

**ESTIMACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA  
INTRAPOBLACIONAL MEDIANTE EL USO DE  
FRAGMENTOS DE ADN AMPLIFICADOS  
AL AZAR\***

**ESTIMATION OF THE GENETIC  
INTRAPOBLATIONAL VARIABILITY BY MEANS  
OF USE OF RANDOM AMPLIFIED  
FRAGMENTS OF DNA**

Víctor Montero Tavera<sup>1</sup>  
Lourdes Montalvo Hernández<sup>2</sup>  
J. Luciano Morales García<sup>3</sup>  
H. Susana Azpiroz Rivero<sup>4</sup>  
Aureliano Peña Lomelí<sup>5</sup>  
Amanda Gálvez Mariscal<sup>6</sup>

**RESUMEN**

Las investigaciones que estudian la diversidad genética de las poblaciones usando fragmentos de ADN amplificados al azar (RAPD) han dado poca importancia a la variabilidad genética intrapoblacional, por lo cual existen pocos estimadores directos de esta cualidad. En este trabajo proponemos un Índice de Variabilidad Genética basado en la proporción de la presencia/ausencia de las bandas amplificadas sobre el número total de bandas por iniciador. Este estimador se aplicó a poblaciones contrastantes de especies muy diferentes: maíz, tomate de cáscara y el hongo que produce la antracnosis en el aguacate *Colletotrichum gloeosporioides*. Los resultados muestran mayor variabilidad genética en las dos poblaciones del hongo estudiadas (0.41 y 0.44). Las poblaciones de polinización abierta de maíz y autoincompatibles de tomate tuvieron valores similares (0.37 y 0.38) y de la misma forma se comportaron las poblaciones de maíz de polinización abierta y de tomate silvestre autofértil (0.26 y 0.28) respectivamente. En cuanto al Porcentaje de Bandas Polimórficas se registraron resultados irregulares. Lo anterior demuestra consistencia entre los resultados obtenidos y los esperados de acuerdo a las características de las poblaciones en estudio, por lo cual se

---

\* Artículo enviado al Comité Editorial del INIFAP - Área Agrícola el 16 de Febrero de 1999.

<sup>1</sup> Biol. Asistente de Investigación, Campo Experimental Valle de México, INIFAP, A.P. 10. C.P. 56230. Chapingo, Méx.

<sup>2</sup> Ing. Estudiante de Maestría en Ciencias, Depto. de Fitotecnia UACH.

<sup>3</sup> M.C. Investigador, Campo Experimental Uruapan, INIFAP, A. P. 128, Uruapan, Mich.

<sup>4</sup> Dra. Investigadora, Campo Experimental Valle de México, INIFAP, A.P. 10. C.P. 56230 Chapingo, Méx.

<sup>5</sup> Dr. Director del Depto. de Fitotecnia UACH.

<sup>6</sup> Dra. Profesora Investigadora, Facultad de Química, UNAM.

recomienda el uso de este estimador en estudios que involucren la determinación de la diversidad genética.

**Palabras clave:** Variabilidad genética, RAPD, maíz, tomate, *Colletotrichum*.

## SUMMARY

The researches studying the genetic diversity of the populations by using RAPD have payed little importance to the intrapoblational genetic variability. In this work we propose an Index of Genetic Variability based on the proportion of presence or absence of bands on the total number of bands per primer. This estimation was applied on contrastant populations of species totally different: maize, husk tomato and the fungus causing anthracnose in avocado cv. Hass *Colletotrichum gloeosporioides*. Results show a greater genetic variability in the two populations of the studied fungus (0.41 and 0.44). The landrace maize population and autoincompatibles of husk tomato had similar values (0.37 and 0.38) also the open pollinated maize and the husk tomato silvestre autofértil did so. The previous results demonstrate consistency between the gotten results and the model of resulting prospective according to the characteristics of the populations in study for which their use like a tool in studies is suggested that they involve the reconnaissance of genetic diversity.

