

Caracterización por RAPD de tres variedades de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) obtenidas por cultivo de anteras *in vitro*

Molecular characterization of three anther tissue culture varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using RAPD analysis.

Gloria Azucena Fernández B.^{*}, Lucía Afanador^{**}, Nicolás Jaramillo^{***}, Edna Márquez^{**}, José D. Tinoco^{*}, Sergio Orduz^{****}.

RESUMEN

El análisis de amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD) fue usado para caracterizar dos nuevas variedades de tabaco tipo Flue Cured y otra de tabaco negro derivadas por la técnica del cultivo de anteras *in vitro*. Los RAPD son propuestos como un complemento apropiado de las características morfoagronómicas para llenar los requisitos de los estándares internacionales para el registro de semillas, establecidos para la identificación de variedades de tabaco. La identificación de tres variedades de tabaco y sus progenitores fue realizada usando el análisis RAPD con 64 iniciadores. Un número de 214 productos polimórficos fueron amplificados desde 14 iniciadores. El análisis estadístico realizado con el programa NTSYS, versión 1.2, usando el coeficiente de similitud de Jaccard. La inspección visual reveló que cinco iniciadores permitieron la separación de las variedades en dos grupos, de acuerdo con el tipo de tabaco: los Virginia (Flue Cured) y los Negros, mientras que un grupo de nueve iniciadores separó cada variedad y estableció las relaciones genéticas con sus progenitores. Los resultados obtenidos muestran que esta técnica es apropiada para establecer diferencias genéticas entre las variedades de tabaco.

Palabras clave: tabaco, *Nicotiana tabacum* L, RAPD – PCR, ADN, mejoramiento, variedades

ABSTRACT

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was used to characterize two new Flue Cured and one black tobacco type varieties derived from *in vitro* anther tissue culture technique. RAPDs are proposed as an appropriate complement of the morphoagronomic characteristics evaluations to fulfil international seed registration standards established for the identification of tobacco varieties. The identification of three tobacco varieties and their parents was carried out using the RAPD analysis with 64 random primers. Polymorphic products, 214 in number, were amplified only from 14 primers. Statistical analysis realized with the NTSYS program version 1.2 using the Jaccard similarity coefficient. The visual inspection revealed that five primers allowed the separation of the varieties in two groups, according to the type of tobacco: the Flue Cured and Black; while a group of nine primers separates each variety and establish its genetic relationship with their parents. The results obtained show that this technique is appropriated to establish genetic differences between tobacco varieties.

Key words: Tobacco, *Nicotiana tabacum* L, RAPD – PCR, ADN, breeding, varieties.

INTRODUCCIÓN

El tabaco es un cultivo agrónomicamente importante en Colombia. La superficie total dedicada a su cultivo es de aproximadamente 14.500 hectá-

reas y la producción total es de 30'000.000 de kilogramos. Tanto el mercadeo del tabaco como la manufactura de cigarrillos tiene altas exigencias

* Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico, CIDT, Compañía Colombiana de Tabaco – Coltabaco. A.A. 828 Medellín. autor para correspondencia. e-mail: cidt.biotech@coltabaco.com.co

** Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

*** Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín.

**** Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB.

de calidad y productividad; por esto la Compañía Colombiana de Tabaco, Coltabaco, ha creado algunas variedades con el fin de incrementar el rendimiento, la calidad física, química y resistencia genética a los principales patógenos de las zonas de producción. Así mismo, produce semilla certificada de óptima calidad biológica y genética de las diferentes variedades, que permiten a los agricultores obtener una mayor producción a un bajo costo económico y ambiental y, por ende, satisfacer los requerimientos del mercado nacional e internacional.

Se han obtenido tres variedades todas con resistencia a múltiples enfermedades por la técnica del cultivo de anteras *in vitro*, invirtiendo sólo la mitad del tiempo requerido que en un programa de mejoramiento tradicional. Dichas variedades son: COLTABACO 1-A® tabaco Negro tipo García de curado al aire, TRC 1-96® y TRC 2-99 (en proceso de registro ante el ICA) son tabaco tipo Virginia - Flue Cured, curado en atmósfera artificial. De las tres se tiene la caracterización morfoagronómica, análisis de la composición química de su hoja curada, evaluaciones regionales de rendimiento, calidad de maduración, análisis económico y evaluaciones de resistencia a enfermedades como al Virus Mosaico del Tabaco (TMV), al hongo *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, al nemátodo *Meloidogyne incognita* razas 1 y 3, y a *Alternaria* pos *alternata* (Tinoco y Fernández, 1995; 1999).

La obtención de las nuevas variedades vegetales requiere alta inversión en términos de conocimiento, mano de obra, recursos materiales, dinero y tiempo; por ello en la mayoría de los países del mundo, además de la caracterización morfoagronómica, se han propuesto para su protección los marcadores moleculares o huellas genéticas, más comúnmente conocidas como *fingerprinting* de las plantas.

Es así como los marcadores basados en ADN permiten la comparación directa del material genético de dos plantas individuales, evitando las influencias ambientales en la expresión de los genes. Los marcadores propuestos por Smith y Smith (1991) para la caracterización molecular de las variedades vegetales fueron: polimorfismos en la longitud fragmentos de restricción del ADN (RFLP) y técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo las más reconocidas: amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismos

en el número variable de secuencias repetidas (VNTR), análisis de minisatélites y análisis de microsátélites (STR), siendo cualquiera de ellos válido si los resultados son reproducibles.

