

DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE MANZANO EN QUERÉTARO, MÉXICO REVELADA POR MARCADORES RAPD

GENETIC DIVERSITY IN APPLE POPULATIONS FROM QUERÉTARO, MÉXICO REVEALED BY RAPD MARKERS

Azucena del Carmen González-Horta¹, Mario Rafael Fernández-Montes², Aroldo Rumayor-Flores³,
Eduardo Castaño Tostado¹ y Ramón Álvarez Martínez Peniche^{1*}

¹División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n, 76010. Querétaro, Querétaro. Tel. y Fax 01 (442) 192-1304. Correo electrónico: alvar@uaq.mx ²Campo Experimental Norte de Guanajuato, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km. 65 Carr. Querétaro-San Luis Potosí, San Luis de la Paz, Gto. ³Productor independiente. Turín 315 Ote. C.P. 25230 Saltillo, Coah. México. Tel. 01 (844) 415-4004.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

El manzano (*Malus domestica* Borkh.) es uno de los frutales de clima templado de mayor importancia en México, con 62 000 ha cultivadas en 2003, de las cuales alrededor de 700 se encuentran establecidas en el estado de Querétaro. La anarquía en la introducción de variedades cultivadas e híbridos por parte de los productores y las dependencias de gobierno, ha propiciado el desconocimiento de la identidad algunos de éstos, además, se ignora si los materiales introducidos se encuentran injertados sobre portainjertos clonales resistentes al pulgón lanígero (*Eriosoma lanigerum*), plaga importante en la región. Con el fin de evaluar la diversidad genética del manzano, se colectaron 65 muestras que incluyen variedades cultivadas, materiales criollos, híbridos y portainjertos de manzano y se analizaron por medio de marcadores moleculares tipo RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Se seleccionaron 10 oligonucleótidos para el análisis del ADN. Se amplificaron 113 bandas polimórficas y 29 monomórficas. El análisis de conglomerados mostró que la mayor disimilitud entre genotipos fue de 0.71. Las muestras se separaron en dos conglomerados. El primero incluye casi todas las muestras relacionadas con la variedad 'Golden Delicious', mientras que el segundo grupo incluye la mayoría de las muestras correspondientes a manzanas rojas y portainjertos clonales. Los resultados indican que la diversidad genética del manzano en la región es importante y que el método RAPD permite agrupar genotipos con características comunes, lo que facilitará la identificación genética de variedades.

Palabras claves: *Malus domestica* Borkh, RAPD, diversidad genética, análisis de conglomerados

SUMMARY

Apples (*Malus domestica* Borkh.) are the most important temperate fruit crop grown in Mexico, with 62 000 ha cultivated in 2003, and 700 of them are established in Querétaro. Lack of germplasm control by growers or government means that some varieties and hybrids, are unknown. Woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum*) has a considerable effect on apple production in Querétaro and it is unclear whether or not the material is grafted onto resistant rootstocks. In

order to evaluate the apple diversity in Querétaro, 65 samples of cultivars, landraces, hybrids and rootstocks were collected and analyzed using RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) markers. Ten primers were selected for the DNA analysis. One hundred and thirteen polymorphic and 29 common bands were amplified. Cluster analysis showed that the greatest distance observed in the dendrogram was 0.71. The samples were separated in two conglomerates, the first group included almost all of the genotypes related to 'Golden Delicious' variety while the second included most of the samples corresponding to red apples and clonal rootstocks. Results indicate that the genetic diversity in apple is important in the region and that the RAPD method allowed to group genotypes with common characteristics, which will facilitate the genetic identification of varieties.

Index words: *Malus domestica* Borkh, RAPD, genetic diversity, cluster analysis

INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es el frutal de clima templado de mayor importancia en México, del cual se cultivaron 62 000 ha en 2003 (FAO, 2004). En las zonas serranas del estado de Querétaro, con altitudes superiores a 2 000 m, con temperaturas medias anuales de 15 °C y precipitaciones pluviales de 500 a 1 000 mm (Martínez y Pérez, 1997), existen alrededor de 700 ha establecidas con manzano; principalmente en los municipios de San Joaquín, Cadereyta, Pinal de Amoles y Amealco, donde en 2003 se produjeron 1 074 toneladas de fruto (SAGARPA, 2004).

Las principales variedades cultivadas en el estado son 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', a pesar de la deficiencia de frío en la región. Existe también un gran número de variedades criollas y otras que no han sido

claramente identificados (Martínez y Pérez, 1997). La anarquía en la selección de variedades, híbridos y portainjertos por parte de los productores y las dependencias de gobierno ha propiciado el desconocimiento de la identidad de éstos y que los productores encuentren dificultades para adquirir en viveros aquellos materiales que presenten características sobresalientes. Por otro lado, el pulgón lanígero (*Eriosoma lanigerum*), que ataca el follaje y la raíz, es una plaga bastante difundida en la región, que causa mermas considerables en la producción en muchos de los huertos (Martínez y Pérez, 1997). El método más eficaz para el combate de dicha plaga es la utilización de portainjertos clonales resistentes. Se desconoce la proporción con que se encuentran establecidos este tipo de portainjertos, aunque se presume que los más utilizados son MM 106 y el MM 111.