**Key words:** Genetic variability, RAPD, maize, husk tomato, *Colletotrichum*.

## INTRODUCCION

La determinación de la estructura genética de las poblaciones ha sido un importante tema de estudio, particularmente a partir de la década de los 70's. Estos estudios se han llevado a cabo en diferentes etapas de acuerdo a las herramientas científicas disponibles; así, se han hecho caracterizaciones y clasificaciones mediante el empleo de descriptores fenotípicos; posteriormente se usaron los marcadores bioquímicos principalmente isoenzimas, proteínas generales y de reserva; y, en los últimos años, se han usado marcadores de ADN: RFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de restricción), RAPD (Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar), AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), etc.

Los Fragmentos de ADN Amplificados al Azar son una técnica que ha sido ampliamente usada a partir de 1990 (Williams *et al.*) en una gran variedad de especies de importancia agronómica (maíz, frijol, cebada, trigo, arroz, etc.) y fitopatológicas (antracnosis de frijol, aguacate y fresa, *Fusarium* spp., tizón, etc.). Los temas de estudio abordados han sido muy variados: determinación de relaciones filogenéticas, de patotipos de diversas especies, de estructuras genéticas, elaboración de mapas genéticos, asociación de marcadores RAPD con loci de caracteres cuantitativos (QTL), etc. Otoyá *et al.* (1995) estudiaron la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* en Colombia encontrando una amplia variabilidad de este patógeno. Por otra parte Achenbach *et al.* (1997) encontraron una alta homogeneidad entre

aislamientos de *Fusarium solani* que causan el síndrome de "muerte repentina" de la soya; Udupa *et al.* (1998) obtuvieron similitud de resultados al comparar marcadores RAPD y microsatélites para resolver la diversidad de patotipos en *Ascochyta rabiei*; Altomare *et al.* (1997) encontraron bandas RAPD específicas para diferenciar taxones entre *Fusarium acuminatum*, *Fusarium sporotrichioides* y *Fusarium tricinctum*; Russel *et al.* (1997) al comparar los niveles de variación genética entre accesiones de cebada usando RFLP, AFLP, SSR (Secuencias de Repetición Simple) y RAPD encontrando diferencias importantes en el polimorfismo detectado con las cuatro técnicas, por lo cual se requiere un estudio cuidadoso en la elección de la tecnología apropiada para diferentes aspectos de la evaluación de germoplasma. Chan y Sun (1997) encuentran uniformidad genética entre 23 especies cultivadas y silvestres de *Amaranthus*; sin embargo, hubo altos niveles de diversidad inter-accesional, estos resultados apoyan la teoría del origen monofilético del amaranto. Myburg *et al.* (1997) mediante RAPD para identificar y determinar distancias genéticas entre 10 cultivares de trigo, muestran congruencia con las relaciones genéticas conocidas y el pedigree de dichos cultivares; Montalvo (1998) al separar diferentes poblaciones de tomate encontró similitud entre los resultados morfológicos y los moleculares.

En general los estudios típicos involucran invariablemente el cálculo de Distancias Genéticas y la construcción de Dendogramas mediante Análisis de Agrupamiento, en ocasiones también se usa algún índice como el Porcentaje de Bandas Polimórficas o el de Jaccard. Lo anterior proporciona resultados adecuados cuando se trata de separar o identificar poblaciones y aporta ideas respecto a las diferencias genéticas poblacionales, pero no aporta un valor exacto que permita conocer la variabilidad genética de cada población.

Desafortunadamente existen escasas investigaciones respecto a la componente de la Variabilidad Genética Intrapoblacional (VGI) usando RAPD. El estudio de ésta es importante porque permite establecer la amplitud de la base

genética de las poblaciones, ya sean variedades, razas, etc., y usar este conocimiento para emprender estudios filogenéticos, mejoramiento genético, control de patógenos o búsqueda de fuentes de genes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y probar en diversas poblaciones un estimador de la VGI -cuyo nombre propuesto es Índice de Variabilidad Genética (IVG)- a partir de Fragmentos de ADN Amplificados al Azar.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

### Material vegetal

Se seleccionaron poblaciones contrastantes de cada una de las tres especies (Cuadro 1): dos poblaciones de maíz (*Zea mays*) compuestas de 29 individuos cada una, cuatro de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) integradas de 10 individuos c/u y dos del hongo de la antracnosis del aguacate Hass (*Colletotrichum gloeosporioides*) procedentes de Michoacán formadas por 10 individuos c/u.

La población Ixtlahuaca es una variedad de polinización libre, por lo cual se espera que tenga una variabilidad genética amplia.

