

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE ‘CAÑA FLECHA’ *Gynerium sagittatum* Aubl. UTILIZANDO LA TÉCNICA DE AFLP*

ANALYSIS OF THE GENETIC DIVERSITY OF ‘CAÑA FLECHA’ *Gynerium sagittatum* Aubl. USING THE AFLP TECHNIQUE

Hernando Javier Rivera Jiménez^{1§}, Isidro Elias Suárez Padron² y Juan Diego Palacio Mejía³

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Córdoba. A. A 354. Montería, Córdoba. Colombia. Tel. 00 57 4 7908023.

²Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural. Universidad de Córdoba. A. A 354. Montería, Córdoba. Colombia. Tel. 5747908023, (isuarez@sinu.unicordoba.edu.co).

³Laboratorio Central Interinstitucional de Detección y Monitoreo de Organismos Genéticamente Modificados, Instituto Colombiano Agropecuario -ICA, km 14 vía Mosquera ICA- Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Tel. 00 57 1 4227371 Ext. 1829, (juan.palacio@ica.gov.co). §Autor para correspondencia: hjrivraj@palmira.unal.edu.co.

RESUMEN

La fibra de la caña flecha *Gynerium sagittatum* (Aubl.) es materia prima para la elaboración de artesanías (Zorro y Prieto, 1999), entre ellas el sombrero vueltiao, símbolo de identidad cultural colombiana. El objetivo de este estudio fue la caracterización molecular de 25 accesiones de *G. sagittatum* (Aubl.) mediante la técnica de AFLP utilizando cuatro combinaciones de cebadores para determinar como se distribuye la variabilidad genética entre las poblaciones de distintas regiones de Colombia considerando criterios geográficos y morfológicos. El análisis de correspondencia múltiple discriminó tres grupos, donde se identifican características de importancia artesanal (comercial) y atributos agronómicos deseables para la elaboración de artesanías. Se observó una baja correlación entre la distancia geográfica y nivel de diferenciación genética de la especie, lo cual indicó un flujo del mismo material por su carácter de reproducción asexual a las diferentes regiones del país, consecuencia de un traslado de cultivos por acción antrópica.

Palabras clave: *Gynerium sagittatum* (Aubl.), recursos genéticos, agrupamiento, evaluación.

ABSTRACT

The fiber wild cane *Gynerium sagittatum* (Aubl.) is used as raw material for the elaboration of crafts (Zorro y Prieto, 1999), among them the hat “vueltiao”, symbol of Colombian cultural identity. The objective of this study was the characterization molecular of 25 accessions of *G. sagittatum* (Aubl.) by means of AFLP to determine the distribution of the genetic variation among populations from different regions in Colombia considering geographic and morphological criteria. The analyses of multiple correspondences discriminated three groups, where desirable characteristics of artisan importance (commercial) and agronomic attributes for the elaboration of crafts are identified. A low correlation was observed between the geographic distance and the level of genetic differentiation of the species, which indicated a flow of the same material by its character of asexual reproduction to the different regions in the country, as a consequence of the transfer of valuable material by entropic action.

Key words: *Gynerium sagittatum* (Aubl.), genetic resources, clustering pattern, evaluation.

INTRODUCCIÓN

La fibra de caña flecha *Gyneryum sagittatum* Aubl., es la materia prima para la elaboración de artesanías, donde se destaca el sombrero “vueltillo” símbolo de identidad cultural colombiana (Zorro y Prieto, 1999). La caña flecha es nativa del oeste de la India y se distribuye desde el sur de México a través de América Central y Suramérica hasta el Paraguay (Howard, 1979). En Colombia se distribuye en gran parte de la geografía nacional localizándose espontáneamente a lo largo de riberas de los ríos y zonas de altas precipitaciones (Zorro y Prieto, 1999). El diagnóstico más reciente sobre el estado de la biodiversidad de la caña flecha en Colombia indica que varios de sus ecosistemas se encuentran seriamente amenazados, con alto riesgo de pérdida de este recurso genético producto de la destrucción del hábitat debido actividades como la ganadería y la agricultura está conduciendo a la reducción de la variabilidad genética (Aramendiz *et al.*, 2005). Actualmente, no se conocen estudios de diversidad genética mediante técnicas moleculares de las diferentes accesiones de caña flecha. La carencia de semilla de caña flecha de óptima calidad, acorde con la demanda, amerita realizar esta investigación con el fin de generar conocimientos para apoyar tecnológicamente el cultivo y así incrementar los ingresos de los productores.

