

HUELLA GENÉTICA DE GENOTIPOS SILVESTRES Y COMERCIALES DE *Passiflora* spp. UTILIZANDO PATRONES RAPD

Iris Pérez-Almeida¹, Sundry Vásquez García¹, Delis Pérez¹, Oscar De La Rosa¹ y Efraín Salazar¹

RESUMEN

Una colección importante de especies cultivadas y silvestres de *Passiflora* se encuentra en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP, en Maracay, Venezuela, y de las cuales es necesario conocer la identidad genética para evitar duplicaciones. Se utilizaron 60 iniciadores de la serie Operon para determinar la huella genética de 17 genotipos e identificar patrones de bandas para cada uno de ellos. Las bandas exhibidas por cada genotipo se numeraron en forma ascendente y secuencial creando así un patrón genético característico para cada genotipo en relación con cada iniciador utilizado así como la tipificación del iniciador en relación a cada genotipo estudiado. El análisis genético determinó que los RAPD permitieron generar para cada genotipo estudiado un conjunto de patrones de bandas que le son característicos y que se convierte en su huella genética. Se establecieron 19 iniciadores con un alto potencial discriminatorio, los cuales deberían ser la base de futuros estudios de diversidad genética en *Passiflora*. Estos iniciadores permitieron observar diferentes posiciones de banda similares entre los individuos sugiriendo la presencia de varios alelos para esas características. Los patrones RAPD permitieron separar los materiales cultivados de las especies silvestres, encontrándose además un alto grado de variabilidad entre los materiales cultivados.

Palabras clave adicionales: Banco de germoplasma, maracuyá, marcadores moleculares

ABSTRACT

Genetic fingerprint of wild and commercial genotypes of *Passiflora* spp. by using RAPD patterns

An important collection of cultivated and wild species of *Passiflora* is maintained at the Germplasm Bank of INIA-CENIAP in Maracay, Venezuela, and it is essential to know the genetic identity of such materials in order to avoid duplicates. Sixty primers from the Operon series were used to determine the genetic fingerprint of 17 genotypes and identify patterns of bands for each genotype. Displayed bands by each genotype were numbered in ascending and sequential order thus creating a distinctive genetic pattern for each genotype in relation to each primer used, as well as the primer characterization in relation to each genotype studied. The genetic analysis established that RAPDs allowed generating a set of specific band patterns characteristic for each genotype that becomes their genetic fingerprint. Nineteen primers with a high discriminatory potential were chosen and should be the base of further genetic studies of *Passiflora* genetic diversity. These primers permitted observing different positions of similar bands among the individuals suggesting the existence of several alleles for these characteristics. RAPD patterns allowed separating cultivated materials from wild types, finding a high degree of variability among the cultivated materials.

Additional key words: Germplasm bank, passion fruit, molecular markers

INTRODUCCIÓN

El género *Passiflora* (Passifloraceae) tiene una gran diversidad de especies, distribuidas en distintas zonas agroecológicas de las regiones tropicales. En Venezuela tiene representación en gran parte del territorio nacional, lo cual resalta la importancia florística del género (Delascio-Chitty, 2006; Mazzani et al., 1999; Pérez et al., 2001). De la misma manera, la importancia económica del género se acentúa con los distintos usos comerciales de algunas de las especies,

principalmente *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *P. cuadrangularis* y *P. mollisima* (Mazzani et al., 1999; Pérez et al., 2001).