La población V-25 se ha sometido a selección masal, por lo cual se considera debe poseer variabilidad genética menor que la de Ixtlahuaca.

La población silvestre autofértil presenta reproducción autógama obligada, por lo cual se espera que tenga variabilidad genética relativamente baja.

La población Salamanca es autoincompatible, por ello se estima que debe mostrar variabilidad más baja que la silvestre autofértil.

**Cuadro 1. Poblaciones e iniciadores usados para obtener fragmentos de ADN**

Especie	Población	Iniciador	Núm. ind.
Maíz*	Ixtlahuaca	D05, D09, D12, D14, D15, D19, M02, MO8, M18, M-19	29
	V-25	Los mismos	29
Tomate**	Silvestre Autofértil	OPAE19, OPB-06, OPD11, OPI09, OPV06	10
	Salamanca	Los mismos	10
	Rendidora	Los mismos	10
	Chapingo	Los mismos	10
<i>C. gloeosporioides</i>	Uruapan	OPL12, OPI16, OPM10, OPA16, OPD11	10
	Tacámbaro	Los mismos	10

\* Material proporcionado por Dr. Alejandro Espinoza INIFAP-CEVAMEX.

\*\* Material proporcionado por Dr. Aureliano Peña L., UACH-Fitotecnia.

La población Rendidora es una variedad mejorada en el INIFAP y a partir de ella se obtuvo la población Chapingo por selección, por lo que se cree que esa presión selectiva debe haber disminuido su variabilidad genética.

La región de Uruapan es el centro de realización de injertos y comercialización del aguacate Hass; se puede considerar como centro de origen regional y de llegada del germoplasma, tanto del aguacate como del hongo. Tacámbaro es una localidad relativamente lejana y aislada de Uruapan que envía a ésta (al igual que las otras regiones aguacateras) los frutos cosechados para su comercialización; en los que también se moviliza el hongo ya sea como esporas adheridas a éstos o en forma de infección. Por lo anterior se espera que la mayor variabilidad genética se encuentre en la población de Tacámbaro.

### Pretratamiento de las muestras

Los individuos de maíz fueron sembrados en parcelas experimentales en el Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo. El material para la extracción de ADN fue tejido foliar desprovisto de la nervadura central.

Los individuos de tomate se establecieron en condiciones de invernadero en la Universidad Autónoma de Chapingo. También se usó tejido foliar para la extracción del ADN.

Para los hongos se consideró como individuos experimentales aislamientos monoconidiales obtenidos de frutos de aguacate con síntomas de la enfermedad (Antracnosis, cuarteaduras y manchas). Las siembras y aislamientos se realizaron en el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Estos últimos se efectuaron en medio Papa Dextrosa Agar, y el micelio se incrementó en medio Papa Dextrosa líquido para extraer el ADN.

Las muestras se congelaron con Nitrógeno líquido, se liofilizaron y se molieron con un molino tipo Thomas.

### Extracción de ADN

Las diversas poblaciones se caracterizaron con iniciadores (secuencias de ADN de cadena sencilla) de 10 bases cada uno (Cuadros 1 y 2). La selección de los individuos fue totalmente al azar. Para la extracción de ADN de maíz se usó la técnica de Shagai-Marroof *et al.* (1984), para tomate la de Edwards *et al.* (1991), y para *C. gloeosporioides* la de Raeder y Broda modificada por Sreenivasaprasad *et al.* (1992); en los tres casos el material consistió en polvo liofilizado.

### Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación en 25 µl de reacción para las poblaciones de hongos

**Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores\* para todas las poblaciones**

Inic.	Secuencias	Inic.	Secuencias
A16	AGCCAGCGAA	I09	TGGAGAGCAG
AE19	GACAGTCCCT	I16	TCTCCGCCCT
B06	TGCTCTGCCC	L12	GGGCGGTACT
D05	TGAGCGGACA	M02	ACAACGCCTC
D09	CTCTGGAGAC	M08	TCTGTTCCCC
D11	AGCGCCATTG	M10	TCTGGCGCAC
D12	CACCGTATCC	M18	CACCATCCGT
D14	CTTCCCAAG	M19	CCTTCAGGCA
D15	CATCCGTGCT	V06	ACGCCAGGT
D19	CTGGGGACTT		