El banco de germoplasma de caña flecha de la Universidad de Córdoba el cual contiene 25 introducciones, está caracterizado mediante la descripción de la variación morfológica, particularmente características de interés directo para los usuarios (Aramendiz *et al.*, 2005). Este enfoque aunque es muy útil, tiene ciertas limitaciones: son características de baja heredabilidad frecuentemente muestra poca variación para muchos materiales estudiados y la expresión de las características está sujeta a variación ambiental y puede ser difícil de medir (Rivera *et al.*, 2007). Una manera de mitigar estas limitaciones y complementar la caracterización de esta colección es con el empleo de técnicas moleculares que analizan el polimorfismo del ADN (Karpa, 1997).

El objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad genética de 25 accesiones de caña flecha del banco de germoplasma de la Universidad de Córdoba mediante la caracterización molecular con marcadores AFLP (Voz *et al.*, 1995), que permiten establecer el índice de diferenciación genética de *G. sagittatum* Aubl. y conocer como se distribuye la variabilidad genética entre las poblaciones de caña flecha de distintas regiones de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material y condiciones experimentales

La investigación se realizó en el período enero 2006 a diciembre 2007, en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt" utilizando 25 accesiones de caña flecha entre cultivadas y silvestres, procedentes de diferentes regiones de los departamentos de Córdoba, Antioquia y Caldas, Colombia. Las accesiones pertenecen al banco de germoplasma de la Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.

Se tomó tejido foliar de las diferentes accesiones, sin nervadura central con un período no mayor de seis h después de la colecta, se almacenó la muestra en una bolsa plástica con 50 g de Sílica gel, Posteriormente se maceró con nitrógeno líquido y almacenó a -196 °C para la conservación del material vegetal. La extracción de ADN se realizó en base en los protocolos del manual Dnaeasy Plant Mini Kit (Qiagen, 2006) con algunas modificaciones, reduciendo temperaturas de incubación y tiempo de centrifugado según Rivera *et al.* (2007). La calidad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio; la cuantificación se hizo mediante el uso del marcador de peso de ADN Lambda 20-bp para la cantidad de ADN total, adicionalmente se hicieron electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y visualización en luz UV.

Se utilizó la metodología descrita por Vos *et al.*, (1995) modificada por Invitrogen (2003), y se utilizó el Kit de AFLP invitrogen starter primer kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del ADN se empleó un termociclador MJ Research PTC-100. Después de haber medido la concentración de ADN se procedió a realizar la digestión y ligación de adaptadores de los 25 ADNs de toda la población. Se evaluaron ocho combinaciones de cebadores de los cuales cuatro fueron utilizados en todas la poblaciones. Las reacciones de amplificación fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida al 6% en una cámara de electroforesis vertical BIO-RAD® y se utilizó una fuente de poder BIO-RAD Power PAC 3000.

Análisis de datos

Para realizar los análisis de diversidad genética se realizó el análisis de agrupamiento a partir de matrices

de similitud mediante la presencia (1) o ausencia (0) de bandas específicas originadas en la amplificación de los fragmentos digeridos que se transformaron en una matriz binaria. Con la matriz de datos presencia/ausencia se calculó el índice de similitud desarrollado por Dice (1945) y adaptado por Nei y Li (1979) para datos moleculares. El índice promedia los valores de similitud por par de individuos mediante la siguiente ecuación: $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$; donde, S_{ij} = similitud entre los individuos i y j ; a = número de loci compartidos por i y j ; b = número de loci presentes en i pero ausentes en j , y c = número de loci presentes en j pero ausentes en i .

