

Caracterización molecular de *Guadua angustifolia* Kunth mediante marcadores moleculares RAMs

Molecular characterization of *Guadua angustifolia* Kunth using RAMs

Paula Andrea Rugeles-Silva^{1*}, Andrés Mauricio Posso-Terranova¹, Ximena Londoño², Nancy Barrera-Marín¹, y Jaime Eduardo Muñoz-Flórez¹

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, A.A. 237, Palmira, Valle del Cauca, Colombia.

²Sociedad Colombiana del Bambú, Armenia, Quindío, Colombia. *Autor para correspondencia: paularugeles@yahoo.com

Rec.: 30.09.11 Acept.: 11.12.12

Resumen

Guadua angustifolia Kunth es un bambú del Neotrópico que se distribuye principalmente en la región Andina. En la región del Eje Cafetero colombiano esta especie presenta gran importancia por su utilización en la construcción, industrialización y fabricación de muebles y artesanías. Para conocer la diversidad genética de nueve materiales superiores de *G. angustifolia* seleccionados previamente por sus características morfológicas y físico-mecánicas se realizó una caracterización molecular usando marcadores moleculares RAMs. Se obtuvo un valor de $He = 0.31$ y un porcentaje de loci polimórfico de 81.03% lo que indica una alta diversidad genética de los materiales evaluados.

Palabras clave: Diversidad genética, eje cafetero de Colombia, *Guadua angustifolia*, marcadores genéticos, marcadores moleculares.

Abstract

Guadua angustifolia Kunth is a neotropical bamboo species distributed in the Andean region of Colombia. It has a great industrial importance in the well-known Colombian coffee region due its use in building, industrialization and furniture. In order to know the genetic diversity of nine superior materials of *G. angustifolia* previously selected by morphologic and physics-mechanic characteristics, a molecular characterization using RAMs molecular markers was carried out. Values of $He = 0.31$ and polymorphic loci percentage of 81.03% were obtained, indicating a high genetic diversity of the evaluated materials.

Key words: Genetic diversity, genetic markers, *Guadua angustifolia*, molecular markers, Colombian coffee growing zone.

Introducción

La guadua, *Guadua angustifolia* Kunth, es un bambú de las regiones tropicales de América Central y del Sur. Crece en ambientes naturales, en especial a lo largo de ríos formando bosques dominantes o mezclados con otros tipos de árboles (Kleinn y Morales-Hidalgo, 2006). En Colombia, los guaduales

se encuentran concentrados en la región central de los Andes (cordilleras Central y Occidental) generalmente entre 900 y 2000 m.s.n.m. Hasta el presente, se han reportado 30 especies del género *Guadua*; Colombia es el segundo centro de diversidad de Bambusoideae después de Brasil (Londoño, 1990; Londoño y Clark, 2002).

Debido a los largos ciclos de reproducción sexual, la identificación del bambú depende de descriptores morfológicos de sus estructuras no reproductivas, lo que limita el poder de resolución de dichos descriptores; por tanto, los marcadores moleculares son una herramienta valiosa que permite apoyar la clasificación e identificación de bambúes en todo el mundo. Los marcadores basados en la PCR están bien documentados, han sido utilizados en cientos de especies vegetales de casi todas las familias botánicas y es posible emplearlos para la identificación de especies y caracterización de cultivares (Khasay y Dancik, 1996; Samec y Našinec, 1996; Raina et al., 2001; Johnson et al., 2003).

La técnica molecular Microsatélites Amplificados al Azar (RAMs –por su sigla en inglés) combina varias características de los RAPD y microsatélites. En esta técnica, el ADN entre los extremos distales de dos microsatélites estrechamente relacionados se amplifica a través de PCR. Hantula et al. (1996) demostraron que la técnica RAMs es aplicable en el estudio de la variación genética en hongos, y Muñoz-Flórez et al. (2008) realizaron diferentes estudios de diversidad genética en microorganismos, animales y plantas utilizando esta técnica con resultados exitosos en la evaluación de la diversidad genética y la estructura poblacional. Además, los RAMs permiten determinar la variación de los individuos ya que el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado (Mahuku et al., 2002).