Los recursos genéticos se han caracterizado tradicionalmente por una combinación de rasgos morfológicos y agronómicos (Waugh y Powell, 1992), aunque estos marcadores son influenciados por el ambiente (Staub y Serquen, 1996). Recientemente se ha desarrollado una gran cantidad de marcadores genéticos entre los que destacan los basados en los polimorfismos encontrados en el ADN, tales como los RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) y AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) que permiten el análisis del genoma completo, evitan las imprecisiones causadas por efectos ambientales y pueden reducir el tiempo, espacio y costo de los programas de mejoramiento genético de plantas. Éstos no son influenciados por interacciones genéticas y pueden detectar cambios muy pequeños (Simpson, 1999).

Los marcadores RAPD, basados en la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), permiten la separación y análisis de los productos de amplificación por medio de una electroforesis de agarosa. Esta técnica no necesita radiactividad y permite revelar el polimorfismo entre individuos (Lin *et al.*, 1996) y se ha utilizado en muchas especies, ya que es la más económica para proyectos relativamente pequeños o medianos (Ragot y Hoisington, 1993). Los RAPD se han aplicado en plantas, para la construcción de mapas genómicos (Williams *et al.*, 1990); la identificación de marcadores ligados a genes de resistencia (Koller *et al.*, 1993; Tartarini, 1996); estudios de la diversidad genética para la identificación de variedades cultivadas (Koller *et al.*, 1993; Warburton y Bliss, 1996) y de especies (Transue *et al.*, 1994); la evaluación de colecciones de germoplasma (Virk *et al.*, 1995; Nnadozie *et al.*, 2001); la evaluación de relaciones genéticas (Schnell *et al.*, 1995) y la determinación de parentesco (Tinker *et al.*, 1993). En manzano se han usado para detectar la condición apomícti-

ca (Rahman *et al.*, 1997); para deducir el origen genético de la variedad 'Braeburn' en Nueva Zelanda (Gardiner *et al.*, 1996); para localizar secuencias relacionadas con genes de resistencia contra la roña (*Venturia inaequalis* clasificador) y para hacer selección temprana de plantas resistentes (Koller *et al.*, 1993; Tartarini, 1996; Yang *et al.*, 1997). También se han utilizado para la identificación de variedades y genotipos (Koller *et al.*, 1993; Goulão *et al.*, 2000; Nnadozie *et al.*, 2001).

El objetivo del trabajo fue estudiar la diversidad genética de poblaciones de manzano (*Malus domestica* Borkh) de Querétaro, México, con base en el uso de marcadores moleculares tipo RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del germoplasma

Durante abril y mayo del 2000 se colectó tejido foliar joven de 65 árboles de manzanos: 15 de identidad se desconocida, 31 variedades conocidas (algunas de ellas repetidas), 15 híbridos, y cuatro portainjertos. Los muestreos se realizaron en seis comunidades de la zona productora del municipio de Cadereyta, Querétaro: La Esperanza, Rancho Nuevo, El Sarro, La Veracruz, Misión de Maconí y El Suspiro; en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de San Luis de la Paz, Guanajuato y en el huerto del Ing. Aroldo Rumayor, en Aguanueva, Coahuila (Cuadro 1). El tejido foliar se almacenó en bolsas de polietileno, en hielo seco; una vez en el laboratorio, las muestras se colocaron a -80 °C, hasta su utilización.

Extracción, purificación y cuantificación del ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo con base en el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983). Un gramo de tejido se maceró en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se colocó en un tubo Sorvall que contenía 10 mL de solución amortiguadora de extracción [Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y SDS 20 % (p/v)]. Las muestras se colocaron en un baño maría a 65 °C por 10 min. Posteriormente, se agregaron 3.3 mL de acetato de potasio 5 M, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 40 min. Se centrifugó por 20 min a 18 000 rpm. a 4 °C y el sobrenadante se vació en 10 mL de isopropanol preenfriado a través de un embudo con tela magitel. El tubo conteniendo el sobrenadante se dejó a -20 °C durante 30 a 60 min. La madeja de ADN se colectó con un gancho de vidrio y se colocó en 700 µL de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, EDTA 10 mM).

Al ADN se adicionaron 5 μ L de ribonucleasa A (10 mg mL⁻¹) (Sigma Chemical). Se incubó durante 40 min a 37 °C con el fin de desnaturalizar el ARN contaminante.

