

Variabilidad genética de una población segregante de mora mexicana (*Morus celtidifolia* Kunth) determinada por marcadores ISSR

Genetic variability of a segregating population of Mexican mulberry (*Morus celtidifolia* Kunth) Determined by ISSR markers

Diana Escobedo-López¹, Carlos A. Núñez-Colín^{2*}

RESUMEN

Actualmente, algunas especies del género *Morus* han empezado a generar interés como frutal. En este sentido, la mora mexicana (*Morus celtidifolia* Kunth) puede ser un frutal potencial para las zonas donde se distribuye de manera natural: 18 de los 32 estados del país. Sin embargo, para considerar a la mora mexicana un frutal, es necesario conocer su diversidad y su genética, de manera que sea posible plantear un programa de mejoramiento genético. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la variabilidad genética de una población segregante de mora mexicana mediante marcadores ISSR. Se encontró que la mayoría de marcadores ISSR presentaron elevados niveles de polimorfismo, cinco de ellos altamente informativos por sus valores de contenido de información polimórfica (PIC). Además, en el análisis de coordenadas principales, los individuos presentaron una amplia dispersión, pues están segmentados en al menos tres grupos de variabilidad, lo que refiere alta variabilidad genética. Por lo anterior, un programa de mejoramiento genético para mora mexicana puede estar basado en selección masal recurrente.

PALABRAS CLAVE

patrones de segregación; Moraceae; frutales subutilizados; recursos fitogenéticos mexicanos

ABSTRACT

Nowadays, some species of the genus *Morus* have begun to generate interest as fruit crops; in this sense, the Mexican mulberry (*Morus celtidifolia* Kunth) could be a potential fruit crop in regions where it distributed as wild plants in 18 of 32 states of the country. However, to considerate the Mexican mulberry like fruit crop is necessary to know its diversity and genetics to pose a breeding program. We evaluated the genetic variability of a segregating population of Mexican mulberry by mean ISSR markers. It was found that mostly of the ISSR showed high level of polymorphism, five of them highly informative by its polymorphic information content (PIC) values. Moreover, in the principal coordinates analysis, the individuals showed a widely dispersion, they are segmented at least three groups of genetic variability. Because of that, a breeding program for Mexican mulberry could be based on recurrent massal selection.

KEYWORDS

segregation patterns; Moraceae; underutilized fruits; mexican plant genetic resources

¹ Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

² Programa de Ingeniería en Biotecnología, Universidad de Guanajuato.

* Autor para correspondencia. Mutualismo 303, col. La Suiza, apartado postal 91. 38060 Celaya, Guanajuato, México.
Correo electrónico: lit007a@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El género *Morus* está constituido por diferentes especies perennes de árboles de rápido crecimiento y es económicamente importante en los países donde se cultiva el gusano de seda (*Bombyx mori* L.); sin embargo, sólo algunas especies (*M. alba* L., *M. nigra* L., *M. rubra* L., *M. indica* L. y *M. laevigata* Wall.) han generado interés como frutal (Awasthi *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007; Kafkas *et al.*, 2008; Kalpana *et al.*, 2012). La mayoría de las especies que son utilizadas para el consumo de fruta son originarias de Asia. Sin embargo, en el continente americano se tiene reporte de tres especies de este género: *M. rubra* L., *M. microphylla* Buckl. y *M. celtidifolia* Kunth, esta última presente en México (Nepal y Ferguson, 2012).

La mora mexicana (*Morus celtidifolia* Kunth) se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Honduras y El Salvador. En México se distribuye en Sonora, Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Estado de México, D. F., Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Carbajal, 2007). Es un árbol de 5 a 9 m de alto, con hojas pecioladas, ovadas de 5 a 15 cm de largo y 3 a 9 cm de ancho, más anchas en la mitad inferior, cuspidado-acuminadas, margen serrado-mucronado y base redondeada a cordada, con tres nervaduras principales que surgen desde la base. Presenta inflorescencias con múltiples flores diminutas, unisexuales y verdosas. El fruto es un sincarpo compuesto de numerosas drupas pequeñas y jugosas, de color rojizo cuando es joven y morado oscuro a negro al madurar (Carbajal, 2007).