Dada la importancia de la guadua en el eje cafetero de Colombia, el objetivo principal de este trabajo fue determinar por microsatélites amplificados al azar (RAMs) la diversidad

genética de materiales de *Guadua angustifolia*, previamente seleccionados por características deseables para la construcción, fabricación de muebles y artesanías e industrialización, así como identificar zonas geográficas de alta diversidad genética. Lo anterior permitirá generar información fundamental para la orientación de estrategias de conservación y uso del recurso.

Materiales y métodos

Se evaluaron nueve materiales de *G. angustifolia* seleccionados previamente en los departamentos de Quindío, Caldas y Risaralda por sus características morfológicas sobresalientes, entre ellas diámetro y longitud del culmo, espesor de la pared del culmo, ausencia de ramas con espinas, simetría del entrenudo y características físico-mecánicas como compresión paralela a la fibra, corte paralelo a la fibra, módulo de elasticidad a la compresión y contenido de humedad (Muñoz-Flórez, 2011) (Cuadro 1).

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se escogieron cinco plantas de guadas por sitio, a partir de las cuales se recolectaron hojas jóvenes que fueron conservadas en nitrógeno líquido para su transporte y procesamiento posterior en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Para la extracción de ADN se utilizó la metodología propuesta por Dellaporta et al. (1983) con las modificaciones descritas por Palacio-Mejía (2004). La evaluación de la calidad y la cantidad de ADN obtenido se realizó mediante geles de agarosa al 0.8%

Cuadro 1. Materiales superiores de *Guadua angustifolia* seleccionados.

Sitio	Municipio	Departamento	Coordenadas geográficas			Uso del material
			Latitud N	Longitud O	m.s.n.m.	
A	Montenegro	Quindío	4° 51' 83"	75° 80' 25"	1252	Industrialización
C	Montenegro	Quindío	4° 33' 16.2"	75° 48' 8.3"	1250	Construcción
D	Montenegro	Quindío	4° 55' 50"	75° 80' 36"	1247	Construcción
E	Montenegro	Quindío	4° 33' 25.6"	75° 48' 28.1"	1223	Muebles y artesanías
H	Circasia	Quindío	4° 35' 50.5"	75° 39' 34.4"	1616	Construcción
M	Quimbaya	Quindío	4° 36' 25.1"	75° 44' 77"	1420	Muebles y artesanías
W	Chinchiná	Caldas	4° 58' 6.3"	75° 39' 41.3"	1318	Construcción
Z	Palestina	Caldas	5° 0.1' 22.3"	75° 39' 25.5 "	1318	Industrialización
α	Pereira	Risaralda	4° 51' 54.5"	75° 45' 8.9"	1320	Construcción

corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M; EDTA 0.001M) a 80 voltios durante 45 minutos y teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml. Las concentraciones de ADN se determinaron mediante comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago Lambda.

Marcadores moleculares RAMs

Se evaluaron siete cebadores RAMs (Cuadro 2) con las siguientes condiciones de amplificación: solución tampón 1X, MgCl₂ 2.5 mM, 0.2mM de cada dNTP, Taq Polimerasa 0.625 U, cebador 2 μM, BSA (Albumina de suero bovina) 0.4 mg/ml y ADN genómico 20 ng, en un volumen final de 25 ul.

Cuadro 2. Cebadores RAMs, utilizados en el estudio.

Cebador	Secuencia	Temperatura de hibridación
CT	DBDCTCTCTCTCTCTCTC	55
CGA	DHBCGACGACGACGACGA	58
CA	DBDACACACACACACACA	50
AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGAG	50
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	55
CCA	DDBCCACCACCACCA	55
GT	VHV GTG TGT GTG TG	58

Para los sitios degenerados se utilizaron las designaciones siguientes: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T).