Cuadro 1. Origen e identificación y de las muestras utilizadas en este estudio

N°	Denominación	Origen, características
1	Rayada ^a	La Esperanza, traída de Estados Unidos, roja estriada
2	Rayada ^a	Rancho Nuevo, roja estriada
3	'Golden Delicious' ^a	La Esperanza, variedad americana, amarilla dorada
4	'Red Delicious' ^a	La Esperanza, variedad americana, rojo intenso
5	'Red Delicious' ^b	Igual que 4
6	'Anna' ^a	El Sarro, orig. Israel, R. Hadassiya x G. Delicious, roja moteada
7	'Anna' ^b	Israel, Red Hadassiya x G. Delicious, roja moteada
8	Golden Aguanueva ^b	Mutante de G. Delicious, origen dudoso
9	Golden Aguanueva ^b	Mutante de G. Delicious, origen dudoso
10	Golden Aguanueva II ^b	Mutante de G. Delicious, origen dudoso
11	India 6 ^b	Obtenida de semilla, manzana chapeada, bajo frío
12	India 5 ^b	Obtenida de semilla, no ha fructificado, bajo frío
13	India 2 ^b	Obtenida de semilla, rayada, 250 H. F., bajo frío
14	India A ^b	Injertada en CENGUA a partir de otras Indias
15	India B ^b	Propagada por injerto en CENGUA, a partir de otras Indias. Manzana rayada, 250 H. F.
16	Española-Z ^b	Variedad roja procedente de Zacatecas
17	Española-J ^b	Variedad roja proveniente de Jalisco
18	'Royal Gala' ^b	Originada en Nueva Zelanda, mutante de 'Gala', color escarlata brillante, con rayas amarillas
19	Golden 550 ^b	Mutante de 'Golden Delicious', posiblemente Aguanueva II
20	Rojaro ^b	Manzana roja traída de EUA a El Aro, Gto.
21	Rojaro 1 ^b	Manzana roja traída de EUA a El Aro, Gto.
22	Rojaro 3 ^b	Manzana roja traída de EUA a El Aro, Gto.
23	'McIntosh' ^b	Originaria de Canadá, rojo carmín a púrpura
24	Starking Delicious González	Mutante de 'Starking Delicious' obtenida en Coahuila
25	Desconocida ^a	El Suspiro, árbol adulto de manzana chapeada corriente
26	Desconocida ^a	El Sarro, manzana redonda de color rojo intenso
27	Desconocida ^a	El Sarro, planta joven de manzana tintorera
28	Desconocida ^a	La Veracruz, manzana roja, suave y dulce
29	Desconocida ^a	La Veracruz, manzana roja de buen tamaño
30	Desconocida ^a	La Veracruz, fruto grande, amarillo, dulce y aromático
31	Desconocida ^a	Misión de Maconi, manzana roja estriada
32	Desconocida ^a	Misión de Maconi, árbol adulto de manzana tintorera
33	Desconocida ^a	Misión de Maconi
34	Adina ^b	Clon donado por Rumayor al CENGUA
35	Desconocida ^b	Árbol de la colección del CENGUA
36	Desconocida ^b	Árbol de la colección del CENGUA
37	Desconocida ^b	Supuesto Anna x Princesa
38	Anna x Golden ^b	Híbrido de Aroldo Rumayor
39	Anna x Gala ^b	Híbrido de Aroldo Rumayor
40	Anna x Gala ^b	Híbrido de Aroldo Rumayor
41	'Gravenstein' ^b	Originaria de Holanda, triploide, manzana verde a rayada
42	Portainjerto ^a	El Suspiro, brote de raíz de árbol adulto
43	Portainjerto ^a	La Veracruz, brote de raíz de árbol adulto
44	Portainjerto ^b	Brote de raíz de árbol adulto
45	Portainjerto MM106 ^b	Obtenido de lote clonal de referencia del CENGUA
46	'Anna' ^c	Originaria de Israel, R. Hadassiya x G. Delicious, manzana roja moteada
47	'Einsheimer' ^c	Originaria de Israel, Zabadani x G. Delicious, manzana verde amarillenta
48	'Tropical Beauty' ^c	Originaria de Sudáfrica, manzana roja
49	'Royal Gala' ^c	Originaria de Nueva Zelanda, mutante de 'Gala', manzana de color escarlata brillante, con rayas amarillas
50	Anna x Gala ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor, 250 H. F.
51	Tropical Beauty x Princesa ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
52	Anna x Princesa ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
53	Aguanueva II x Princesa ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
54	Anna x Liberty ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
55	Anna x Enterprise ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
56	Einsheimer x Princesa ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
57	Anna x Gala ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor, 400 H.F.
58	Anna x Gala ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor, 550 H. F.
59	Anna x CLR9 ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
60	YNP x Enterprise ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
61	Einsheimer x G. Estándar ^c	Híbrido de Aroldo Rumayor
62	Aguanueva II ^c	Mutante de 'Golden Delicious', 550 H. F.
63	'Golden Delicious' ^c	Igual que 3
64	Golden Riojas I ^c	Mutante de una rama de 'Golden Delicious', 400 H. F.
65	Golden Rumayor ^c	Mutante de 'Golden Delicious', 550 H. F.

a = Colectas realizadas en distintas comunidades de Cadereyta, Qro.; b = Colectas realizadas en el Campo Experimental Norte de Guanajuato del INIFAP; c = Colectas de variedades e híbridos obtenidos por el Ing. Aroldo Rumayor en Aguanueva, Coah.; H.F. = Horas de frío a menos de 7.2 °C

El ADN se extrajo con 700 μL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó a 12 000 rpm. por 2 min en microcentrífuga para separar las fases. El ADN se precipitó nuevamente con 75 μL de acetato de sodio 3 M y 500 μL de isopropanol frío, se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Las hebras de ADN se retiraron con una pipeta Pasteur y se colocaron en un tubo Eppendorf limpio, mismo que se lavó con 500 μL de etanol 70 % (v/v). Posteriormente, con el fin de eliminar el etanol, el tubo Eppendorf se dejó secar al aire y, una vez seco se resuspendió el ADN en 300 μL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM). Finalmente, el ADN se almacenó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Su cuantificación se realizó en electroforesis en gel de agarosa a 0.8 % y las bandas obtenidas se compararon con un gel patrón con concentraciones conocidas de ADN.