Inic. = Iniciadores

\* Todos los iniciadores son de Operon Technologies

fueron las siguientes: Taq polimerasa Fisher 1.5u, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, Iniciador 9µl, ADN blanco 100 ng, Amortiguador 10X 2.5µl, dNTP's 200 µM c/u, ddEH<sub>2</sub>O 8.2 µl. El programa de amplificación fue de 1 ciclo de 7 min a 94 °C, 45 ciclos compuestos de 1.5 min a 94 °C, 2 min a 30 °C y 3 min a 72 °C, y finalmente un ciclo de 7 min a 72 °C. La pendiente de temperatura fue de 48 °C/min; el termociclador usado fue Techne PHC-2.

Para tomate las condiciones fueron: Taq polimerasa 1u, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Iniciador 0.6µM, ADN blanco 100 ng, Amortiguador 10X 2.5µl, d NTP's 200 µM c/u, ddEH<sub>2</sub>O 10.8 µl. El programa de amplificación fue de 1 ciclo de 3 min a 94 °C, 3 ciclos compuestos como sigue: 1 min a 94 °C, 1 min 36 °C y 2 min 72 °C; 34 ciclos compuestos de: 10 seg a 94 °C, 20 seg a 40 °C y 2 min a 72 °C y finalmente un ciclo de 5 min a 72 °C. El termociclador usado fue Techne PHC-2.

Para maíz las condiciones fueron: Taq polimerasa 2u, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Iniciador 30 ng, ADN blanco 30 ng, Amortiguador 10X 2.5µl, d NTP's 100µM c/u, ddEH<sub>2</sub>O 9.1µl. El programa de amplificación fue de 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 34 ciclos compuestos como sigue: 1 min a 94 °C, 1 min 45 °C y 2 min 72 °C, y finalmente un ciclo de 5 min a 72 °C. El termociclador usado fue Ericomp Deltacycler II.

## Electroforesis

Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa al 1.4 % a 7 V/cm, revelados con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Su presencia o ausencia en los diferentes individuos se contabilizó mediante un código binario como 1 ó 0 respectivamente.

## Estimación de la variabilidad genética

El IVG propuesto se basa en la proporción de bandas presentes y ausentes sobre el número total de bandas definidas por cada iniciador para cada población, de la manera siguiente:

$$H_p = \sum_{h_p=1}^n h_p / p$$

$$h = \frac{2n \left\{ \left( \sum_{p=1}^n V_m / V_M \right) / B \right\}}{2n - 1}$$

Donde:

- $h_p$  = Índice de Variabilidad Genética de cada población por iniciador.
- $p$  = Número total de iniciadores.
- $n$  = Número total de individuos.
- $V_m$  = Cantidad menor de 0's o 1's en todos los individuos de una población definidos para una banda de ADN dada por cada iniciador  $p$ .
- $V_M$  = Cantidad mayor de 0's o 1's en todos los individuos de una población definidos para la misma banda que  $V_m$ .
- $B$  = Número total de bandas por iniciador. Adicionalmente se calculó el porcentaje de bandas polimórficas (% BP) con base en el total de iniciadores de cada población.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores del IVG y porcentaje de bandas polimórficas se muestran en el Cuadro 3. De manera general se observa que la especie

**Cuadro 3. Valores del índice de variabilidad genética y porcentaje de bandas polimórficas para las diferentes poblaciones**

Especie	Población	IVG*	%BP**
Maíz	Ixtlahuaca	0.3740	36.9
	V-25	0.2605	44.2
Tomate	Silvestre Autofértil	0.2896	41.7
	Salamanca	0.3896	65.0
	Rendidora	0.3884	64.1
	Chapingo	0.3161	78.6
<i>C. gloeosporioides</i>	Uruapan	0.4381	70.8
	Tacámbaro	0.4091	74.1

\* Índice de variabilidad genética.

\*\* Porcentaje de Bandas Polimórficas.

con mayor variabilidad genética es *C. gloeosporioides*, que a pesar de tener un genoma menor que las otras especies posee un ciclo corto de vida y reproducción de tipo asexual y sexual, lo cual le confiere una tasa alta de mutación y recombinación por cruzamiento.