Dentro de estas técnicas, los RAPD han sido amplia y exitosamente utilizados en diferentes especies vegetales (Yang y Quiros, 1993; Hu y Quiroz, 1991). Con ellos se han generado dendrogramas en la caracterización para accesiones de cultivares específicos de *Coffea* (Orozco y Castillo *et al.*, 1994), *Theobroma* (Wilde *et al.*, 1992), *Solanum* (Demecke *et al.*, 1993), *Allium* (Wilkie *et al.*, 1993), (Dweikat *et al.*, 1993), *Triticum* (He *et al.*, 1992; Chandrasekar *et al.*, 1993; Joshi y Ngugen, 1993), *Malus* (Koller *et al.*, 1993; Mulcahy *et al.*, 1993), *Ipomoea batatas* (Sagredo *et al.*, 1998), *Cucumis* (García *et al.*, 1998), *Passifloras* (Fajardo *et al.*, 1998), *Camellia sinensis* (Wachira *et al.*, 1995), *Lycopersicon* (Grandillo y Tanksley, 1996), *Manihot esculenta* (Colombo *et al.*, 1998, 2000).

Los RAPD también han sido ampliamente utilizados para la identificación de híbridos somáticos interespecíficos e intraespecíficos en *Nicotiana tabacum* y *N. rústica* L. y para la identificación y caracterización de variedades de *N. tabacum*, en la que se ha detectado polimorfismo intervarietal (Coussirat, 1993, 1994; Filippis *et al.*, 1996; Yi, 1997; Yu, 1997; Rossi *et al.*, 1999; Del Piano *et al.*, 2000).

Los RAPD son marcadores dominantes y suministran información simultánea sobre varios *loci*. La técnica es altamente confiable en el rastreo de huellas genéticas de variedades (Ragot y Hoisington, 1993; Staub *et al.*, 1996); ofrece ventajas en velocidad y simplicidad, precisa menos tiempo que otras técnicas, el proceso de extracción del ADN es más simple y requiere cantidades muy pequeñas de material vegetal. Además, es apropiada para la caracterización genética cuando el tamaño de la muestra es pequeño (Ragot y Hoisington, 1993; Staub y Serquen, 1996), permitiendo determinar el grado de parentesco entre las variedades.

Por lo anterior, y dadas las necesidades de Coltabaco, en esta investigación se utilizó la técnica RAPD-PCR para caracterizar molecularmente las variedades y sus progenitores, y de esta manera establecer las diferencias genéticas entre ellas. Tales diferencias permitirán identificar las semillas certificadas de tabaco, con fines de exportación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Se utilizaron siete variedades de tabaco, tres obtenidas por cultivo de anteras *in vitro* y los cuatro progenitores: la variedad COLTABACO 1 – A® (tipo de tabaco negro) cuyos progenitores son: Coltabaco 23RM (C23RM) (tabaco negro tipo García), progenitor femenino donante de adaptabilidad, rendimiento y resistencia a TMV; Speight 28 (SPG - 28) (tabaco tipo Flue Cured) progenitor masculino del primer cruce, donante de resistencia a *Alternaria*, *Phytophthora parasítica*, *Ralstonia* y *Meloidogyne incognita* e ICA Guane (ICAG) (tabaco negro tipo García) que en la generación F₂ actuó como progenitor masculino donante de la característica morfológica ancho de la hoja y mejoramiento de la calidad. Las dos variedades hermanas, TRC 1 – 96® y TRC 2 – 99, cuyos progenitores fueron NC 567 (tabaco tipo Flue Cured) progenitor masculino donante de resistencia a TMV y *Meloidogyne incognita* y SPG - 28 (tabaco tipo Flue Cured) progenitor femenino donante de rendimiento y calidad, además de aportar resistencia a *Alternaria pos alternata* y a *Meloidogyne incognita* SPG - 28 se utilizó tanto para la obtención de la variedad Coltabaco 1 - A como para obtener TRC 1 - 96 y TRC 2 – 99; es un progenitor común para las tres variedades.

Extracción de ADN: Se utilizó el método de Dellaporta (1983) partiendo de 0,8 gramos de hojas jóvenes maceradas con nitrógeno líquido. El ADN fue cuantificado por espectrofotometría a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro GENESIS 5.1®, encontrándose un rendimiento entre 70,30 hasta 94,69 µg de ADN por gramos de hoja fresca procesada por muestra. La integridad del ADN fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Seakelme).

PCR: Se realizó con el protocolo utilizado por Coussirat (1994), modificando la concentración de MgCl₂ a 2,0 mM, dNTP a 0,1 mM y la concentración de ADN a 20 ng, en un volumen final de 25 µl. Se evaluaron 64 iniciadores RAPD de 10 mer cada uno (Operon Technology), correspondientes a los Kits: OPI (1 a 20), OPB: (1 a 20), OPM: (1 a 20) y los iniciadores individuales OPC-07, OPD-14, OPE-17, OPH- 06.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MJ RESEARCH modelo PTC 20, programado a 45 ciclos: 94°C por 12 min, 94°C por 0,5 min, 36°C por 1,0 min, 72°C por 1,0 min, 72°C por 10 min, con incrementos de 1°C cada tres segundos,

dejando finalmente a 4°C. Los productos de amplificación fueron separados en gel de agarosa al 1,5% a 5 V/cm por dos horas y las bandas de ADN visualizadas con Bromuro de Etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Operon Technology).

Diseño experimental: De cada variedad se analizaron diez individuos. No se observó polimorfismo intravarietal para ninguno de los primers evaluados. Esto permitió hacer mezclas del ADN de diez individuos por variedad, los cuales se evaluaron con los iniciadores y condiciones de amplificación anteriormente mencionados. Cada ensayo fue repetido dos veces con iguales resultados.