Las expediciones realizadas en Venezuela han permitido coleccionar un amplio número de muestras de *Passiflora* reuniendo un número importante de materiales de este género, tanto cultivados como silvestres (Mazzani et al., 1999; Pérez et al., 2001). Estas accesiones se encuentran en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP, en Maracay estado Aragua. Los materiales coleccionados han sido objeto de caracterizaciones morfológicas,

Recibido: Julio 1, 2008

Aceptado: Agosto 18, 2009

¹ Unidad de Biotecnología Agrícola, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apdo. 4653. Maracay. Venezuela. email: iperez@inia.gob.ve; dperez@inia.gob.ve

fisiológicas y agronómicas. Sin embargo, para evitar duplicaciones en las colecciones, se hace imprescindible conocer con mayor precisión la identidad genética de las accesiones. En estos casos, el uso de técnicas moleculares basadas en el estudio directo del material genético permite el establecimiento de la huella genética a través de marcadores basados en la secuencia del ADN, estableciendo patrones específicos del individuo o planta bajo estudio (Henry, 1997). Una de las ventajas de usar las técnicas basadas en el ADN, es que la huella genética es independiente del efecto del ambiente y se mantiene constante en diversos tejidos y etapas de desarrollo del organismo. La semejanza entre huellas genéticas depende de la proximidad genética de los materiales probados (Jiménez, 1996).

Las huellas genéticas de plantas se han establecido mediante el uso de varias técnicas moleculares, entre las cuales destacan los patrones de bandas de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Fernández, 2004). Estos marcadores han ido creciendo en su utilidad en los últimos años por su alto nivel de resolución, facilidad de implementación y su confiabilidad (Hong, 2007).

Diversos autores han utilizado exitosamente la técnica RAPD para el estudio de *P. edulis* f. *flavicarpa* (Otoni et al., 1995; Carneiro et al., 2002; Viana et al., 2003) o de otros materiales de *Passiflora* (Fajardo et al., 1998; Crochemore et al., 2003). Asimismo, para este género se tiene la ventaja de contar con metodologías eficientes para la extracción de ADN de calidad para realizar análisis basados en PCR (Molinari y Crochemore, 2001).

En virtud de las experiencias en la caracterización molecular de *Passiflora*, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar los mejores iniciadores e identificar mediante patrones de bandas RAPD los materiales de la colección de *Passiflora* del INIA-CENIAP, a fin de complementar la evaluación de la identidad genética de las plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 genotipos de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* cultivada y cinco genotipos de *Passiflora* silvestres (Cuadro 1), colectados en diversas regiones de Venezuela y conservados *ex*

situ en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP.

Para el aislamiento de ADN se tomaron 0,2 g de tejido foliar y se maceraron con nitrógeno líquido. Para la extracción de ADN genómico se utilizó el método de CIAT (1999) modificado. Para la amplificación al azar de los ADN, se tomaron 15 µL por reacción de amplificación RAPD conteniendo 10 ng ADN, 1,5 µL solución tampón, 1,33 mM MgCl₂, 0,22 mM de cada dNTP, 0,3 µM del iniciador, 1U Taq ADN polimerasa y 0,33 mM BSA. El proceso de amplificación se realizó en un termociclador PTC 100 MJ Research utilizando un programa con un paso inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 45 ciclos a 93 °C por 30 s, 36 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, más una extensión final a 72 °C por 7 min. Se utilizaron sesenta (60) iniciadores de anclaje al azar de las series OPA (01 al 20), OPB (01 al 10), OPF (01 al 20) y OPM (01 al 10) de Operon Technologies.

Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 1,5 % durante 1,5 h a 90 mA y 85 V, colocando como marcador de peso molecular ADN del plásmido pBR322 digerido con Bst 01. Los fragmentos RAPD fueron teñidos con bromuro de etidio al 0,0002 %, y visualizados en un digitalizador de imágenes Biorad Chemidoc, utilizando el programa Quantity One 4.2.

La identidad genética de los ADN obtenidos se basó en el conjunto de patrones de bandas RAPD amplificadas para cada uno de los genotipos con los 60 iniciadores estudiados. Cada patrón se comparó con el de todos los genotipos evaluados por iniciador, determinando así las diferencias y similitudes. Los patrones de bandas diferentes fueron numerados en secuencia ascendente, identificándose patrones iguales con el mismo número. Se evaluó el número de patrones diferentes obtenidos con cada iniciador, lo cual evidenció el nivel de polimorfismo visualizado y, por ende, la capacidad discriminatoria de genotipos por cada secuencia utilizada.