La población de Uruapan tiene un mayor valor de IVG, esto probablemente se deba a que allí se localiza la mayoría de los viveros para la producción y distribución de injertos del aguacate Hass, además de que existe un amplio tráfico del producto desde el resto de los municipios aguacateros ya que este es el principal punto de comercialización. El valor del IVG para la población Ixtlahuaca -que es un criollo- resultó similar a las poblaciones de tomate que son autoincompatibles, es obvio que en todas ellas la frecuencia de cruzamientos es muy alta. En cambio el IVG para la población V-25 de maíz -que es una variedad de polinización libre sometida a procesos de selección- y para el silvestre autofértil de tomate -cuya tasa de cruzamiento es baja- presentó valores menores y no lejanos entre sí. El IVG de la población Rendidora fue mayor que la de Chapingo, lo cual se explica porque ésta es la única que se sometió a mejoramiento y deriva de aquella.

Los resultados del IVG no concuerdan con el % BP pues este estimador no muestra ningún patrón reconocible; se observa que el mayor % BP se encuentra en la población de tomate Chapingo en lugar de hacerlo con las poblaciones de hongos. El valor menor se presentó

en la población Ixtlahuaca de maíz cuando el menor IVG ocurrió en la población V-25. Esto demuestra que el % BP es un estimador grueso e inexacto para estudiar la variabilidad genética intrapoblacional.

Los resultados anteriores basados en el IVG concuerdan con el modelo esperado de acuerdo con las características de las poblaciones estudiadas, lo que establece la utilidad del Índice de Variabilidad Genética propuesto, en contraste con el % BP.

## CONCLUSIONES

El Índice de Variabilidad Genética propuesto presenta un comportamiento acorde a lo esperado de acuerdo con las poblaciones estudiadas en contraste con el Porcentaje de Bandas polimórficas que demostró ser un estimador inexacto. Por eso se considera recomendable el uso de éste en estudios que involucren la medición del tamaño de la variabilidad genética intrapoblacional.

El valor del IVG refleja la composición genética de las poblaciones estudiadas según sus características de reproducción y selección.

Los fragmentos amplificados al azar con iniciadores decámeros son una herramienta apropiada para estudios de determinación de estructuras poblacionales, y su uso combinado con el IVG proporciona estimaciones adecuadas de la amplitud de la base genética de las poblaciones de diversas especies.

## LITERATURA CITADA

- Achenbach, L.A., Patrick, J.A. and Gray, L.E. (1997). Genetic homogeneity among isolates of *Fusarium solani* that cause soybean sudden death syndrome. *Theor. Appl. Genet.* 95:474-478.
- Altomare, C., Petrini, O., Logrieco, A. and Bottalico, A. (1997) Taxonomic relationships among the toxigenic species *Fusarium acuminatum*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium tricinctum* by isosyme analysis and RAPD assay. *Can. J. Bot.* 75:1674-1684.

- Chan, K.F., and Sun, M. (1997). Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* 95:865-873.
- Edwards, K. C., Johnstone, M. and Thompson, C. (1991). *Nuc. Acids. Res.* 9(6):1349.
- Finkeldey, R. 1994. *Theor. Appl Genet* (1994)89:198-200.
- Montalvo, H.L. (1998). Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot). Tesis de Maestría. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Myburg, A.A., Botha, A.M., Wingfield, B.D. y Wilding, W.J.M. (1997). Identification and genetic distance analysis of wheat cultivars using RAPD fingerprinting. *Cereal Res. Com.* Vol 25 No. 4.
- Otoya, S.M.M., Restrepo, S. y Pastor, C.M. (1995). Amplificación al azar del ADN polimórfico para evaluar la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* en Colombia. *Fitopatología Colombiana/Vol 19 No.1.*
- Russel, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, W. y Waugh, R. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722.
- Saghai-Maroo, M. A., K. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. (1984). *PNAS* 81:8014-8018.
- Sreenivasaprasad, S., Averil, E. B. And Mills, P. R. (1992). DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiol. and Mol. Plant. Pathol.* 41:265-281.
- Udupa, S.M., Weigand, F., Saxena, M.C. y Kahl, G. (1998) Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolve pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 97:299-307.
- Williams, G.K., Kulbek, A.R., Rafalski, J.A., y Tingney, V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.