Análisis RAPD

La amplificación del ADN se llevó a cabo con base en el protocolo de Williams *et al.* (1990). La mezcla de reacción consistió en 14.15 μL de H_2O ; 2.5 μL de solución amortiguadora PCR 10 X; 1.0 μL dNTP (10 mM); 0.5 μL del oligonucleótido; 0.1 μL de la enzima Taq ADN polimerasa (5 U μL^{-1}) y 1.75 μL MgCl_2 (50 mM) (Amersham Pharmacia Biotech Inc. E.U.). La amplificación se realizó en un termociclador Hybaid Omn-E (Hybaid Limited, UK), con el siguiente programa: 1 ciclo de 5 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desnaturalización); 45 ciclos de 1 min a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (desnaturalización), 2 min a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ (hibridación) y 2 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (extensión), con una rampa de 3 a 7 min a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, manteniendo los tubos a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo menos 5 min.

El análisis de los fragmentos amplificados de ADN se realizó en electroforesis de agarosa a 1.2 % con amortiguador TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM), y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de bromuro de etidio (0.01 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de gel). Se utilizó una unidad electroforética horizontal (Gibco-BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) y una fuente de poder EC3000-90 (E-C Apparatus Corporation, USA). Se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco-BRL, Life Technologies). Los carriles del gel se cargaron con 12.5 μL de la muestra de reacción de PCR mezclados con 2.5 μL de amortiguador de carga (Orange G 6x). La separación electroforética se realizó con voltaje constante (5V cm^{-1}) durante aproximadamente 3 h. Los productos de amplificación se visualizaron por exposición a la luz ultravioleta (300 nm) en un transiluminador y se fotografiaron con una cámara Polaroid Gel Cam con película Polaroid 667.

Un total de 60 oligonucleótidos correspondientes a los conjuntos de decámeros OpA, OpB y OpC (Operon Tech-

nologies, Alameda, CA, USA) se probaron en cinco muestras de ADN de manzano por duplicado. Los oligonucleótidos que mostraron reproducibilidad, buena resolución y mayor número de bandas (Cuadro 2) se utilizaron para los análisis con el total de las muestras.

Análisis de los datos

Los patrones electroforéticos de cada individuo se inspeccionaron visualmente para generar una tabla de contingencia. Los datos se registraron como variables discretas, se utilizó "1" para indicar la presencia y "0" para la ausencia de cada banda. A partir de la tabla de contingencia se obtuvieron los coeficientes de disimilitud con base en el índice de Jaccard (Kaufman y Rousseauw, 1990):

$$\text{Distancia genética (Jaccard)} = \frac{b + c}{a + b + c}$$

Donde: **a** = Número de bandas presentes en ambos individuos; **b** = Número de bandas presentes en X_i y ausentes de X_j ; **c** = Número de bandas ausentes en X_i y presentes en X_j

Con la matriz de coeficientes de disimilitud, se procedió a aplicar el análisis de conglomerados jerárquico, a partir de un solo grupo hasta llegar a 65, de acuerdo con el método AGNES (Kaufman y Rousseauw, 1990), que llevó a la construcción de un dendrograma. Las operaciones se realizaron en el programa de computadora S-Plus Versión 2001.

RESULTADOS

Selección de los oligonucleótidos y polimorfismo obtenido

De los 60 oligonucleótidos analizados, 15 no amplificaron, seis fueron monomórficos y 39 mostraron evidencia de polimorfismo. De éstos, se seleccionaron, diez con los que se obtuvo un mayor polimorfismo de bandas: OpA02, OpA04, OpB07 y OpC01, OpC02, OpC11, OpC13, OpC15, OpC19 y OpC20. La secuencia de los oligonucleótidos seleccionados, el número de bandas obtenidas con cada uno de ellos y el rango de peso molecular de las bandas obtenidas por cada oligonucleótido, se muestran en el Cuadro 2.

El análisis de RAPD realizado en las 65 muestras de manzano produjo 142 bandas amplificadas: 113 (79.6 %) polimórficas y 29 (20.4 %) monomórficas. El patrón electroforético de bandeo obtenido para 53 muestras con el oligonucleótido OpC15 se muestra en la Figura 1.

Cuadro 2. Productos amplificados por 10 oligonucleótidos evaluados en 65 genotipos de manzano

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Bandas			Rango de PM (pb)
		Total	Polimórficas	Monomórficas	
OpA02	TGCCGAGCTG	12	9	3	2072 a 400
OpA04	AATCGGGCTG	13	11	2	2072 a 300
OpB07	GGTGACGCAG	15	14	1	2072 a 300
OpC01	TTCGAGCCAG	13	12	1	2072 a 200
OpC02	GTGAGGCGTC	14	11	3	2072 a 150
OpC11	AAAGCTGCGG	16	13	3	2072 a 200
OpC13	AAGCCTCGTC	14	11	3	2072 a 350
OpC15	GACGATCAG	16	13	3	2072 a 100
OpC19	GTTGCCAGCC	15	10	5	2072 a 200
OpC20	ACTTCGCCAC	14	9	5	2072 a 200
Total		142	113	29	

Relaciones genéticas

La mayor disimilitud en el dendrograma (Figura 2) fue de 0.71, y la menor fue de 0.11. Se observó la clara separación de las muestras en dos grupos principales ("X" y "Y") (Figura 2).