Con los datos obtenidos a través del procesamiento de imágenes de los geles de agarosa se construyó una matriz binaria que incluyó la presencia o ausencia de fragmentos amplificados en el gel. La distancia genética entre los materiales fue calculada usando el programa Poptree 1.31 (Yeh et al., 1999). Este programa establece matrices estandarizadas para la

distancia genética (Nei, 1972) y matrices de distancia genética corregida para muestras pequeñas (Nei, 1978). Todos los agrupamientos se realizaron usando el método UPGMA y el agrupamiento resultante fue expresado como un

dendrograma. Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales usando el programa Infostat Profesional 1.1 para visualizar la distribución espacial de los 17 materiales como ejemplo de la diversidad genética encontrada.

Cuadro 1. Materiales genéticos cultivados de *Passiflora edulis* f *flavicarpa* y silvestres del género *Passiflora*, y concentración de ADN genómico aislado

Genotipo	Nº BG	Nombre científico	Nombre común	Procedencia	Concentración (ng·µL ⁻¹)
P1	138	<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	Parchita maracuyá	Est. Exp. Montalbán, UCV. Bejuma, Edo. Carabobo	147,05
P2	140			Est. Exp. Montalbán, UCV. Bejuma, Edo. Carabobo	251,65
P3	142			Est. Exp. Montalbán, UCV. Bejuma, Edo. Carabobo	680,50
P4	146			Moralito, Santa Bárbara, Edo. Zulia	496,90
P5	148			Tucani, Sur del Lago, Edo. Zulia	108,15
P6	152			Semilla comercial. Agroisleña, Cagua, Edo. Aragua	751,50
P7	165			La Pereza, Edo. Mérida	910,50
P8	167			Sur del Lago, Edo. Zulia	680,50
P9	170			Colectada en el Sistema de Riego Carambú, Edo. Trujillo	752,00
P10	171			Donada. INIA-Monagas. Colectada en Aragua de Maturín	553,00
P11	172			Donada. INIA-Monagas. Colectada en Caicara	869,50
P12	174			Donada. INIA-Monagas. Colectada en Caripe	501,00
P13	122	<i>P. foetida</i>	Parcha hedionda	Tucacas, Edo. Falcón	1212,00
P14	176	<i>P. maliformis</i>	Granadilla de piedra	Sector La Trilla, Sta. Rosa del Sur, Edo. Carabobo.	800,50
P15	180	<i>P. subpeltata</i>	Granada cimarrona	Monte Carmelo, Edo. Lara	423,65
P16	181	<i>P. cincinnata</i>	Parchita andina	Colectada en la vía Barquisimeto-Duaca, Edo. Lara	1828,00
P17	182	<i>P. giberti</i>	Burucuyá	Donada. UCLA, Edo. Lara	628,00

Genotipo: Código asignado en este trabajo; Nº BG: Nº de accesión en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del aislamiento de ADN se presentan en el Cuadro 1. El protocolo de extracción utilizado se considera que fue efectivo en el caso de muestras foliares de *Passiflora*, cuyas especies presentan altos contenidos de fenoles, taninos y otras sustancias en las hojas que dificultan la extracción. Las concentraciones

obtenidas fueron muy superiores a las requeridas para realizar la amplificación al azar de los ADN (10 ng·µL⁻¹).

En líneas generales se observó un mayor rendimiento de ADN en los materiales silvestres (980 ng·L⁻¹ en promedio) que en los materiales cultivados (550 ng·µL⁻¹ en promedio).

El ADN se separó electroforéticamente como una banda discreta, al mismo nivel que la banda

correspondiente al ADN usado como patrón de concentración, lo cual indicó que las moléculas aisladas estaban intactas.