Análisis de datos: Se hizo una inspección visual de los productos de amplificación para determinar el perfil genético de cada variedad. Para ello se registró el número promedio de bandas electroforéticas por iniciador por variedad, se cuantificó el número de genotipos *multilocus* diferentes por variedad y se calculó la frecuencia de cada banda de electroforesis por variedad. Esto permitió identificar los iniciadores que generaron polimorfismos propios a cada una de las siete variedades. De tal manera, el perfil polimórfico único de cada variedad permitió la identificación sin ambigüedades de las variedades y sus progenitores.

Con el objetivo de verificar las relaciones de parentesco, se computó una matriz de presencia (1) y ausencia de bandas (0), considerando sólo los iniciadores que generaron polimorfismos propios a cada variedad (Hadrys *et al.*, 1992; García *et al.*, 1998; Coussirat, 1994). Dentro de estos iniciadores se registraron las bandas generadas tanto por los fragmentos monomórficos como por los polimórficos. Tal matriz binaria se utilizó para calcular coeficientes de similitud de Jaccard (Crisci, 1983), generando una nueva matriz de distancias genéticas entre cada par de variedades. A partir de la matriz de distancias se construyeron árboles fenéticos mediante el método de agrupación por pares, utilizando los promedios aritméticos no ponderados (UPGMA) con el programa NTSYS pc versión 2.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de iniciadores: De los 64 iniciadores evaluados, 14 de ellos amplificaron polimorfismos (21,88%), 17 no amplificaron (26,56%) y 33 amplificaron fragmentos monomórficos (51,56%). Con los 47 iniciadores que amplificaron se obtuvieron

526 bandas, de las cuales 214 fueron polimórficas y 312 monomórficas. Las bandas polimórficas por iniciador variaron desde 2 a 24, con una media de 7,8 bandas, las cuales generaron un polimorfismo de 20,34% entre las siete variedades. Tales polimorfismos permitieron identificar y diferenciar las siete variedades en estudio.

El porcentaje de polimorfismos observado es cinco veces mayor que el obtenido por Coussirat (1994), quien obtuvo sólo un 4,7%, el cual no le permitió clasificar a nivel de variedad. De igual manera, Del Piano *et al.*, (2000) y Rossi *et al.*, (1999) observaron muy poca variabilidad genética al comparar por esta metodología 36 y 19 variedades de tabaco, respectivamente. La diferencia puede deberse a que el material utilizado en el presente estudio posiblemente tenga una base genética más amplia, ya que las variedades C23RM e ICAGUANE tienen al menos un progenitor correspondiente a ecotipos nativos. Adicionalmente, los iniciadores aquí utilizados y las variedades son diferentes a los empleados por los autores mencionados; sólo dos iniciadores fueron comunes con los de Coussirat.

Polimorfismo para tipos de tabaco

De 64 iniciadores, con 14 que presentaron polimorfismo, al evaluar las mezclas de ADN de diez individuos por variedad se detectó un grupo de cinco (OPB 04, OPC 07, OPI 11, OPI 17 y OPM 13), los cuales permitieron diferenciar las variedades por tipo de tabaco, separando las tres de tabaco Negro tipo García de las cuatro tipo Flue Cured (véase tabla 1).

En la figura 1 se presentan los perfiles RAPD generados por estos cinco iniciadores para las variedades de tabaco. El iniciador OPI 17 genera una banda de 500 pares de bases (pb) presente únicamente en las tres variedades de tabaco de tabaco negro tipo García: C23RM, ICAGUANE, COLTABACO 1- A y ausente en las Flue Cured (Virginia); el OPI 11 con una banda de 550 pb, presente sólo en los cuatro Flue Cured: SPG 28, TRC 1-96, TRC 2-99 y NC 567; el OPB 04 genera una única banda de 500 pares de bases para los negros tipo García y para los Virginia, otra única banda de 680 pb. El iniciador OPC

Tabla 1. Secuencias de los cinco iniciadores que amplificaron fragmentos de ADN polimórficos para tipo de tabaco y promedio de bandas electroforéticas generadas por iniciador.

Iniciadores polimórficos para diferenciar tipos de tabaco Negro y Flue Cured		
Iniciador	Secuencia	Promedio bandas
OPB 04	GGACTGGAGT	2
OPC 07	GTCCCGACGA	4
OPI 11	ACATGCCGTG	6
OPI 17	GGTGGTGTATG	5
OPM 13	GGTGGTCAAG	9