Las matrices y los dendrogramas de similitud se calcularon con el programa NTSYS-PC, versión 2.02i (Rohlf, 1998) mediante el método UPGMA y el agrupamiento SAHN respectivamente. También se analizaron las relaciones entre

individuos mediante el análisis de correspondencia múltiple (ACM) con toda la población para obtener una representación gráfica de la distancia entre las introducciones.

RESULTADO Y DISCUSIÓN

La reacción de amplificación mostró que la combinación de cebadores en los primeros cuatro tratamientos presentó mayor polimorfismo (Cuadro 1). La calidad del ADN fue buena en la segunda elusión (Figura 1a), presentándose así digestión completa con las enzimas de restricción EcoRI y MseI del kit del sistema de análisis I de AFLP de Invitrogen, (2003), (Figura 1b). La reacción de preamplificación de AFLP, presentó buena amplificación durante la PCR, confirmando así el buen estado de los ADNs obtenidos.

Cuadro 1. Grado del polimorfismo detectado en las introducciones con diversas combinaciones de cebadores AFLP.

Tratamiento	Combinación de cebadores	Núm. de loci †			(% de polimorfismo ¥
		P= polimórfico y M= monomórfico			
		Total	P	M	
1	E-ACC/M-CAG	43	17	26	39.53
2	E-ACA/M-CAT	52	20	32	38.46
3	E-ACA/M-CTA	72	23	49	31.94
4	E-ACT/M-CAA	56	15	41	25.80
Total		223	75	148	33.63 §
Promedio		55.75	18.75	37	

† P= polimórfico y M= monomórfico; ¥= determinado en base del número de loci polimórficos fuera del número total de loci amplificadas por una combinación de cebadores a través de todas las variedades; §= polimorfismo promedio.

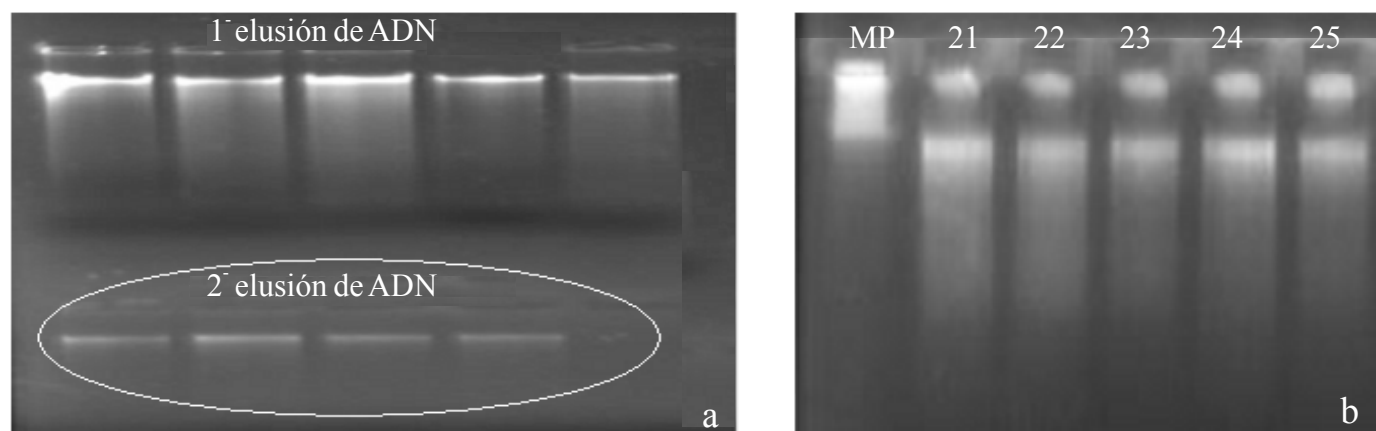


Figura 1. a) ADN total de caña flecha, y b) ADN digerido con enzimas EcoRI y MseI.