Las temperaturas de hibridación se establecieron de acuerdo con el cebador utilizado (Cuadro 2). El programa de amplificación empleado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 37 ciclos de una desnaturalización a 95 °C por 30 s, una fase de hibridación a 50 – 58 °C por 45 s (dependiendo del cebador utilizado, Cuadro 2) y una extensión a 72 °C por 2 min. Se realizó una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida – bisacrilamida) corridos a 160 voltios por 1 h y teñidos con bromuro de etidio y sales de plata, como se describe en los protocolos estándar (Sambrook et al., 1989).

La información de los patrones de bandas obtenidos se registró en una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0). Para la selección de bandas polimórficas se consideró como locus polimórfico aquel en el cual la

frecuencia del alelo más común fue menor que 95%. A partir de esta matriz y con los programas SIMQUAL del paquete NTSYS- pc (NumericalTaxonomy System for Personal Computer) y el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) (Miller, 1997) se realizaron los análisis estadísticos siguientes: (1) La similitud genética se estimó mediante el coeficiente de Dice (Nei, 1978). (2) El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS –pc (versión 2.02g, 98) utilizando el UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas que usa el promedio aritmético no ponderado. (3) El dendrograma se construyó con el programa TREE de NTSYS –pc (versión 2.02g, 1998). (4) Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad promedio esperada (*He*) y el porcentaje de loci polimórficos (*P*), los cuales se estimaron sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no-sesgada de Nei (1973).

Resultados y discusión

Se encontraron concentraciones entre 50 y 300 ng/μl de ADN de buena calidad para la amplificación por PCR, lo que indica que el protocolo utilizado fue adecuado para extracción de ADN en la especie *G. angustifolia*. En los análisis se utilizaron seis de los siete cebadores RAMs evaluados por presentar algún grado de polimorfismo (Foto 1). El cebador GT no amplificó en las muestras evaluadas. Los seis cebadores empleados generaron un patrón de 116 loci con pesos moleculares entre 1400 y 200 pb. El número de loci por cebador varió entre 16 para AG y 24 para CT (Cuadro 3).

Mukherjee et al. (2010) realizaron un estudio de las relaciones genéticas entre 22 taxones de bambú con uso de Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) y cebadores aleatorios EST-Based y obtuvieron 216 bandas totales, de las cuales cinco fueron monomórficas y 211 polimórficas. Marulanda y López (2010) caracterizaron 55 accesiones de *Guadua* spp. mediante el empleo de marcadores moleculares AFLP y obtuvieron 771 bandas, de las cuales 382 fueron polimórficas. Potosí (2005) realizó la estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en *Guadua* en el departamento del Cauca, Colombia, y encontró que

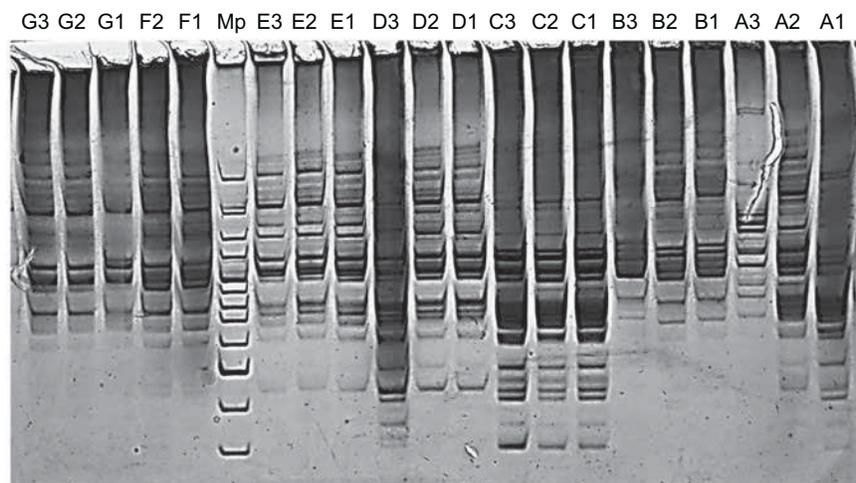


Foto 1. Gel de poliacrilamida cebador CCA, en tinción con sales de plata.