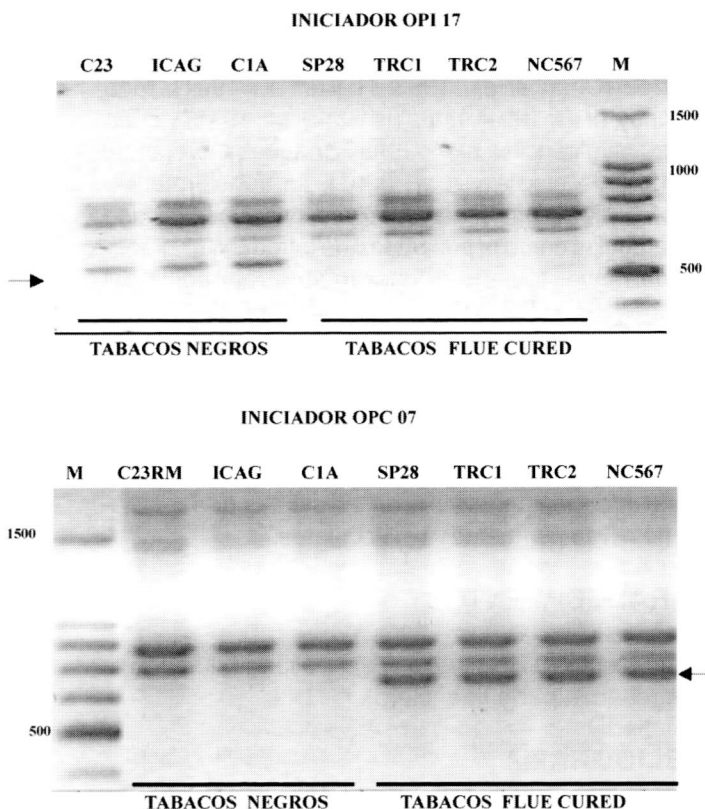


Figura 1. RAPD generados con los iniciadores OPI 17 y OPC 07 corridos con una mezcla de ADN de diez individuos por cada variedad. Las flechas muestran los fragmentos polimórficos entre los tipos de tabaco. M = Marcador 100 pb. En los carriles 1, 2 y 3, las variedades C23RM, ICAGUANE, COLTABACO 1- A (tabacos negros) y en los carriles 4, 5, 6 y 7, las variedades SPG 28, TRC 1-96, TRC 2-99 y NC 567 Tabacos Flue Cured.

07 generó una banda de 650 pares de bases que está presente sólo en tabacos Virginia, el resto de bandas con cada uno de estos iniciadores es igual para todos los tipos de tabaco.

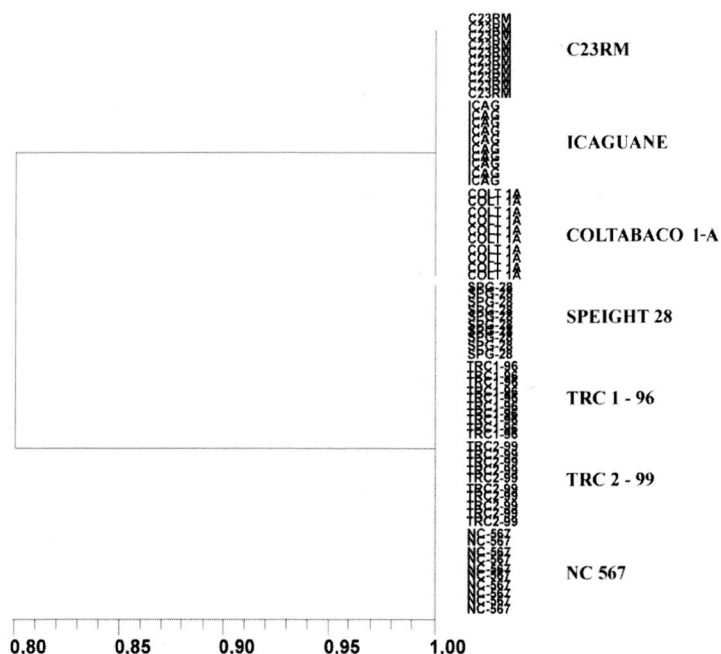


Figura 2. Dendrograma que ilustra las distancias genéticas entre las variedades de tabaco tipo Negro García y las variedades Flue cured; hay separación de los dos grupos, sin aportar diferencias intervarietales. Dendrograma construido por el método UPGMA a partir de una matriz de similitud de Jaccard.

los Flue Cured (SPG 28, TRC 1-96, TRC 2-99 y NC 567), también sin establecerse diferencias entre ellas. Ambos grupos se diferencian en un 20% con un porcentaje de similitud del 80%. Esta alta similitud obedece a que son variedades comerciales del género *Nicotiana*, las cuales pueden estar muy relacionadas por los procesos de mejoramiento. Los resultados del presente estudio permitieron encontrar cinco iniciadores (OPB 04, OPC 07, OPI 11, OPI 17 y OPM 13) que en siete variedades generaron marcadores moleculares específicos para tipos de tabaco, separando sin ambigüedades los negros tipo García de los Flue Cured.

Éste es el primer informe del encuentro de estos marcadores RAPD para cada tipo de tabaco, lo cual reviste una gran importancia para el mantenimiento y manejo de grandes colecciones en los bancos de germoplasma, pues permitirá realizar la separación inicial por tipos de tabaco y clasificar las variedades, sobre todo en aquellos casos donde haya duda de pertenencia a algún grupo o en algunos casos en los cuales el origen de los materiales es incierto. Este sistema permitirá, además, una clasificación inicial de materiales mucho más práctica y barata que si se utilizaran marcadores moleculares como los AFLP, microsatélites, etc.

Tabla 2. Secuencias de los nueve iniciadores que amplificaron fragmentos de ADN polimórficos para diferenciar variedades de tabaco y promedio de bandas electroforéticas generadas por iniciador.

Iniciadores polimórficos para diferenciar variedades de tabaco		
Iniciador	Secuencia	Promedio bandas
OPB 02	TGATCCCTGG	2
OPB 05	TGCGCCCTTC	12
OPB 08	GTCCACACGG	11
OPB 12	CCTTGACGCA	8
OPE 17	CTACTGCCGT	11
OPM 04	GGCGTTGTC	9
OPM 07	CCGTGACTCA	11
OPM 19	CCTTCAGGCA	10
OPM 20	AGGTCTTGGG	7

Polimorfismo varietal en tabaco

De 14 iniciadores que generaron patrones RAPD polimórficos, nueve (OPB 02, OPB 05, OPB 08, OPB 012, OPE 17, OPM 04, OPM 07, OPM 19 y OPM 20) generaron polimorfismo para las siete variedades de tabaco estableciendo claras diferencias entre ellas (véase tabla 2).

En el dendrograma (figura 2) generado a partir de una matriz de distancias de Jaccard se aprecia una clara separación de las variedades en dos grupos: tabacos negros tipo García (C23RM, ICAGUANE, COLTABACO 1- A), sin establecer diferencia entre las tres y el grupo correspondiente a

Los marcadores RAPD generados para las siete variedades por estos nueve iniciadores produjeron 214 bandas polimórficas, que permitieron calcular un polimorfismo total de 20,34% entre las siete variedades y generaron huellas genéticas propias de cada una de las variedades (figura 3).