Con relación al polimorfismo mostrado por los 60 iniciadores para cada uno de los genotipos estudiados se obtuvo que 17 iniciadores presentaron un polimorfismo bajo (6-9 patrones de bandas), 24 iniciadores un polimorfismo intermedio (10-14) y un grupo de 19 iniciadores mostraron alto polimorfismo (15-17) considerados estos últimos como los de mayor potencial discriminante (Cuadro 2). Se destacaron los marcadores OPA02, OPA04 y OPA17, los cuales mostraron capacidad para discriminar claramente los 17 genotipos.

Los iniciadores OPF1 y OPF14 no mostraron alto polimorfismo, lo cual contradice lo señalado por Bellon et al. (2007) quienes los reportaron como altamente polimórficos en *Passiflora*. Estas

diferencias en la capacidad para detectar polimorfismo en este género hacen suponer que los diferentes genotipos juegan un papel importante en la efectividad discriminatoria de estos iniciadores.

Los patrones RAPD obtenidos permitieron establecer una huella genética para cada material estudiado. Se observó una alta variabilidad entre los genotipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* (Figuras 1 y 2). Esta variabilidad podría explicarse por la naturaleza alógama de las *Passiflora*. Sin embargo a pesar de la variabilidad observada, los genotipos de *P. edulis* f. *flavicarpa* conformaron un grupo separado de las especies silvestres estudiadas. Las distancias genéticas obtenidas para los genotipos de la forma *flavicarpa* son comparables a las observadas entre las especies silvestres, corroborando la alta variabilidad genética en *P. edulis* (Figura 1).

Cuadro 2. Patrones de bandas generados por cada iniciador con relación a los 17 genotipos de *Passiflora* estudiados

N°	Iniciador	Patrones de bandas generados	N°	Iniciador	Patrones de bandas generados	N°	Iniciador	Patrones de bandas generados	Genotipos no discriminados
1	OPA 06	6	21	OPA 14	10	41	OPM 07	14	
2	OPA 15	6	22	OPA 20	10	42	OPA 03	15	P5-P6; P9-P10
3	OPF 01	6	23	OPF 03	10	43	OPF 10	15	P1-P2-P3, P8-P9
4	OPF 05	7	24	OPF 14	10	44	OPA 05	15	P5-P6; P10-P11
5	OPF 06	7	25	OPM 05	10	45	OPA 09	15	P2-P4, P8-P9
6	OPF 13	7	26	OPB 03	11	46	OPA 11	15	P11-P12, P4-P15
7	OPB 06	8	27	OPF 02	11	47	OPA 19	15	P5-P7, P8-P13
8	OPA 12	8	28	OPF 20	11	48	OPB 08	15	P3-P4; P7-P8
9	OPM 08	8	29	OPA 10	12	49	OPB 09	15	P12-P14, P15-P16
10	OPF 07	9	30	OPA 13	12	50	OPM 03	15	P5-P6; P9-P10
11	OPF 09	9	31	OPA 16	12	51	OPM 10	15	P3-P4, P8-P9
12	OPF 04	9	32	OPF 08	12	52	OPA 18	16	P11-P12
13	OPF 18	9	33	OPF 16	12	53	OPB 02	16	P7-P8
14	OPF 19	9	34	OPF 17	12	54	OPB 05	16	P1-P3
15	OPM 01	9	35	OPM 04	12	55	OPB 07	16	P7-P9
16	OPM 02	9	36	OPB 01	13	56	OPB 10	16	P14-P15
17	OPM 09	9	37	OPF 15	13	57	OPF 12	16	P7-P8
18	OPA 01	10	38	OPB 04	14	58	OPA 02	17	-
19	OPA 07	10	39	OPF 11	14	59	OPA 04	17	-
20	OPA 08	10	40	OPM 06	14	60	OPA 17	17	-

Es importante destacar que los 19 iniciadores altamente polimórficos pueden ser la base de los futuros estudios de caracterización en genotipos del género *Passiflora*, ya que permitieron identificar los genotipos del género. Asimismo,

permitieron observar diferentes posiciones de bandas similares entre los individuos sugiriendo la presencia de varios alelos para esas características. Esto reduciría significativamente los esfuerzos de caracterización molecular. Sin embargo a fin de

afinar los detalles de la clasificación taxonómica, se hace necesario ampliar el estudio molecular de los genotipos con más marcadores RAPD e integrar otro tipo de marcadores.