La combinación de cebadores (E-ACC/M-CAG) y (E-ACA/M-CAT) presentaron el mayor porcentaje de polimorfismo. Se obtuvieron 223 loci y se extendieron desde 43 (E-ACC/M-CAG) hasta 72 loci (E-ACA/M-CTA), con un promedio de 55.75 loci por cebador. En el estudio, 75 loci fueron polimórficos (Cuadro 1). El tratamiento con la combinación de cebadores E-ACC/M-CAG, mostró mayor porcentaje de polimorfismo. Los fragmentos de ADN amplificados estuvieron en un rango de 330 y 20 pb., obteniéndose 43 loci, 17 de los cuales mostraron polimorfismo. Utilizando la combinación de cebadores E-ACA/M-CAT se obtuvo 38.46% de fragmentos de ADN amplificados, los fragmentos estuvieron en un rango de 330 y 20 pb obteniéndose 52 loci las cuales 20 loci mostraron polimorfismo. Las combinaciones E-ACA/M-CTA y la combinación E-ACT/M-CAA mostraron un total de 72 y 56 loci, de las cuales 23 y 15 loci respectivamente eran polimórficas, obteniendo así un porcentaje de polimorfismo de 31.94% y 25.80% (Cuadro 1), los fragmentos de ADN amplificados estuvieron en un rango de 300 y 20 pb, respectivamente. Cada una de estas combinaciones presentaron perfiles de loci diferentes, por lo tanto estas combinaciones de cebadores lograron tener un alto escrutinio del genoma, identificando así la variabilidad genética en la especie.

Parte de las combinaciones de cebadores utilizados en este estudio se tomaron de trabajos recientes en caña de azúcar (*Saccharum* spp.), divulgados por Selvi *et al.* (2005), donde se realizaron estudios poblacionales de diversidad genética. Estos datos son similares a los encontrados en caña flecha con respecto al grado de polimorfismo de las combinación de cebadores utilizada para *Saccharum* spp. Besse *et al.* (1998) realizaron estudios en la misma especie obteniendo resultados similares a los descritos por Selvi *et al.* (2005), Otros estudios de similaridad genética en colecciones de cultivares brasileños de la caña de azúcar usando los marcadores de AFLP revelaron promedios altos de polimorfismo (Lima *et al.*, 2002).

El análisis de correspondencia múltiple reveló que los marcadores de AFLP eran informativos y reflejó las relaciones de similitud genética existentes entre las accesiones. Al aumentar el número de cebadores se hizo más selectivo y discriminatorio el estudio permitiendo un análisis más detallado. Al analizar la matriz de datos moleculares de todos los individuos de la población de caña flecha uniendo las matrices de las cuatro combinaciones de cebadores en un ACM bidimensional se presentó una tendencia de distribución de tres grupos (Figura 2).

Esta tendencia de agrupamiento fue similar a los grupos reportados por Aramendiz *et al.* (2005). El segundo grupo donde se encuentran las accesiones: 1, 13, 20 b, 23, 5, 14, 22, 2, 6, 8, 16 15 y 24, presentan atributos como fibra de textura suave, pubescencia escasa de la vaina verde y pared del tallo gruesa, asimismo se asocia con el área útil de la nervadura inferior y diámetro del tallo delgado y fueron colectados en los municipios de San Andrés de Sotavento, Sahagún, Ciénaga de Oro y Montelibano (departamento de Córdoba-Colombia), recibiendo el nombre de “criolla”. Los individuos de los grupos uno y tres, tienden a conformar el segundo grupo a los reportados por Aramendiz *et al.* (2005), caracterizándose por textura gruesa, abundante pubescencia en la base de la hoja y vaina, pared delgada del tallo, diámetro del tallo delgado y ligeramente grueso, área útil de la nervadura inferior a intermedia y ángulo de la hoja agudo. Este grupo contiene en su mayoría introducciones provenientes de Tierralta y San Andrés de Sotavento (Córdoba); Caucasia (Antioquia) y Chinchina (Caldas), recibiendo el nombre de caña flecha, caña brava y martinera, por tener estos cultivares una textura áspera, no apta para elaborar artesanías finas.