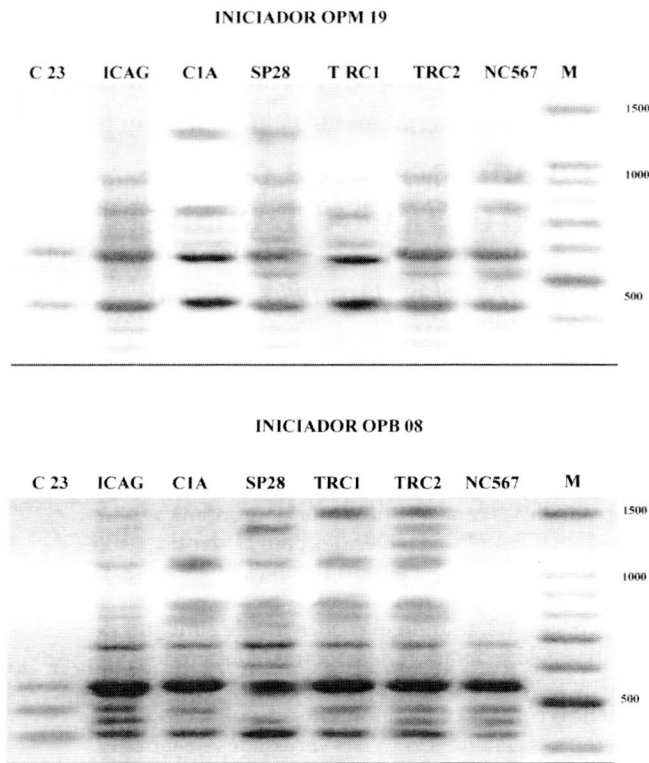
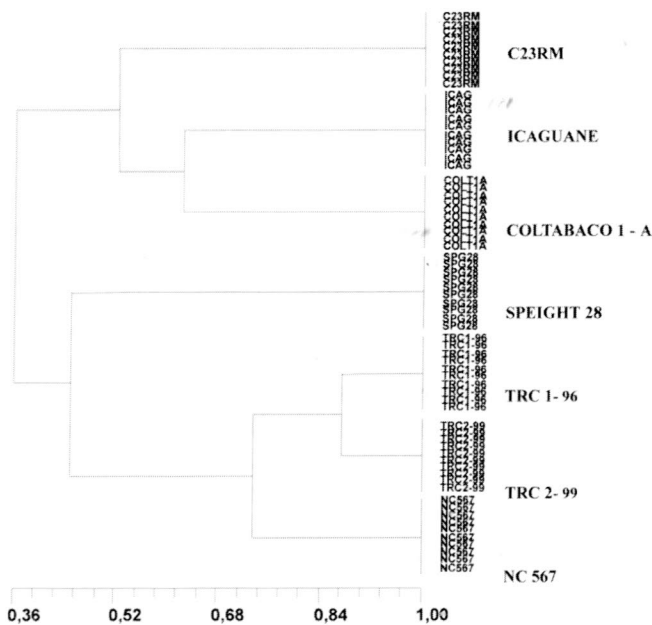


Figura 3. RAPD generados con los iniciadores OPM 19 y OPB 08 corridos con una mezcla de ADN de diez individuos por cada variedad. Se aprecia el alto grado de polimorfismo entre las diferentes variedades. M = Marcador 100 pb. En los carriles 1, 2 y 3, las variedades C23RM, ICAGUANE, COLTABACO 1 - A (tabacos negros), y en los carriles 4, 5, 6 y 7, las variedades SPG 28, TRC 1-96, TRC 2-99 y NC 567 Tabacos Flue Cured.



La verificación estadística de las bandas obtenidas en los fenogramas se calculó por el índice de similitud de Jaccard para todas las variedades. Los resultados se expresan en el dendrograma de la figura 4, donde se observa que las siete variedades analizadas generaron unos marcadores RAPD que las siguen separando en dos grupos distintos, correspondientes a los dos tipos de tabaco a los cuales pertenecen, pero esta vez estableciendo diferencias entre las variedades de cada grupo.

En el dendrograma (figura 4) se puede apreciar que la variedad SPG 28 tipo Virginia muestra el mayor porcentaje de diferenciación con el resto de las variedades (54,64%), pero relacionándose más estrechamente con las variedades de su grupo (Flue Cured).

Esta variedad SPG 28 es un progenitor común tanto para la variedad COLTABACO 1 - A, que es un tabaco negro tipo García, como para las variedades hermanas TRC 1 - 96 y TRC 2 - 99 tipo Flue Cured, de las cuales está más cercana por ser el mismo tipo de tabaco. El SPG 28 fue progenitor femenino donante fundamentalmente de rendimiento, y aportó en el proceso de mejoramiento los altos niveles de resistencia a las enfermedades causadas por *Alternaria pos alternata* y *Meloidogyne incognita*. Para el caso de la variedad COLTABACO 1 - A, el SPG 28 fue el progenitor masculino del primer cruce, donante de resistencia a *Alternaria pos alternata*, *Phytophthora parasítica* variedad *nicotianae*, *Ralstonia solanacearum* y *Meloidogyne incognita*; en la misma figura se aprecia que hay relación con su descendiente COLTABACO 1 - A, pero que a la vez tiene las mayores diferencias genéticas con el grupo de los tabacos negros tipo García, lo que se refleja principalmente en la parte física y química de las plantas.