El hábitat de la mora es el de selva baja caducifolia en altitudes de 1,800 a 2,400 msnm. Se adapta bien en laderas con pendientes moderadas y lugares secos. Los suelos pueden ser neutros o alcalinos, someros, arenosos, pedregosos, o bien drenados y húmedos. Toleran sequías pero su follaje es susceptible a heladas, aunque tiene gran potencial de rebrote al inicio de la primavera. La mora tiene varios usos, entre los que destacan el uso de su madera para construcciones rurales y el empleo de sus ramas como leña para combustible. Sus frutos son comestibles y se le atribuyen propiedades medicinales. Aunado a lo anterior, la industria lo demanda para producir un colorante amarillo. Asimismo, en su etapa de floración, genera buena cantidad de néctar para producción de miel (Terrones *et al.*, 2004).

En el Campo Experimental Bajío del INIFAP, se cuenta con un arboretum con más de 100 especies nativas de Guanajuato. En esta colección se tienen dos

parcelas con mora mexicana, colectadas originalmente en el municipio de Guanajuato y que tienen 10 años de establecidas. Este periodo ha servido para registrar la fenología y características del árbol. Sin embargo, esta especie está poco estudiada y sólo existe información taxonómica (Nepal y Ferguson, 2012); se carece de estudios sobre su potencial productivo, de adaptación, de diversidad, entre otros.

Recientemente, la variabilidad genética de diferentes especies del género *Morus*, especialmente *M. indica*, ha sido evaluada mediante marcadores moleculares, principalmente marcadores ISSR, con buenos resultados (Vijayan y Chatterjee, 2003; Vijayan, 2004; Vijayan *et al.*, 2004; Awasthi *et al.*, 2004; Vijayan *et al.*, 2006; Venkateswarlu *et al.*, 2006). El presente trabajo trató de elucidar la variabilidad genética de una población segregante de plántulas provenientes de semilla de la parcela de mora mexicana en el arboretum de plantas nativas del Campo Experimental Bajío del INIFAP mediante marcadores ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una población de 40 plántulas de semilla de mora mexicana de aproximadamente seis meses de edad; la semilla de polinización natural fue colectada aleatoriamente de las parcelas de mora mexicana del arboretum de plantas nativas del Campo Experimental Bajío del INIFAP.

El ADN fue aislado de hojas jóvenes sin daños aparentes utilizando el protocolo de CTAB con STE (Doyle y Doyle, 1987). La concentración de ADN y su pureza fueron determinadas con un espectrofotómetro Nanodrop 8000 versión 2.1.0. Se probaron 18 iniciadores ISSR (cuadro 1), utilizados comúnmente en plantas. Para la amplificación por PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 10 µL de buffer 1x, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1 pMol de primer y 1 U Taq Polimerasa recombinante (Invitrogen®), donde se usó un volumen de 20 µL con aproximadamente 20 ng de ADN. El perfil de temperatura utilizado fue el siguiente: 94 °C por 5 min, 35x (94 °C por 60 s, 50 °C por 60 s, 72 °C por 60 s), 72 °C por 10 min.

Los productos de PCR fueron desnaturalizados con una solución de carga de formamida (98% formamida, 10 mM EDTA pH 8.0, ~40 mg azul de bromofenol) a 95 °C por 5 min, después fueron puestos en hielo. El gel de poliacrilamida a 8.5% fue hecho con 40 mL de solución de poliacrilamida (19:1, Urea 8 M), 200 µL de persulfato de amonio 25% y 40 µL de TEMED. De cada producto de PCR se tomaron 12 µL para cargar en el gel. La electroforesis fue hecha usando el buffer TBE

Cuadro 1. Lista de iniciadores ISSR utilizados en una población segregante de *Morus celtidifolia*.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA (5'-3')	REFERENCIA
Pv01	CACCACCACGC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv02	GTGGTGTGTGTGTGTGT	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv03	GAGAGAGAGAGACC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv04	CTCTCTCTCTCTCTCTCG	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv05	CCGCCGCCGCCG	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv06	GTGTGTGTGTGTCC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv07	CAGCAGCAGCAGCAG	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv08	GTGGTGGTGGC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv09	GAGGAGGAGGC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
Pv10	CCACTCTCTCTCTCTCTCT	Marotti <i>et al.</i> (2007)
ISSR7	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	Marotti <i>et al.</i> (2007)
ISSR16	ACACACACACACACAC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
ISSR19	GCCGCCGCCGCCGCC	Marotti <i>et al.</i> (2007)
IS03	AGACAGACAGACAGACGC	Luna-Páez <i>et al.</i> (2007)
UBC829	TGTGTGTGTGTGTGTGC	Vijayan (2004)
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	Vijayan (2004)
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	Vijayan (2004)
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	Vijayan (2004)

Nota: los iniciadores degenerados son mezclas de iniciadores PCR donde los símbolos en la respectiva fórmula representan: Y = C ó T.