El grupo "X" (3 a 48) estuvo constituido fundamentalmente por manzanos relacionados con la variedad 'Golden Delicious'; incluyó 23 muestras y se subdividió en dos subgrupos: X₁ (19 a 48), donde se encontraron tres variedades cultivadas comerciales ('Tropical Beauty', 'Einsheimer' y 'Gravenstein'); dos muestras con identidad desconocida, y un mutante de 'Golden Delicious'. El X₂ (3 a 60) presentó dos conglomerados; uno de ellos incluyó dos muestras de 'Golden Delicious' procedentes de localidades distintas (3 y 63) y un híbrido. El otro conglomerado (50 a 60) se dividió en tres conjuntos: 1) Agrupó a tres híbridos de 'Anna' x 'Gala' (muestras 50, 57 y 58); 2) Agrupó seis muestras, entre ellas tres mutantes de 'Golden Delicious' (Golden Riojas I, Golden Rumayor III y Agua Nueva II), y dos híbridos de 'Princess' (51 y 53); 3) Concentró cinco muestras entre las que se encontraron cuatro híbridos de 'Anna' y dos de 'Enterprise'.

El grupo "Y" (1 a 20) estuvo constituido en su mayoría por manzanas rojas. Se dividió en dos conglomerados principales: El Y₁ (4 a 20) que agrupó a 14 muestras divididas en dos subgrupos: 1) Con seis muestras (6 a 20): India B e India 2; tres muestras de la variedad 'Anna' de diversas procedencias (El Sarro, INIFAP y Saltillo, Coah.) y 'Rojaro'; 2) Incluye ocho muestras (4 a 16): dos 'Red Delicious' (4 y 5), de La Esperanza y del INIFAP, Guanajuato, respectivamente; dos variedades rojas: Rojaro 3 y 'Starking Delicious' González, y dos muestras de manzanas de pulpa roja colectadas en El Sarro y la Misión de Maconí (27 y 32). Por su parte, Y₂ (1 a 45) incluyó 28 muestras divididas en tres subgrupos: 1) Con cuatro por

tainjertos (42, 43, 44 y 45); 2) Con nueve muestras (de 10 a 38): dos 'Royal Gala' (18 y 49) de Saltillo e INIFAP

(0.15 de disimilitud) respectivamente, y dos híbridos de 'Anna' x 'Gala'. 3). Con 11 muestras (de 1 a 25) entre las que se observaron dos variedades rayadas con 0.22 de disimilitud, dos manzanas rojas procedentes de La Veracruz (28 y 29) y 'McIntosh', similar genéticamente a una muestra procedente de El Sarro (23). Finalmente, separada por completo de las muestras, apareció la 25 proveniente de El Suspiro y considerada por el propietario como manzana "corriente".

DISCUSIÓN

En este trabajo se detectó 80 % de polimorfismo, resultado que contrasta con Nnadozie *et al.* (2001), quienes en 155 genotipos de manzano encontraron, con base en el uso de nueve oligonucleótidos, 42 bandas polimórficas y una sola banda común (98 % de polimorfismo), y con Goulão *et al.* (2000) quienes en 43 genotipos obtuvieron, a partir de 35 oligonucleótidos, 206 bandas polimórficas y 156 monomórficas (57 % de polimorfismo). La elevada variabilidad genética encontrada en este estudio puede deberse a la naturaleza contrastante de las muestras estudiadas, que incluye variedades comerciales, híbridos y portainjertos.

El dendrograma proporcionó en general resultados lógicos. Las tres variedades cultivadas encontradas en el subgrupo X₁ provienen de distintos orígenes geográficos. 'Tropical Beauty' proviene de Sudáfrica y 'Gravenstein' de Holanda (Manhart, 1996). 'Einsheimer', por su parte, es originaria de Israel y procede de la cruce entre 'Zabidani' y 'Golden Delicious' (Brooks y Olmo, 1997), lo que explica su presencia dentro del grupo X, que incluye materiales relacionados con 'Golden Delicious' (dos híbridos de 'Einsheimer', muestras 56 y 61, también se encuentran en el grupo X). Otras muestras afines con esta variedad en el mismo subgrupo son la 30, proveniente de la comunidad

