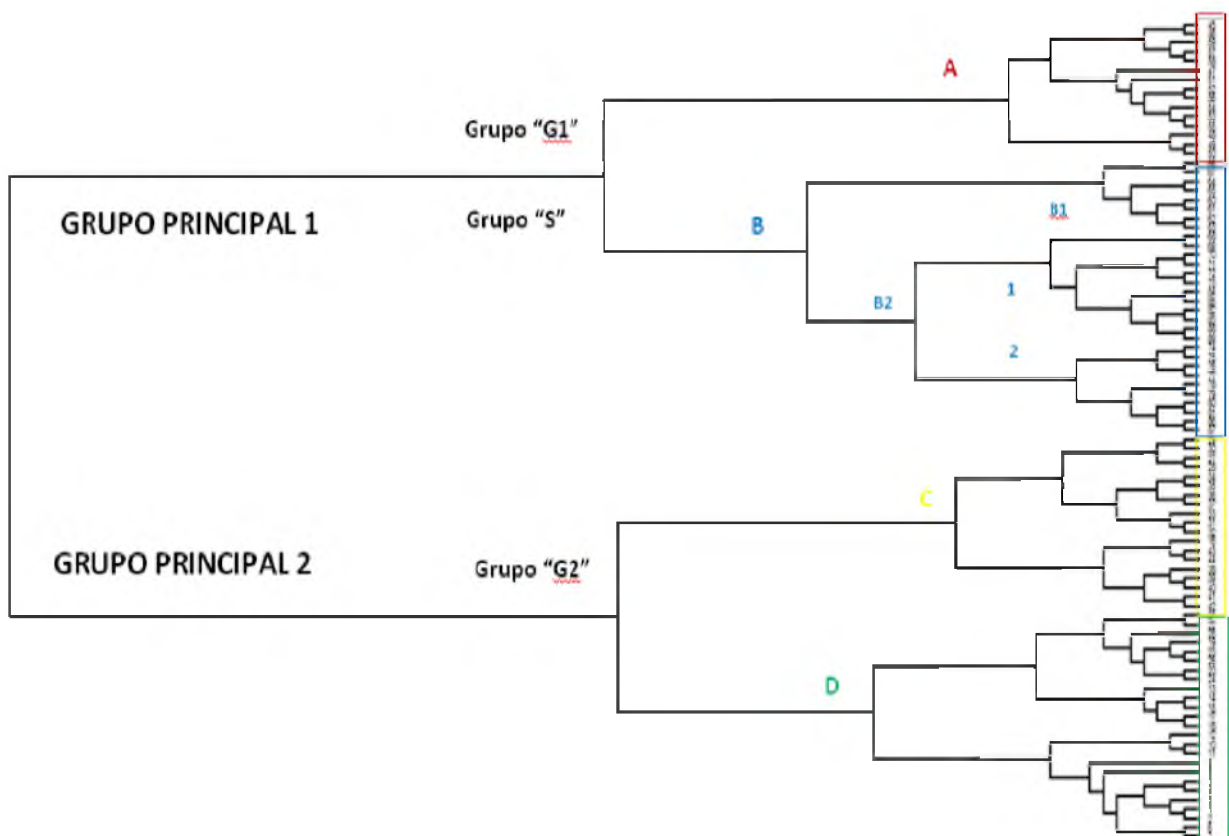


Figura 1. Dendrograma UPGMA basado en (DAS), que indica la agrupación de 89 materiales analizados con 8 SSRs. Los rectángulos de colores simbolizan a poblaciones de camote cultivado (*Ipomoea batatas*) y materiales silvestres del género *Ipomoea*. Los subgrupos se encuentran especificados a la derecha A, B, C, D.

Análisis Multivariado: el análisis PCO determinó la distribución espacial de las accesiones en función de los dos primeros ejes que extraen en conjunto el 45.5% de la varianza total observada (Fig. 2). Se aprecia la formación de tres grupos genéticos anteriormente denominados como "G1", "G2" y "S". La primera coordenada (coordenada X) muestra un 25.40 % de la variación total, y aporta a la diferenciación de los grupos "G1", "G2" y "S", mientras que la segunda coordenada (coordenada Y) muestra un 20.17 % de la variación total y aporta a la diferenciación de los grupos cultivados "G1" y "G2".