1x en una cámara de electroforesis vertical a 250 volts por 90 min. Finalmente, los geles de poliacrilamida fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de ADN mediante luz UV.

Para evaluar la información generada por los ISSR se calculó el número total de bandas amplificadas por ISSR, número de bandas únicas, número de bandas raras (frecuencia $\leq 10\%$ de la población), número de bandas polimórficas, promedio de bandas por individuo, mínimo de bandas por individuo, máximo de bandas por individuo. Asimismo, se obtuvieron estos valores en sentido porcentual. Además, se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) de acuerdo con la fórmula propuesta por Roldán-Ruiz *et al.* (2000):

$$PIC_i = 2f_i (1 - f_i)$$

donde PIC es el contenido de información polimórfica del marcador i ; f_i la frecuencia de los fragmentos del marcador, que estaban presentes, y $1 - f_i$ la frecuencia de los fragmentos del marcador, que estaban ausentes. El PIC fue un promedio de los fragmentos para cada ISSR.

El PIC toma valores entre 0 y 0.5 para datos dominantes, como los ISSR; se considera que valores menores a 0.15 no son informativos; valores entre 0.15 y 0.25 son informativos, y valores mayores a 0.25 son altamente informativos (Laurentin y Karlovsky, 2007).

Para evaluar la diversidad genética existente en la población se utilizó un análisis de coordenadas principales usando el coeficiente de similitud de Dice (Nei y Li, 1979), donde se graficó tridimensionalmente a la población de individuos para observar la dispersión: cuanto más dispersos se encuentren los puntos, mayor es la diversidad presente en la población.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 18 ISSR evaluados, 17 fueron polimórficos y uno fue monomórfico; no obstante, todos ellos presentaron buena respuesta y cada perfil electroforético reveló entre 4 y 16 bandas por individuo (cuadro 2). El iniciador UBC835 fue monomórfico y presentó nueve bandas por individuo. El polimorfismo de los 17 ISSR varió entre 10.00 y 90.91% y se presentaron valores de PIC entre 0.0139 y 0.3088 (cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de polimorfismo y del índice del contenido de información polimórfica (PIC) de los 18 iniciadores ISSR aplicados a una población segregante de *Morus celtidifolia*.

INICIADOR ISSR	NÚM. BANDAS	NÚM. BANDAS ÚNICAS	BANDAS RARAS	BANDAS POLIMÓRFICAS	NÚM. PROMEDIO DE BANDAS POR INDIVIDUO	NÚM. MÍN. DE BANDAS POR INDIVIDUO	NÚM. MAX. DE BANDAS POR INDIVIDUO	PORCENTAJE DE POLIMORFISMO	PIC
Pv01	13	0	2	9	8.85	6	12	69.2308	0.2365
Pv02	16	0	0	11	13.55	10	16	68.7500	0.1694
Pv03	11	0	0	10	8.58	5	11	90.9091	0.2513
Pv04	12	0	0	10	9.98	5	12	83.3333	0.2228
Pv05	15	1	0	5	13.08	11	14	33.3333	<i>0.0856</i>
Pv06	13	0	0	11	10.03	2	13	84.6154	0.3088
Pv07	12	0	1	10	10.13	8	11	83.3333	<i>0.1405</i>
Pv08	17	0	0	13	11.78	7	14	76.4706	0.2552
Pv09	9	0	0	6	6.58	4	9	66.6667	0.2424
Pv10	14	0	0	11	11.13	7	14	78.5714	0.2674
ISSR7	10	0	1	8	7.88	6	9	80.0000	0.1576
ISSR16	11	0	0	9	8.73	6	11	81.8182	0.2865
ISSR19	11	0	0	2	10.45	9	11	<i>18.1818</i>	<i>0.0643</i>
IS03	14	0	0	9	12.18	7	14	64.2857	<i>0.1469</i>
UBC829	11	0	0	7	9.78	6	11	63.6364	0.1701
UBC830	10	0	0	1	9.93	9	10	<i>10.0000</i>	<i>0.0139</i>
UBC835	9	0	0	0	9.00	9	9	<i>0.0000</i>	<i>0.0000</i>
UBC841	11	0	0	5	10.05	8	11	45.4545	<i>0.1034</i>

Letras en negritas representan los valores máximos y en cursivas los valores mínimos.