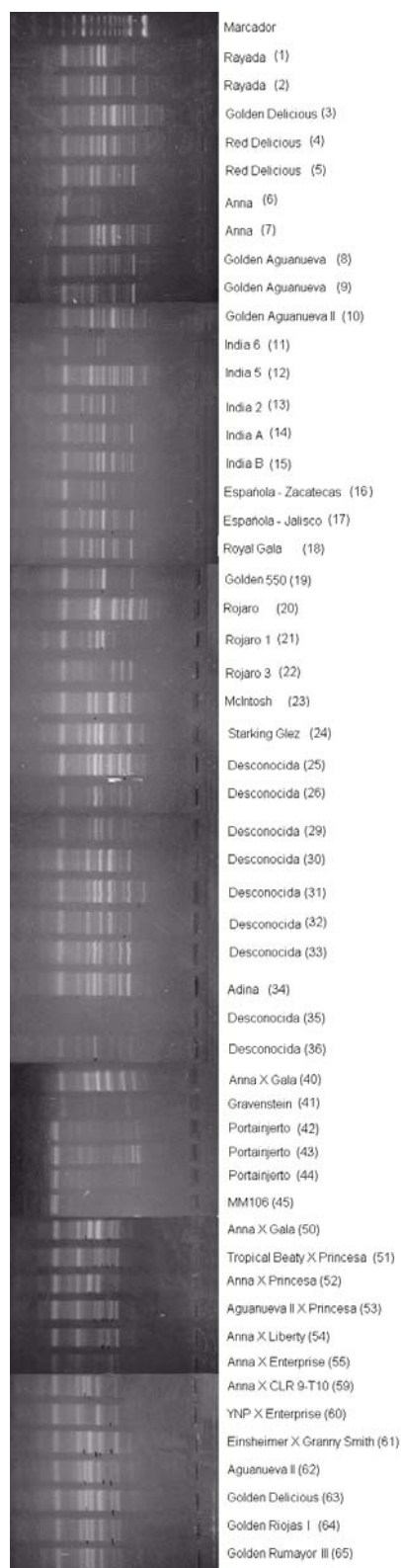


Figura 1. Patrón de bandedo obtenido mediante análisis RAPD de 53 muestras de manzano con el oligonucleótido OpC15

de La Veracruz, misma que presenta frutos amarillos de tamaño grande, más dulces y aromáticos, y de maduración más temprana que 'Golden Delicious'; además de Golden 550, mutante de 'Golden Delicious' que, de acuerdo con (Lara. Com. personal¹), ha mostrado fuerte tendencia a revertir en los huertos comerciales hacia 'Golden Delicious', lo que sugiere que se trata de una quimera mericlinal.

En el subgrupo X₂ fue lógica la cercanía entre las dos muestras de 'Golden Delicious' procedentes de localidades distintas, por tratarse de la misma variedad cultivada. Igualmente, la similitud de los tres supuestos híbridos de 'Anna' x 'Gala' confirma su identidad. También fue notable la agrupación de Golden Riojas I y Golden Rumayor III, ambos mutantes de 'Golden Delicious'. El primero proviene de una mutación de una rama de 'Golden Delicious' (probable quimera mericlinal), mientras que Golden Rumayor III es originaria de una mutación en un árbol completo (probable quimera periclinal). Estos materiales se descubrieron originalmente en huertos distintos, con 12 años de diferencia y son similares a Agua Nueva II, también mutante de 'Golden Delicious'. La cercanía entre las muestras 51 y 53 se debe a que tienen un progenitor común, 'Princess', que es un híbrido de 'Anna x Gala', lo que explica que dichas muestras se hayan agrupado con tres híbridos de este tipo (50, 57 y 58) en el grupo X.

En el subgrupo 'Y₁' se encontraron los genotipos B y 2 ("Indias"). Al respecto, seis plantas traídas de la India se establecieron en Celaya, Guanajuato y se llamaron "Indias". Dos de ellas se introdujeron por injerto en el INIFAP de San Luis de la Paz, Guanajuato y se identificaron como A y B. Años después, varetas de las seis plantas originales se colectaron en el huerto de Celaya, se injertaron en el mismo Campo Experimental y se numeraron del 1 al 6. La cercanía genética de India B e India 2, así como el hecho de que ambas presenten grandes semejanzas (fruto rayado y requerimientos de frío cercanos a 250 HF), parecen indicar que se trata del mismo clon.

Fue interesante observar la agrupación de tres muestras de 'Anna' con diversas procedencias (El Sarro, INIFAP y Saltillo, Coah.) y cuya cercanía en el dendrograma permite confirmar su identidad. Igualmente fue notable la agrupación de dos manzanas rojas, Rojaro 3 y 'Starking Delicious', González. Es probable que Rojaro 3, manzana roja traída de EE.UU. a El Aro, Guanajuato, sea en realidad 'Starking Delicious', variedad cultivada extensamente en dicho país. Estas dos muestras fueron muy similares a las

¹ D Lara (1984) El fenómeno de la reversión en mutantes naturales de manzano cv. 'Golden Delicious'. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila.