Cuadro 3. Número de loci, heterocigosidad esperada (*He*) y porcentaje de loci polimórficos para los cebadores utilizados.

Cebador	Bandas totales	Bandas polimórficas	<i>He</i>	Porcentaje de loci polimórficos
AG	16	13	0.31	81.25
CT	24	12	0.19	50.00
CCA	22	20	0.37	59.09
CGA	20	20	0.19	35.00
CA	17	17	0.35	70.58
TG	17	17	0.33	94.11
Total	116	99	0.31	81.03

cuatro de los 40 cebadores evaluados para RAPD's amplificaron en todos los individuos analizados, presentando el mayor polimorfismo, al obtener 42 loci totales, de los cuales 40 fueron polimórficos. Al comparar el número de loci encontrado en los anteriores estudios y el obtenido en el presente trabajo, se puede concluir que 116 bandas resulta un número adecuado y brinda confiabilidad para la estimación de parámetros de diversidad genética.

La heterocigosidad esperada (*He*) estima la probabilidad de que dos alelos extraídos al azar del conjunto de genes de una población sean diferentes y es un estimador de la diversidad genética. Los valores más altos de *He* para los materiales superiores se encontraron para los cebadores CCA (0.37), CA (0.35) y TG (0.33), mientras los valores más bajos fueron para los cebadores CT (0.18) y CGA (0.19). La *He* para los nueve materiales superiores fue de 0.31, lo cual indica una alta diversidad de alelos y que los materiales seleccionados co-

rresponden a diferentes genotipos y no a clones uniformes genéticamente. Esta diversidad es importante porque asegura la sostenibilidad de los materiales a través del tiempo.

Los valores de polimorfismo hallados en los materiales superiores (94.11% y 81.25%) en los cebadores TG y AG, respectivamente, permiten concluir que estos cebadores fueron los que más aportaron a la diversidad y confirman que el cebador TG es apropiado para la evaluación de la diversidad genética de materiales superiores de *G. angustifolia*. El porcentaje de loci polimórficos, confirma la alta diversidad de los nueve materiales seleccionados e indica que en el 81.03% de los casos el alelo más repetido tiene una frecuencia menor que 95%, es decir, que hay una alta diversidad por la presencia de diferentes alelos.

Análisis descriptivo de la diversidad genética

Los materiales superiores se agruparon en dos grupos con un índice de similitud de 74%

(Figura 1). El grupo **A** está conformado por la mayoría de los materiales superiores, mientras que en el grupo **B** se encuentran los materiales del sitio Z (Palestina) y dos individuos del sitio M (Quimbaya). Los guaduales del sitio α (Pereira) no se diferencian genéticamente, lo que se explica por la posible reproducción vegetativa en estos individuos. El sitio Z se diferencia de otros grupos por debajo de 75%, lo que indica que los guaduales de este sitio divergen de manera importante con respecto a otras zonas.

De manera general, se obtuvo agrupación por zona geográfica, sin embargo el dendrograma indica variación al interior de cada sitio, posiblemente debido a la presencia de reproducción sexual que puede ocurrir dos veces por año (Londoño y Peterson, 1992; Giraldo y Sabogal, 1999) y producir entre 96 y 344 semillas por floración de un culmo, las cuales en condiciones controladas tienen un alto porcentaje de germinación (Muñoz-Flórez, 2011).