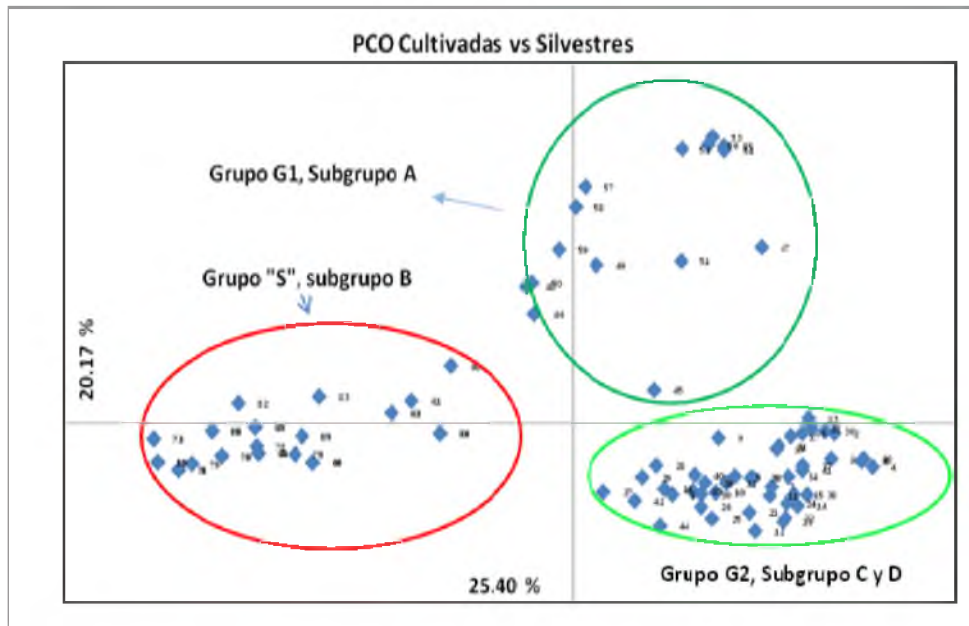


Figura 2. PCO obtenido con el coeficiente de similitud (SM), que indica la agrupación de 89 materiales en 2 coordenadas, analizados con 8 SSRs

Análisis de asignación genética (K=3): Distinguió a los tres grupos de análisis: "G1", "G2" y "S". En los resultados se puede que se asignaron a 44 individuos al grupo "G2", 15 individuos al grupo "G1", 24 al grupo "S" y 6 individuos no fueron asignados a ninguno de los tres grupos, ya que se obtuvo valores de asignación intermedios, considerándose como genotipos intermedios entre estos grupos genéticos (Figura 3).

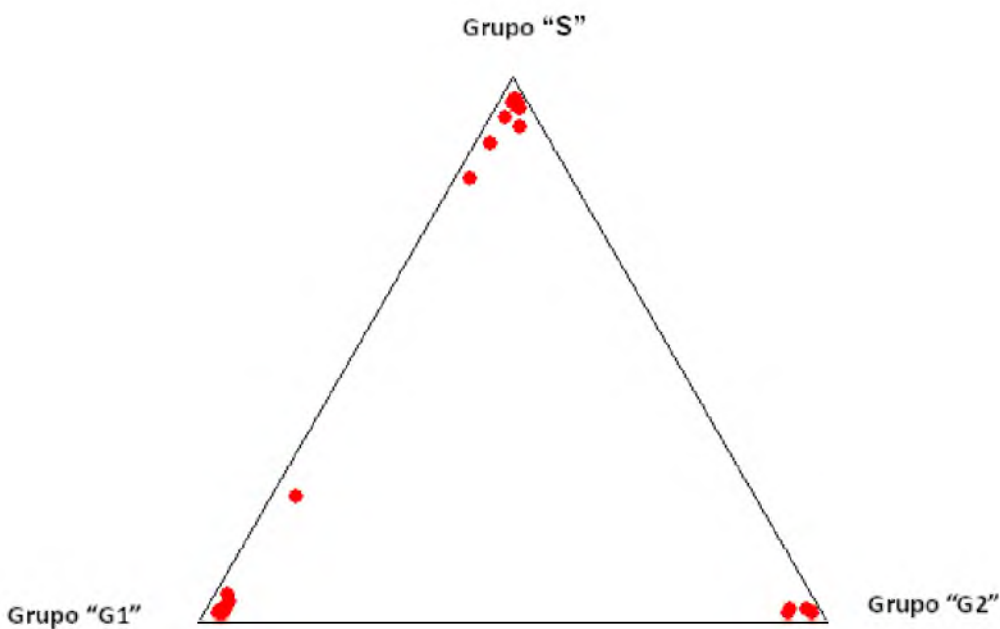


Figura 3. Asignación genética de grupos cultivados ("G1", "G2") y silvestres ("S") de camote determinados por el programa STRUCTURA con un valor de K=3

Conclusiones

- Los once primers SSRs probados en el germoplasma de camote se revelaron polimórficos. De 11, ocho revelaron perfiles diploides y tres revelaron patrones tri o tetraploides (poliploidia), resultado coherente con la poliploidia de *I. batatas*

- Los análisis de agrupamiento y multivariado coincidieron en la conformación de dos grupos principales y dos subgrupos en el germoplasma de camote analizado; siendo un resultado interesante la diferenciación de dos grupos genéticos a nivel del camote cultivado (G1 y G2).

- El test de asignación genética confirma la estructura del germoplasma de camote según los resultados de agrupamiento y multivariado. Los resultados revelan la existencia de genotipos intermedios entre camotes cultivados del grupo G1 y camotes silvestres.

Bibliografía

- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1998. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- Huamani; Solis, J.; Gruneberg, W. 2010. New SSR markers for sweetpotato from data mining of expressed sequence tags(ESTs). International Society for Tropical Root Crops (ISTRC). Tropical roots and tubers in a changing climate: A critical opportunity for the world, program and abstracts of papers. Lima (Peru). International Potato Center (CIP); ISTRC; Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). 2009. pp. 64-65.
- Liu, K.; Muse, S. 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*: 21(9): 2128-2129.
- Rohlf, J. 2002. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.