En la Figura 2 se observa que las especies silvestres se orientan más hacia el eje con el componente principal 1, mostrando una correlación ligeramente positiva con éste. En el

caso de las especies cultivadas se orientan más hacia el lado negativo del componente 1 y se distribuyen más ampliamente en relación al componente 2. El material 13 correspondiente a un genotipo de *P. foetida* es el que más cercano se encuentra a los materiales cultivados de *P. edulis* f. *flavicarpa*, dentro de los cuales se evidencia una mayor variabilidad genética.

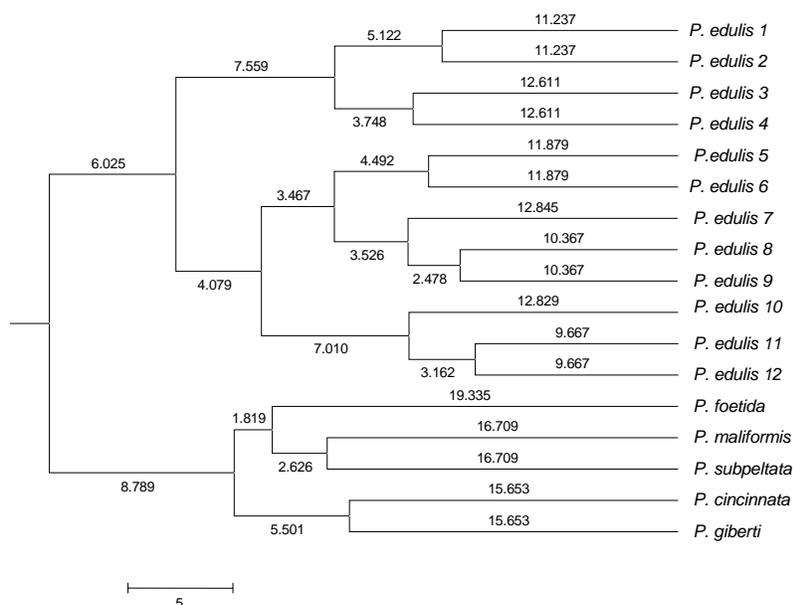


Figura 1. Dendrograma basado en el método de agrupamiento UPGMA con las distancias de Nei (1978) en 17 materiales de *Passiflora*

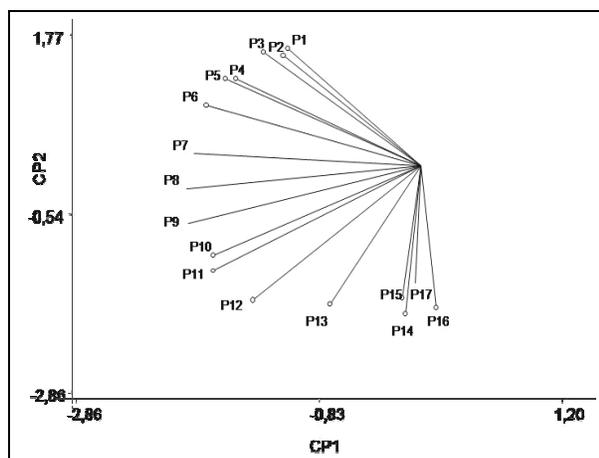


Figura 2. Diagrama de componentes principales de 17 genotipos de *Passiflora*

CONCLUSIONES

Se generó para cada genotipo de *Passiflora* estudiado un conjunto de patrones de bandas que

le son característicos y que se convierte en su huella genética.