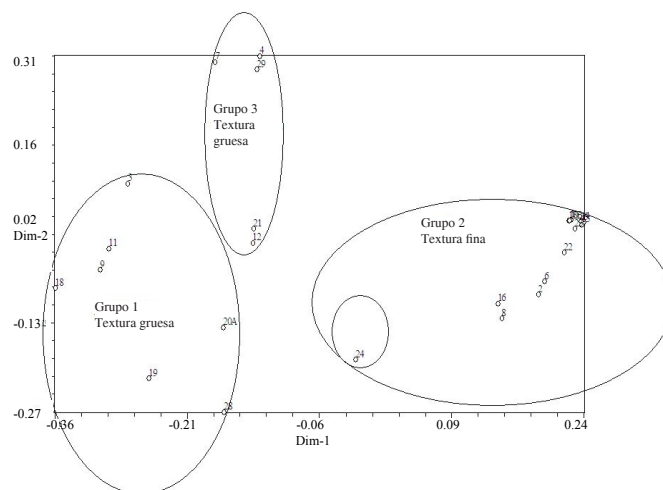


Figura 2. Análisis de correspondencia múltiple de acuerdo con los resultados de análisis AFLP en las accesiones de caña flecha (*Gyneryum sagittatum* Aubl.).

El análisis de similaridad utilizando el coeficiente de DICE, formó tres grupos (Figura 3). De acuerdo con la evidencia, la agrupación de las introducciones de caña flecha se puede deber a efectos influenciados por su constitución genética y

no por condiciones ambientales y/o geográficas. Consecuente con lo anterior y con la caracterización morfológica, el individuo 24 podría ser un cultivar promisorio para futuros programas de mejoramiento, según datos de pasaporte reportado por Aramendiz *et al.* (2005), esta accesión no tuvo incidencia de plagas como el barrenador del tallo de la caña flecha (*M. atroparsella*) plaga principal de la especie, además posee atributos agronómicos tales como: textura de la fibra suave, esta accesión se presenta como un subgrupo

aislado dentro del grupo dos en el análisis de correspondencia múltiple. El análisis de conglomerados (SAHN) detectó alta variabilidad genotípica entre las accesiones colectadas, según el dendrograma se conformaron tres grupos genéticos relacionados con las características morfoagronómicas. Los genotipos de caña flecha son producto de la selección por parte de los productores, y que los criterios de selección están relacionados con formas culturales generalizadas para comunidades específicas.