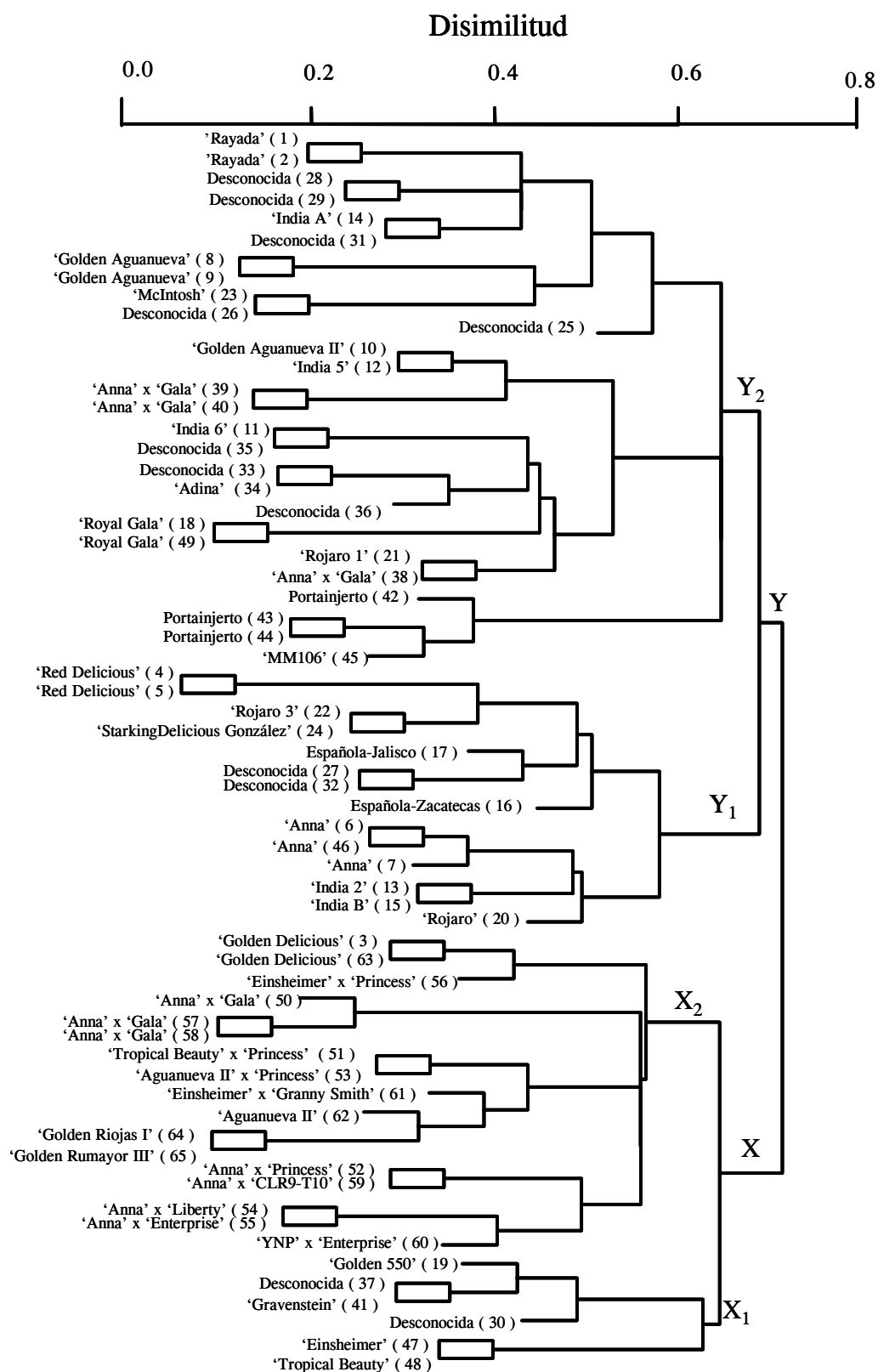


Figura 2. Dendrograma obtenido con marcadores RAPD a partir de 65 muestras de manzano de Querétaro, México.

dos de 'Red Delicious'. Esto es lógico dado que 'Starking Delicious' es un mutante de 'Red Delicious' obtenido en EE.UU. en 1921 (Manhart, 1996). Asimismo, la cercanía de las dos muestras de 'Red Delicious' (4 y 5) obtenidas en sitios alejados, confirma su identidad. En el subgrupo Y₁ se agruparon dos manzanas de pulpa roja (27 y 32), tipo muy raro en Querétaro. Estas muestras fueron colectadas en dos localidades del municipio de Cadereyta; es probable que sean el mismo clon, ya que la práctica de intercambio de material vegetativo entre productores es común en la zona.

En el subgrupo Y₂ se observó similitud entre portainjertos (muestras 42, 43 y 44, correspondientes a los brotes basales obtenidos en distintos huertos de Cadereyta) con la muestra 45, lo que permite asumir que se trata de materiales clonales. Se conocía de antemano la identidad de la muestra 45 (MM 106). Esta hipótesis es reforzada con el antecedente de que las manzanas introducidas en la región por programas oficiales durante las décadas de los 70s y 80s, época del mayor incremento de las plantaciones, se encontraba injertada sobre MM 111 o MM 106 (ambos tienen a 'Northern Spy' como progenitor común, de donde heredan la resistencia al pulgón lanígero); o bien, sobre portainjertos francos, generalmente obtenidos de semilla de variedades mejoradas, tales como 'Golden Delicious' o 'Red Delicious'. Sin embargo, las muestras correspondientes a estas variedades (3, 4, 5 y 63) se encuentran alejadas genéticamente de los portainjertos en el dendrograma.