Los patrones RAPD permitieron separar las especies silvestres de los materiales cultivados, encontrándose además, entre estos últimos, un alto grado de variabilidad.

Se establecieron 19 iniciadores con un alto potencial discriminatorio, los cuales deberían ser la base de futuros estudios de diversidad genética de este género.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, por el financiamiento ID-ARA-05-01003.

LITERATURA CITADA

- Bellon, G., F.G. Faleiro, K.P. Junqueira, N.T. V. Junqueira, E.C. Dos Santos, M.F. Braga y

- C.T. Guimarães. 2007 Genetic variability of wild and commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) accessions using RAPD markers. Rev. Bras. Frutic. 29: 124-127.
2. Carneiro, M.S., L.E. A. Camargo, A.S.G. Coelho, R. Vencovsky, Júnior R.P.L., N.M.C. Stenzel y M.L.C. Vieira. 2002. RAPD-based genetic linkage maps of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). Genome 45: 670-678.
3. CIAT. 1999. Taller integración de fitopatología, mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia al añublo del arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Octubre 14-18, Cali, Colombia.
4. Crochemore, M., H.B. Correa y L.G. Esteves. 2003. Genetic diversity in Passion Fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD Markers. Brazilian Archives of Biology and Technology 46: 521-527.
5. Delascio-Chitty, F. 2006. El género *Passiflora* L. en el Hato Piñero, Estado Cojedes, Venezuela. Acta Bot. Venez. 29: 27-38.
6. Fajardo, D., F. Angel, M. Grum, J. Tohme, M. Lobo, W. M. Roca e I. Sánchez. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. Euphytica 101: 341-347.
7. Fernández, H. 2004. Uso de marcadores moleculares en la caracterización de bancos de germoplasma. Ceniap Hoy N° 5. http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniap_hoy/articulos/n5/. Consulta del 05/05/2008.
8. Henry, R. 1997. Practical applications of plant molecular biology. Chapman & Hall. London.
9. Hong, J. 2007. DNA fingerprinting from botanicals. Vol. 6 N° 2. <http://www.Innovationmagazine.com/innovation/> (consulta 18/08/09).
10. Jiménez, A. 1996. Ingeniería genética. Aplicaciones e implicaciones. Puertas a la lectura. Universidad de Extremadura. Badajoz. España 2: 37-41.
11. Mazzani, E., D. Pérez y W. Pacheco. 1999. Distribución y uso de especies del género *Passiflora* (Passifloraceae) en las zonas altas de los estados Lara y Falcón, Venezuela. Plant Genetic Resources Newsletter 119: 24-32.
12. Molinari, H.B. y M.L. Crochemore. 2001. Genomic DNA extraction from *Passiflora* spp. for PCR-RAPD analyses. Rev. Bras. Frutic. 23: 447-450.
13. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 238-292.
14. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
15. Otoni, W. C., N. W. Blackhall, F. B. d'Utra Vaz, V.W. Casali, J.B. Power y M.R. Davey. 1995. Somatic hybridization of the *Passiflora* species, *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. incarnata* L. J. Exp. Bot. 46: 777-785.
16. Pérez, D., E. Mazzani y W. Pacheco. 2001. Colecta de Passifloras silvestres y cultivadas en zonas altas de los estados Aragua y Miranda. Región centro-norte de Venezuela. Plant Genetic Resources Newsletter 125: 11-15.
17. Viana, A.P., T.N Santana, M. Gonzaga, M. Magalhães de Souza, J.F. Martinez y A. Teixeira. 2003. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. Rev. Bras. Frutic. 25: 489-493.
18. Yeh, F., R. Yang y T. Boyle. 1999. Popgene: Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis Version 1.32, University of Alberta. Edmonton. 29 p.