Conclusiones

- Se encontró una alta diversidad genética de los materiales superiores evaluados de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero de Colombia.
- De manera general se presentó agrupación por origen geográfico, sin embargo, existe diversidad al interior de los grupos, que puede ser explicada por la presencia de reproducción cruzada y confirma los resultados obtenidos en investigaciones previas (Muñoz-Flórez, 2011).
- La alta diversidad genética hallada propone la sostenibilidad de los materiales seleccionados en el tiempo y garantiza la conservación de variabilidad necesaria para el establecimiento de futuros programas de mejoramiento genético de la especie.

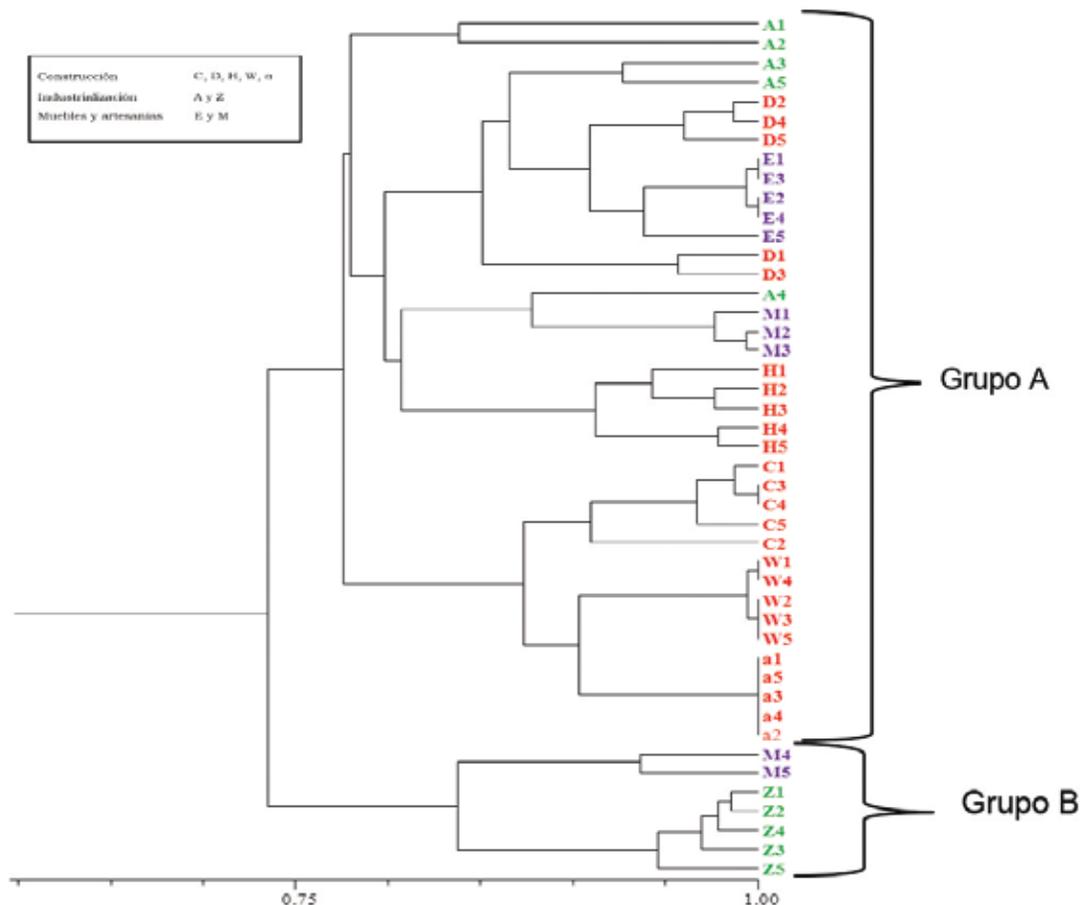


Figura 1. Dendrograma de similaridad de los materiales superiores de *Guadua angustifolia*.

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación de este trabajo de investigación a través del proyecto 2008M6336-3616.