En la parte superior del mismo dendrograma, en el grupo de los tabacos negros tipo García se hallan muy relacionadas las variedades Coltabaco

Figura 4. Dendrograma que ilustra las distancias genéticas entre las siete variedades de tabaco separando las de tipo Negro García y las variedades Flue Cured. Se observan diferencias entre las variedades por el polimorfismo generado por los nueve iniciadores. Dendrograma construido por el método UPGMA a partir de una matriz de similitud de Jaccard.

23 RM, ICAGUANE y COLTABACO 1 - A con un porcentaje de similitud del 52% (diferenciándose en 48%); así mismo, estas dos últimas guardan una semejanza del 61%. COLTABACO 1 - A se relaciona muy estrechamente con el progenitor ICAGUANE de quien se le incorpora la estructura de la planta y un alto porcentaje de la forma de la hoja. También se observa que estas dos variedades guardan relación con la variedad COLTABACO 23 RM tabaco negro, progenitor que actuó como madre y que fue donante de adaptabilidad, rendimiento y resistencia a TMV de la COLTABACO 1 - A.

Como se aprecia también en la figura 4, las variedades hermanas TRC 1 - 96 y TRC 2 - 99 son las que presentan los más altos porcentajes de similitud genética, del 87,2%, alcanzándose a diferenciar sólo en un 12,8%. Están tan estrechamente relacionadas porque tienen los mismos progenitores, proceden del mismo cultivo de anteras, pero fueron desde el inicio seleccionadas como líneas promisorias con algunas características diferentes; por tanto siguieron procesos de selección encaminados a objetivos diversos. Ambas variedades son resistentes al Virus Mosaico del Tabaco (TMV), moderadamente resistentes al hongo *Phytophthora parasítica* raza cero, tolerantes al hongo *Alternaria pos alternata*, y resistentes al nemátodo *Meloidogyne incognita* razas 1 y 3, pero difieren en sus características agronómicas, color de la hoja, producción, madurez técnica, período vegetativo y azúcares. Estas dos variedades también aparecen con alto porcentaje de similitud con la variedad progenitora NC 567, quien actuó como progenitor donante de la resistencia a TMV, que fue la característica principal que se deseaba incorporar. La variedad NC 567 (Virginia) tiene un 72,8% de similitud, se diferencia en 27,2%, siendo la más cercana a sus descendientes las variedades TRC 1 - 96 y TRC 2 - 99, y estando todas junto con la SPG 28 en el grupo de los tabacos Flue Cured.

Según los resultados y análisis anteriores, hemos encontrado marcadores RAPD diagnósticos para las variedades de tabaco en estudio, que al analizarse por el coeficiente de Jaccard y por el método UPGMA generan un dendrograma que muestra siete conglomerados de individuos correspondientes a las siete variedades: C23 RM, ICAGUANE, COLTABACO 1 - A, SPG 28, TRC 1 - 96, TRC 2 - 99 y la NC 567, y éstos a su vez, separados en dos grandes grupos: el de las variedades de tabaco negro tipo García y el de

las variedades de tabaco Flue Cured. Se ha obtenido un polimorfismo interespecífico importante con nueve iniciadores que generaron fragmentos polimórficos suficientes para identificar y definir las siete variedades como diferentes entre sí.

Los hallazgos en este estudio guardan mucha concordancia con los presentados por Coussirat (1993), quien con la técnica de RAPD obtuvo éxito en la identificación de híbridos somáticos obtenidos por la fusión de protoplastos de dos especies diferentes de *N. Tabacum*, y con sólo cuatro iniciadores lograron identificar huellas genéticas únicas para cada una de ellos, siendo además capaces de detectar variaciones de un solo par de bases del ADN genómico. En otro trabajo igualmente pudo llevarse a cabo la caracterización genética por RAPD de cuatro híbridos somáticos y de las especies progenitoras *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia*, determinándose los porcentajes de contribución de los progenitores (Pinto *et al.*, 1995). Yu y Tsai (1997) también pudieron demostrar que los ensayos RAPD son una técnica sensitiva para identificar relaciones filogenéticas a nivel interespecífico e intraespecífico en el género *Nicotiana*.

En este estudio se encontró que las variedades TRC 1 - 96 y TRC 2 - 99 son más altamente relacionadas entre sí por ser variedades hermanas descendientes de los mismos progenitores, del mismo cultivo de anteras y por ser haploides diploidizados (DH). Estos datos de alta similitud y bajos porcentajes de diferenciación genética son bastante coherentes con los reportes de Yi (1977), quien logró detectar pequeños polimorfismos presentes entre líneas DH recombinantes de tabaco, con la utilización de diez iniciadores RAPD de 1.500 evaluados.

A pesar de que se han podido establecer polimorfismos entre las siete variedades de tabaco, los porcentajes de similitud entre ellas son bastante altos; esto debido a que el tabaco es una especie que se reproduce por autopolinización, por lo que su variabilidad parece ser más baja que en las especies de polinización cruzada. Por lo anterior a veces es difícil detectar la variabilidad genética presente en las poblaciones de los tabacos de los tipos Flue Cured y Burley, ya que los programas de estándares mínimos internacionales exigen que los cultivares o variedades deban ser de una composición química muy similar, por lo que están contribuyendo aceleradamente a reducciones en la variación genética entre ellos.

Además, los tabacos americanos de ambas clases, Flue Cured y Burley, probablemente evolucionaron de una población común en los últimos 150 años (Wernsman, 1999).

La explicación anterior puede ser la razón para que los estudios realizados por Rossi *et al.*, (1999) generaran bandas RAPD poco polimórficas, que no proveyeron suficiente resolución para la identificación y clasificación de 19 variedades de tabaco, donde se involucraron 7 de Burley, 6 Flue Cured y 6 de tabaco Oriental, evaluadas con 220 iniciadores. Así mismo, dDel Piano y colaboradores (2000) en el análisis intraespecífico en *N. Tabacum*, utilizando sólo dos iniciadores, obtuvieron un bajo polimorfismo, y la mayoría de los fragmentos amplificados fueron monomórficos. Él considera que esta técnica puede ser inadecuada para identificación de variedades de tabaco, pero que sus resultados preliminares pueden cambiar evaluando otro grupo más amplio de iniciadores.