El iniciador PV05 presentó una banda única, es decir, sólo un individuo presentó dicha banda; a su vez, los iniciadores que presentaron bandas raras (bandas presentes en menos de 10% de la población) fueron PV02 (2), PV07 (1) e ISSR7 (1) (cuadro 2). A pesar de presentar estas bandas únicas y raras, estos cuatro indicadores presentaron valores de PIC bajos, por lo que su diferenciación entre individuos es baja. Por su parte, los iniciadores PV03, PV06, PV08, PV10 e ISSR16 presentaron los valores de PIC más elevados, por lo que fueron los que mostraron mayor información polimórfica (cuadro 2).

Por otro lado, en el gráfico tridimensional (figura 1), obtenido a partir del análisis de coordenadas principales (ACooP), se observó que la dispersión de los individuos está segmentada: se pueden ver divididos en, al menos, tres grupos de variación. Esto refiere una amplia variabilidad genética. Al tener esta

segmentación, se presume que los padres también presentan una amplia variabilidad genética, lo que permite proponer un programa de selección como método de mejoramiento genético.

La mora mexicana fue reportada como vulnerable en el Valle de México por Rzedowski y Calderón de Rzedowski (1993) desde la década de los noventa, aunque es más o menos común en otras zonas de distribución natural. No obstante, este frutal puede perder, o ha perdido ya, diversidad genética debido a que no se le da un uso antropocéntrico.

Los resultados de los ISSR utilizados en mora mexicana en este trabajo concuerdan con los reportados en otros trabajos en el género *Morus*, como con Vijayan y Chatterjee (2003), Vijayan *et al.* (2006) y con Venkateswarlu *et al.* (2006), quienes encontraron alto polimorfismo en *M. indica* con marcadores ISSR, así como con Vijayan (2004), Vijayan *et al.* (2004) y

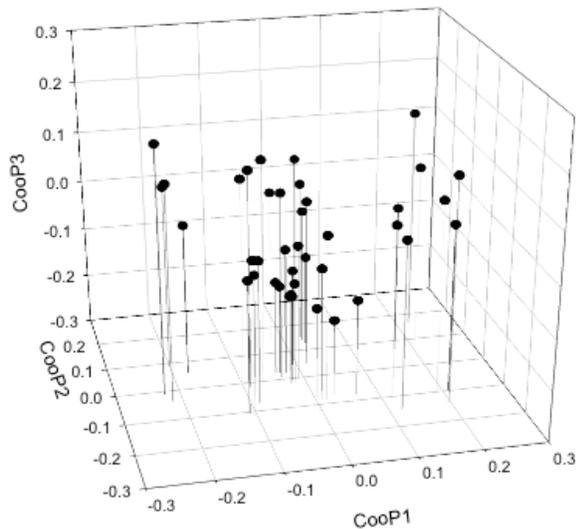


Figura 1. Representación tridimensional del análisis de coordenadas principales de 40 individuos segregantes de *Morus celtidifolia* con la huella genética de 18 ISSR.

Awasthi *et al.* (2004), quienes encontraron alto polimorfismo con ISSR en diferentes especies de *Morus*. Sin embargo, son superiores a los encontrados por Kalpana *et al.* (2012) en *M. alba*, quienes obtuvieron porcentajes de polimorfismo entre 40 y 80%, con 55% de polimorfismo en promedio, en comparación con 61% en este trabajo, considerando en el cálculo el ISSR monomórfico. No obstante, se trata de valores de polimorfismo muy parecidos a los encontrados en cultivares indios de moras por Vijayan y Chatterjee (2003), quienes también reportaron ISSR monomórficos. Esto hace concluir que ISSR es un buen marcador de ADN para evaluar la variabilidad genética en mora mexicana.

El polimorfismo encontrado en esta población segregante fue alto, lo que se traduce en un gran número de genotipos, ya que la ausencia de una banda ISSR se debe a mutaciones (inserción, delección o sustitución) en las zonas microsátélites que hacen que las bandas cambien de tamaño o no se expresen (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). El tener este alto número de genotipos normalmente se traduce en una alta variabilidad fenotípica, lo que permitiría hacer una selección masal recurrente, que es uno de los principales y clásicos métodos genotécnicos en frutales (Bringhurst, 1988). Así, a pesar de que se tenga baja frecuencia de esta especie en algunas

zonas de su distribución natural (Carbajal, 2007), la mora mexicana parece tener, por los resultados aquí encontrados, una alta capacidad de segregación al propagarla por semilla, lo que facilitaría empezar un programa de mejoramiento genético para este frutal.