Referencias

- Dellaporta, S. L.; Wood, J.; y Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: Versión II. *Plant Molec. Biol. Rep.* 1(4):19 - 21.
- Giraldo, E. y Sabogal, A. 1999. Una alternativa sostenible: La Guadua. Corporación Autónoma Regional del Quindío-CRQ. 192 p.
- Hantula, J.; Dusabenyagasani, M.; y Hamelin, R. C. 1996. Random Amplified Microsatellites (RAMs) - a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *Europ. J. Forest Pathol.* 26(3):159 - 166.
- Johnson, E. L.; Saunders, J. A.; Mischke, S.; Helling, C. S.; y Emche, S. D. 2003. Identification of *Erythroxylum* taxa by AFLP DNA analysis. *Phytochem.* 64(1):187 - 197.
- Khasa, P. D.; y Dancik, B. P. 1996. Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. *Theor. Appl. Gen.* 92(1):46 - 52.
- Kleinn, C. y Morales-Hidalgo, D. 2006. An inventory of Guadua (*Guadua angustifolia*) bamboo in the Coffee Region of Colombia. *Europ. J. Forest Res.* 125(4):361 - 368.
- Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae:Bambusoideae). *Caldasia* 16(77):139 - 153.
- Londoño, X. y Peterson, P. 1992. *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambusoideae), its taxonomic identity, morphology and relationships. *Novon* 2:41 - 47.
- Londoño, X. y Clark, L. G. 2002. Three new taxa of *Guadua* (Poaceae:Bambusoideae) from South America. *Novon* 12(1):64 - 76.
- Mahuku, G. S.; Henríquez, M. A.; Muñoz, J.; y Buruchara, R. A. 2002. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the bean angular leaf spot pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology* 92(6):580 - 589.
- Marulanda, M. L. y López, A. M. 2010. Estimación de la variabilidad genética en especies y genotipos del género *Guadua* en Colombia, con marcadores moleculares AFLP. En: Biodiversidad y Biotecnología de la *Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Tecnológica de Pereira. p.57 - 76.
- Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analysis. Version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- Mukherjee, A. K.; Ratha, S.; Dhar, S.; Debata, A. K.; Acharya, P. K.; Mondal, S.; Panda, P. C.; y Mahapatra, A. K. 2010. Genetic relationships among 22 taxa of bamboo revealed by ISSR and EST-based random cebadors. *Bioch. Gen.* 48:1015 - 1025.
- Muñoz-Flórez, J. E.; Morillo-Coronado, A.; y Morillo-Coronado, Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica* 57(4):219 - 226.
- Muñoz-Flórez, J. E. 2011. Diversidad genética, estructura poblacional y selección de clones superiores de *Guadua angustifolia* Kunth en la eco-región cafetera de Colombia. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 151 p.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70(12):3321 - 3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583 - 590.
- Palacio-Mejía, J. D. 2004. Estudio comparativo de la diversidad genética y divergencia evolutiva entre la especie vulnerable *Colombobalanus excelsa* (Lozano et al.) Nixon & Crepet y el roble común *Quercus humboldtii* Bondpl: implicaciones para la biología de la conservación. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 108 p.
- Potosí, C. T. 2005. Variabilidad de la guadua (*Guadua angustifolia* Kunth) en la cuenca Cauca, departamento del Cauca. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 53 p.
- Raina, S. N.; Rani, V.; Kojima, T.; Ogihara, Y.; Singh, K. P.; y Devarumath, R. M. 2001. RAPD and ISSR finger prints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44(5):763 - 772.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; y Maniatis, T. 1989. Gel electrophoresis of DNA. En: Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; y Maniatis, T. (eds.). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. p. 3 -60.
- Samec, P. y Našinec, V. 1996. The use of RAPD technique for the identification and classification of *Pisum sativum* L. genotypes. *Euphytica* 89(2):229 - 234.