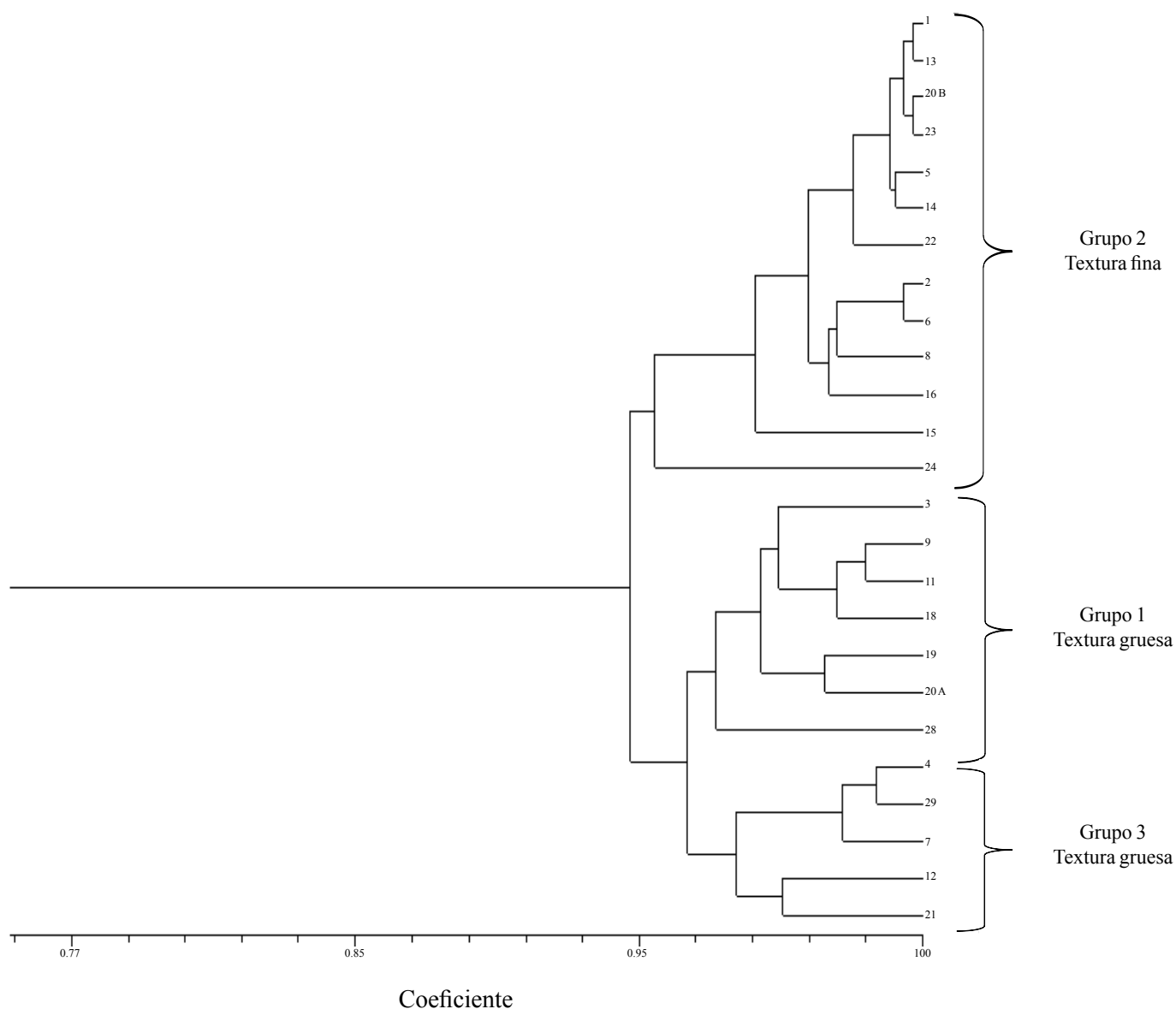


Figura 3. Dendrograma elaborado a partir de distancias genéticas por el método de DICE, obtenida de los marcadores AFLP.

La variación molecular detectada por medio de la técnica AFLP en *G. sagittatum* (Aubl.) detecta claramente tres grupos, diferenciados por sus características artesanales (comercial) y atributos agronómicos deseables tales como textura de la fibra, grosor del tallo y área útil de la nervadura inferior. El grado de diferenciación genética existente entre las introducciones de *G. sagittatum* (Aubl.) es alto, presentando baja correlación entre la distancia geográfica y el nivel de diferenciación genética.

CONCLUSIONES

La variación molecular detectada por medio de la técnica AFLP mostró en *Gynrimum sagittatum* Aubl. fragmentos específicos para cada una de las accesiones identificando individuos genéticamente diferentes centrados claramente en tres grupos, diferenciados por sus características artesanales (comercial) y atributos agronómicos deseables tales como textura de la fibra, grosor del tallo y área útil de la nervadura inferior.