A diferencia de los anteriores estudios, en nuestro caso los RAPD - PCR fueron un método efectivo para hacer un barrido del genoma vegetal y detectar polimorfismo varietal en tabaco, por lo que se puede afirmar, como lo hace De Filippis (1996), que los marcadores RAPD pueden ser aplicados para identificar diferencias genéticas entre individuos a pesar de que es un método cualitativo más que cuantitativo y detecta solamente la presencia o ausencia de una secuencia de ADN en el genoma estudiado. Sin embargo, nos permitió establecer las relaciones filogenéticas entre los progenitores y las variedades de Coltabaco registradas como COLTABACO 1 - A, TRC 1 - 96 y TRC 2 - 99, estableciendo diferencias genéticas entre ellas. Por tanto podemos afirmar con toda certeza que las siete variedades son totalmente diferentes en su estructura genética.

Los anteriores resultados también permiten corroborar que la discriminación establecida a nivel molecular con los marcadores RAPD es evidenciada igualmente a nivel morfológico por las técnicas de caracterización morfoagronómica que ha utilizado Coltabaco en la descripción de las nuevas variedades a través del tiempo, lo cual permitirá la integración de las dos técnicas, pues la fenotípica permite el conocimiento morfológico de la variedad, y la molecular, su patrimonio genético. Además, esto le permite a la empresa afianzar sus derechos de obtentor de variedades vegetales.

CONCLUSIONES

Los marcadores RAPD permitieron encontrar la similitud y la variación genética entre los progenitores y las variedades estudiadas, confirmándose de esta manera que las producidas por Coltabaco mediante la técnica del cultivo de anteras *in vitro*, registradas como COLTABACO 1 - A. La TRC 1 - 96 y TRC 2 - 99 son completamente diferentes de sus progenitores genéticamente, como se evidencia igualmente a nivel morfológico por las técnicas de caracterización morfoagronómica que ha utilizado Coltabaco en la descripción de las nuevas variedades.

Para la empresa resulta de gran importancia la integración de las dos técnicas de caracterización de variedades, pues la fenotípica permite el conocimiento morfológico de la variedad, y la molecular, su patrimonio genético. Además, le permite a afianzar sus derechos de obtentor de variedades vegetales.

Esta herramienta molecular, con la utilización en un futuro de los AFLP y los microsatélites, podría tener utilidad en la identificación de marcadores moleculares asociados a características de resistencia a enfermedades presentes en las accesiones del banco de germoplasma de la compañía, y con ello contribuir al desarrollo ágil de nuevas variedades de tabaco. Posteriormente se podría implementar el secuenciamiento de fragmentos específicos y la construcción de iniciadores específicos que hagan más fácil la identificación de las variedades y el uso de genes asociados a características importantes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este trabajo desean agradecer muy especialmente a las directivas de la Compañía Colombiana de Tabaco - Coltabaco, y en especial al doctor Francisco Palacio, director del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico - C. I. D. T. de la Compañía por su invaluable apoyo. Al posgrado de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, seccional Medellín y al doctor Sergio Orduz, director de la Unidad de Biotecnología y Control Biológico de la Corporación para Investigaciones Biológicas - CIB, quien dio vía libre para el desarrollo de la investigación en su laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Clark, M. S. 1997. Plant Molecular Biology. A Laboratory Manual. Springer- Verlag Berlin Heidelberg. Alemania, 529 pp.
- Chandrashekhar, P., Joshi, H., Nguyen, T. 1993. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Analysis Based intervarietal Genetic Relationships among hexaploid Wheats. *Plant Science*. 93: 95-103.
- Colombo, C., Second, J., Charrier, A. 2000. Diversity within American Cassava Germoplasm Based on RAPD Markers. *Genetics and Molecular Biology*. 23 (1): 189-199.
- Colombo, C., Second, J., Losada, T. Charrier, A. 1998. Genetic Diversity Characterization of Cassava Cultivars (*Manihot esculenta* Crantz). 1. RAPD Markers. *Genetics and Molecular Biology*. 21 (1).
- Coussirat, J. C. 1993. Empreintes Génétiques du Tabac par RAPD. Utilisation de Marqueurs pour Identifier des Hybrides Somatiques entre *Nicotiana tabacum* et *Nicotiana rustica* L. Ann. Du Tabac - Seita - BERGERAC. Sect 2-25.
- Coussirat, J. C. 1994. Diversité Génétique et Identification Variétale de l'espèce *Nicotiana tabacum* par Marqueurs RAPD. Première Approche. Ann. Du Tabac -Seita- BERGERAC. Sect 2-26.
- Crisci, J. V. y López Armengol, M. F. 1983. Introducción a la teoría práctica de la taxonomía numérica. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C.
- Del Piano, L., Abet, M., Sorrentino, C., Acanfora, F., Cozzolino, E., Di muro, A. 2000. Genetic Variability in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana* Species as Revealed by RAPD Markers: 1. Development of the RAPD Procedure. *Tobacco Research* 19 (1): 1-15.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. A. 1983. Plant DNA Minipreparation: Versión II. Plant molecular. *Biology Reporter*. 1(14): 19-21.
- Demecke, T., Kawchut, L. M., Lynch, D. R. 1993. Identification of Potato Cultivars and Clonal Variants by RAPDs - DNA Analysis. *Am. Potato J.* 70: 561-570.
- Dweikat, I., Mackenzie, S., Levy, M., Ohm, H. 1993. Pedigree Assessment Using RAPD-DGGE in Cereal Crop Species. *Theor. Appl. Gene.* 85: 497-505.
- Fajardo, D., Angel, F., Grum, M., Thome, J., Lobo, M., Roca, W. M., Sánchez, I. 1998. Genetic Variation Analysis of the Genus *Passiflora* L. Using RAPD Markers. *Euphytica*. 101: 341-347.
- Filippis, L., Hoffman, E., Hampp, R. 1996. Identification of Somatic Hybrids of Tobacco Generated by Electrofusion and Culture of Protoplast using RAPD - PCR. *Plant Science*. 121: 39-46.
- García, E., Jamilena, M., Álvarez, J. I., Arnedo, T., Oliver, J. L., Lozano, R. 1998. Genetic Relationships Among Melón Breeding Lines Revealed by RAPD Markers and Agronomic Traits. *Theor. Appl. Genet.* 86: 878-885.
- Grandillo, S. and Tankley, S. D. 1996. Genetic Analysis of RFLPs, GATA Microsatellites and RAPDs in Cross Between *L. Esculentum* and *L. Pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 92: 957-965.
- Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology. *Molecular Ecology*. 1: 55-63.
- He, S., Ohm, H., Mackenzie, S. 1992. Detection of DNA Sequence Polymorphisms among Wheat Varieties. *Theor. Appl. Genet.* 84: 573-578.
- Hu, J., Quiroz, C. F. 1991. Identification of Broccoli and Cauliflower Cultivars with RAPD Markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505-511.
- Joshi, C. P., Nguyen, H. T. 1993. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Technique for Detection of Polymorphism Among Wild and Cultivated Tetraploid Wheat. *Genome*. 36: 602-609.