La cercanía entre las dos muestras de 'Royal Gala' de distintas procedencias confirma su identidad, lo que igualmente sucede para las dos "rayadas" (1 y 2). Estas últimas fueron colectadas en dos comunidades cercanas, donde es posible que también haya existido intercambio de material genético. Además, las dos muestras desconocidas procedentes de La Veracruz (28 y 29) correspondientes a manzanas rojas, probablemente pertenecen a la misma variedad.

La cercanía de la muestra desconocida procedente de El Sarro (23) con 'McIntosh' sugiere que bien podría tratarse de dicha variedad. El estudio detallado de las características del árbol y el fruto de ambas muestras será necesario para confirmar esta relación. Finalmente, la muestra 25 de El Suspiro, considerada manzana "corriente", podría corresponder a un brote desarrollado a partir de un patrón de semilla de una especie silvestre, el cual se desarrolló una vez que murió el injerto. Lo anterior se confirmó con la observación de la planta *in situ*.

CONCLUSIONES

La técnica RAPD permitió agrupar a variedades cultivadas, mutantes e híbridos de manzano, de acuerdo con su origen genético, tal como ocurrió con los materiales relacionados con 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Anna', 'Royal Gala' y 'Anna x Gala'.

Se demostró que la disimilitud entre genotipos de manzano está estrechamente relacionados con el pedigrí de cada uno de ellos.

Las relaciones genéticas entre los portainjertos analizados indican que se trata de materiales clonales.

BIBLIOGRAFÍA

- Brooks S, R Olmo (1997) Register of Fruit Nut Varieties. Ed. ASHS Press. 743 p.
- Dellaporta S L, J Wood and J B Hicks (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molec. Biol. Rep. 1:19-21.
- FAO (2004) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Apples in Mexico. <http://apps.fao.org>. Consultada en febrero de 2004.
- Gardiner S E, H C Bassett and C Madie (1996) Isozyme, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), and Restriction Fragment length Polymorphism (RFLP) markers used to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121 (6):996-1001.
- Goulão L, L Cabrita, C Oliveira, J M Leitao (2001) Comparing RAPD and AFLPTM analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apples (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Euphytica 119(3):259-270.
- Kaufman L, P J Rousseauw (1990) Finding Groups in Data: an Introduction to Cluster Analysis. Ed. John Wiley and Sons. Inc. New York, USA. 342 p.
- Koller B, A Lehmann, J M McDermott, C Gessler (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theoret. Appl. Gen. 85:901-904.
- Lin J J, J A Kuo, H S Saunders, M H Beard, W Macdonald, G N Kenworthy (1996) Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. Plant Molec. Biol. Rep. 98:206-211.
- Manhart W (1996) Apples for the 21st Century. North American Tree Company. Portland, USA. 286 p.
- Martínez P R, M Pérez (1997) La planta de manzano. Efecto de la época de trasplante del portainjerto y de la fecha de injertación sobre la calidad de la planta de manzano propagada en maceta. Querétaro. Querétaro Tiempo Nuevo. 138:42-46.
- Nnadozie C O, S E Gardiner, C M Basset, S Mirko, R D Ball, G M Bus, A G White (2001) Genetic diversity and relationships in *Malus* spp: Germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126:318-328.
- Ragot M, D A Hoisington (1993) Molecular markers for plant breeding: comparison of RFLP and RAPD genotyping costs. Theor. Appl. Gen. 86:975-985.
- Rahman H, D J James, A M Hadonou, P Caligari (1997) The use of RAPD for verifying the apomictic status of seedlings of *Malus* species. Theor. Appl. Gen. 95:1080-1083.
- SAGARPA (2004) Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx>

- S-plus 6 for Windows (2001)** User's Guide. Insignful Corporation, Seattle, USA. pp:421-430.
- Schnell R J, C M Ronning, R J Knight (1995)** Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. Theor. Appl. Gen. 90:269-274.
- Simpson J (1999)** Molecular Markers. In: Molecular Biotechnology for Plant Food Production. O Paredes (ed). Technomic Publishing Co. INC. Lancaster, USA. pp:275-297.
- Staub J E, F C Serquen (1996)** Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31:729-741.
- Tartarini S (1996)** RAPD markers linked to the *Vf* gene for scab resistance in apple. Theor. Appl. Gen. 92:803-810.
- Tinker N A, M G Fortin, D E Mater (1993)** Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. Theor. Appl. Gen. 85:976-984.
- Transue D K, D J Fairbanks, L R Robinson, W R Andersen (1994)** Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. Crop Sci.34:1385-1389.
- Virk P S, B V Ford-Lloyd, M T Jackson, H J Newbury (1995)** Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. Heredity 74:170-179.
- Warburton M L, F A Bliss (1996)** Genetic diversity in peach (*Prunus persica* L. Batch) revealed by RAPD markers and compared to inbreeding coefficients. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 121:1012-1019.
- Waugh R, W Powel (1992)** Using RAPD markers for crop improvement. Trends Biotech. 10:186-191.
- Williams J G, A R Kubelik, K J Livak, J A Rafalski, S V Tingey (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-6535.
- Yang H, S Korban, J Krüger, H Schmidt (1997)** A RAPD marker tightly linked to the scab-resistance gene *Vf* in Apple. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 122:47-52.