CONCLUSIONES

En el análisis de coordenadas principales (ACooP), los individuos presentaron una amplia dispersión pues están segmentados en, al menos, tres grupos de variabilidad. Lo anterior refiere alta variabilidad genética en la población estudiada.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por el financiamiento mediante el proyecto para fortalecer la excelencia académica 2015.

LITERATURA CITADA

- Awasthi, A. K., G. M. Nagaraja, G. V. Naik, S. Kanginakudru, J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5:1.
- Bringham, R. S. 1988. Estrategia genotécnica. En: Moore, J. N., J. Janik (eds.). *Métodos Genotécnicos en Frutales*. AGT Editor, Ciudad de México, México. pp. 197-205.
- Carbajal, S. 2007. *Moraceae*. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes* 147: 1-57.
- Doyle, J. J., J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Kafkas, S., M. Özgen, Y. Doğan, B. Özcan, S. Ercişli, S. Serçe. 2008. Molecular Characterization of Mulberry Accessions in Turkey by AFLP Markers. *Journal of American Society for Horticultural Science* 133: 593-597.
- Kalpna, D., S. H. Choi, T. K. Choi, K. Senthil, Y. S. Lee. 2012. Assessment of genetic diversity among varieties of mulberry using RAPD and ISSR fingerprinting. *Scientia Horticulturae* 134: 79-87.
- Laurentin, H., P. Karlovsky. 2007. AFLP fingerprinting of sesame (*Sesamum indicum* L.) cultivars: identification, genetic relationship and comparison of AFLP informativeness parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1437-1446.
- Luna-Páez, A., E. Valadez-Moctezuma, A. F. Barrientos-Priego, C. Gallegos-Vázquez. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp. Mediante Semilla con Marcadores RAPD e ISSR y su posible uso para diferenciación. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 9: 43-59.
- Marotti, I., A. Bonetti, M. Minelli, P. Catizone, G. Dinelli. 2007. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 175-188.
- Nei, M., W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)* 76: 5269-5273.
- Nepal, M. P., C. J. Ferguson. 2012. Phylogenetics of *Morus* (Moraceae) Inferred from ITS and trnL-trnF Sequence Data. *Systematic Botany* 37: 442-450.
- Pradeep Reddy, M., N. Sarla, E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Roldán-Ruiz, I., J. Dendauw, E. Van Bockstaele, A. Depicker, M. De Loose. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecular Breeding* 6: 125-134.
- Rzedowski, J., G. Calderón de Rzedowski. 1993. Datos sobre la dinámica de la flora fanerogámica del Valle de México, con énfasis en especies nativas raras, en peligro de extinción y aparentemente extintas. *Acta Botánica Mexicana* 25: 81-108.
- Terrones, T. R. L., C. González, S. A. Ríos. 2004. Arbustivas nativas de uso múltiple en Guanajuato. Libro técnico No. 2. INIFAP. Celaya, México. 216 pp.
- Venkateswarlu, M., S. Raje Urs, B. Surendra Nath, H. E. Shashidhar, M. Maheswaran, T. M.
- Veeraiah, M. G. Sabitha. 2006. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy. *Tree Genetics and Genomes* 3: 15-24.
- Vijayan, K. 2004. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus* spp.) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy. *Plant Systematics and Evolution* 243: 221-232.
- Vijayan, K., S. N. Chatterjee. 2003. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. *Euphytica* 131: 53-63.
- Vijayan, K., P. K. Kar, A. Tikader, P. P. Srivastava, A. K. Awasthi, K. Thangavelu, B. Saratchandra. 2004. Molecular evaluation of genetic variability in wild populations of mulberry (*Morus serrata* Roxb.). *Plant Breeding* 123: 568-572.
- Vijayan, K., A. Tikader, P. K. Kar, P. P. Srivastava, A. K. Awasthi, K. Thangavelu, B. Saratchandra. 2006. Assessment of genetic relationships between wild and cultivated mulberry (*Morus*) species using PCR based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 873-882.
- Zhao, W., Z. Zhou, X. Miao, Y. Zhang, S. Wang, J. Huang, H. Xiang, Y. Pan, Y. Huang. 2007. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* Species (Moraceae: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. *Biodiversity and Conservation* 16: 275-290.