La diferenciación de los tres grupos genéticos muestra que no existe agrupamiento de acuerdo a la ubicación geográfica de las introducciones, más bien un agrupamiento de acuerdo a su parentesco teniendo en cuenta similitud de caracteres cualitativos y cuantitativos de tipo genético tales como textura de la fibra, grosor del tallo y área útil de la nervadura inferior. Lo cual indica un flujo del mismo material por su carácter de reproducción asexual a las diferentes regiones del país, es consecuencia de un traslado de cultivares por acción antrópica.

Esta variabilidad genética puede ser utilizada en un programa de mejoramiento utilizando genotipos elites que permitan obtener variedades resistentes al barrenador del tallo de la caña flecha (*M. atroparsella*) plaga principal de la especie, además poseer atributos agronómicos tales como: textura de la fibra suave, que posee una alta demanda en el mercado por sus atributos artesanales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Córdoba por el financiamiento de esta investigación a través del proyecto "Caracterización molecular,

propagación *in vitro* de caña flecha (*Gynrimum sagittatum* Aubl.) del Caribe Colombiano", al personal del laboratorio de biotecnología vegetal y el grupo del laboratorio de fitomejoramiento de la Universidad de Córdoba, Montería, Córdoba - Colombia, así como del laboratorio de biología molecular del Instituto de Investigación de recursos biológicos "Alexander von Humboldt". CIAT. Palmira, Valle del Cauca - Colombia.

LITERATURA CITADA

- Aramendiz, H.; Espitia, M. y Robles, J. 2005. Colección, caracterización morfoagronómica y producción de semilla de caña flecha (*Gynrimum sagittatum* Aubl) del Caribe Colombiano. Informe final, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas, Programa de Ingeniería Agronómica, Montería. p. 52-54.
- Besse, P. G.; Tailor, B.; Carroll, N.; Berding, D.; Burner, and McIntyre, C. L. 1998. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. *Genetics* (The Hague) 104:143-153.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Howard, R. A. 1979. Flora of the lesser antilles, leeward and windward islands. Vol. 3. Arnold Arboretum, Harvard University, Jamaica Plain, MA. 586 p.
- Invitrogen. Life technologies. 2003. Instruction manual, AFLP^(R) Analysis System I and AFLP^(R) Starter primer Kit, Version B: 12 p.
- Karpa, K.; Bhat, K. V.; Ayad, W. G. and Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI. Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p. 23 - 27.
- Lima, M. L. A.; Garcia, A. A. F.; Oliveira, K. M.; Matsuoka, S.; Arizono, H.; De Souza, J. R. C. L. and De Souza A. P. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of cane *Saccharum* spp. *Theor. Appl. Genet.* 104:30-38.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endo nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(10):5269-5273.

- Qiagen, 2006. Protocol: purification of total DNA from plant tissue (mini protocol), *In*: DNeasy plant mini kit for miniprep purification of total cellular DNA from plant cells and tissues, or fungi. p. 19-21.
- Rivera, H. J.; Vallejo, F. A.; Suárez, I. y Palacio, J. D. 2007. Estandarización de la técnica AFLP para la caracterización de accesiones colombianas de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl); *In*: resúmenes XI Congreso “Asociación Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos”. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. Colombia. p. 36.
- Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-PC, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.60. Applied Biostatistics, New York.
- Selvi, A. J. L.; Nair, N. K; Noyer, N.; Singh, K. C.; Balasundaram, K. R.; Bansal, K. and Mohapatra, T. 2005. Genomic constitution and genetic relationship among the tropical and subtropical indian sugarcane cultivars revealed by AFLP. *Crop Science* 45:1750-1757.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Van Der 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 Res.* 23:4407-4414
- Zorro, W. A. y Prieto F. V. 1999. Aproximación a la problemática económica productiva de la comunidad indígena Zenú. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Santa fé de Bogotá. 369 p.