- Koller, B., Lehmann, A., McDermott, J. M., Gessler, C. 1993. Identification of Apple Cultivars using RAPD Markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901-904.
- Mulcahy, D. L., Cresti, M., Sansavini, S., Douglas, G. C., Linskens, H. F., Mulcahy, G. B., Vignani, R., Pancaldi, M. 1993. The Use of Random Amplified Polymorphic DNAs to Fingerprinting Apple Genotypes. *Sci. Hortic.* 54: 89-96.
- Phillips, G. C. and Collins, G. B. 1977. The Influence of Genotype and Environment on Haploid Plant Production from Anther Cultures of *Nicotiana tabacum*. *Tobacco Sci.* 21: 112-116.
- Orozco - Castillo, C., Chalmers, K. J., Waugh, R., Powell, W. 1994. Detection of Genetic Diversity and Selective Gene Introgression in Coffee using RAPD Markers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 934-940.
- Pinto, F., Chupeau, Y., Cabrera, V. 1995. Molecular Genetic Characterization of Plant Somatic Hybrids. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31:96-100.
- Ragot, M. and Hoisington, D. A. 1993. Molecular Markers for Plant Breeding: Comparison of RFLP and RAPD Genotyping Costs. *Theor. Appl. Genet.* 86: 975-984.
- Rohlf, F. J. 1998. Applied Biostatistics Inc. NTSYS cp 2.02j. <http://www.ExeterSoftware.com>.
- Rossi, L., Bindler, G., Pijnenburg, H., Gadani, F. 1999. Potential of Molecular Marker Analysis for the Assessment of Genetic Diversity in Tobacco Varieties. *Agro - Phytomeeting CORESTA*.
- Sagredo, B., Hinrichsen, P., López, H., Cubillos, A., Muñoz, C. 1998. Genetic Variation of Sweet Potatoes (*Ipomoea batatas* L.) Cultivated in Chile Determined by RAPDs. *Euphytica*. 101: 193-198.
- Staub, J. E., Serquen, F. C., Gupta, M. 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience*. 31(5): 729-741.
- Smith, J. S. and Smith, O. S. 1991. Restriction Fragment Length Polymorphisms can Differentiate Among U. S. Maize Hybrids. *Crop. Sci* Smith y Smith. 31: 893-899.
- Tinoco, J. D. y Fernández, G. A. 1995. Desarrollo y obtención de una variedad de tabaco Negro (*Nicotiana tabacum* L) tipo García a través del cultivo *in vitro* de anteras. Compañía Colombiana de Tabaco. 28 pp.
- Tinoco, J. D. y Fernández, G. A. 1999. TRC 1-96 Nueva variedad de tabaco Virginia a través del cultivo *in vitro* de anteras. Compañía Colombiana de Tabaco. 20 pp.
- Wachira, F. N., Waugh, R., Hackett, C. A., Powell, W. 1995. Detection of Genetic Diversity in Tea (*Camellia sinensis*) Using RAPD Markers. *Genoma*. 38: 201-210.
- Wernsman, E. A. 1999. An Overview of Tobacco Breeding - Past, Present and Future. TSRC, September 1 -15 pp.
- Wilde, J., Waugh, R., Powell, W. 1992. Genetic Fingerprinting of Theobroma Clones Using Randomly Amplified Polymorphic Markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 871-877.
- Wilkie, S. E., Isaac, P. G., Slater, R. J. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Genetic Analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497-504.
- Yang, X. and Quiroz, C. 1993. Identification and Clasification of Celery Cultivars with RAPD Markers. *Theor. Appl. Genet.* 86: 205-212.
- Yi, Y. H. 1997. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Cultivated Tobacco (*Nicotiana tabacum*, L.) Ph.D diss. Dep. Crop Science, North Carolina State University, Raleigh.
- Yu, Y-L., Tsai, Y-L. 1997. Construction of Phylogenetic Tree for *Nicotiana* Species Based on RAPD Markers. *J. Plant Res.* 110: 187-193.