

5.3 Variabilidad genética en medios hermanos de cinco ecotipos de mora de Castilla.

Utilizando cuatro cebadores RAMs se pudo estimar la variabilidad genética en cinco progenies de medios hermanos de los ocho ecotipos evaluados de mora de Castilla. En todos los ecotipos se encontró tanto variabilidad genética como plantas con el mismo patrón de bandas (igual genotipo).

El número de bandas generadas estuvo entre 57 y 49. Las polimórficas entre 16 y 34 (Tabla 8). Estos resultados concuerdan con los registrados en mora de Castilla por Marulanda y Márquez (2001) (45 bandas- 38 polimórficas) y Morillo *et al.* (2005) (58 bandas-34 polimórficas).

Las bandas polimórficas encontradas se debe a la variabilidad genética dentro de los medios hermanos de los cinco ecotipos debido a su tendencia a la reproducción sexual (46 a 88 % de sacos sexuales y viabilidades polínicas entre 80 y 99%). Esto concuerda con los resultados de Kollman *et al.* (2000) quienes, encontraron variabilidad genética en familias de las moras apomícticas europeas *R. armeniacos* y *R. bifrons*, que producen entre 14 y 17% de hijos sexuales.

El porcentaje de loci polimórfico estuvo entre 32,6 y 57,9% (Tabla 9) para todos los medios hermanos evaluados. Aunque estos se consideran bajos, son más altos que los reportados por Kollman *et al.* (2000), entre 14,3 y 7,6%. Resultados similares encontraron Morillo *et al.* (2005) en la caracterización molecular de la colección de materiales de mora de Castilla, quienes registraron 26 y 66%.

La heterocigocidad encontrada, entre 0,10 y 0,25 (Tabla 9) concuerda con los resultados de Morillo *et al.* (2005) entre 0,14 y 0,25. Esta heterocigocidad evidencia la segregación que hubo en los medios hermanos, debida a la condición heterocigota de los ecotipos y a su predominante polinización cruzada.

Tabla 7. Número de bandas comunes y polimórficas de progenies de mora de Castilla. NI=número de bandas iguales, NP= número de bandas polimórficas.

Cebador	Ranchona		Abrazos		Castilla		Trujillo		Guática	
	Juntas				Juntas		espinas			
	NI	NP	NI	NP	NI	NP	NI	NP	NI	NP
AG	10	3	9	1	7	2	6	8	8	9
CCA	6	10	10	4	8	4	6	5	6	10
TG	5	8	6	5	9	6	7	5	4	8
CA	12	0	8	6	9	6	4	9	5	7
Total	33	21	33	16	33	18	23	27	23	34

Tabla 8. Parámetros genéticos de progenies de mora de Castilla, generados de cuatro cebadores RAMs y calculados con el programa F-Statistics de TFPGA.

Material	Heterocigocidad insesgada	% loci polimórfico
Ranchona Juntas	0.15	38.9
Abrazos	0.10	32.6
Castilla Juntas	0.13	35.3
Trujillo espinas	0.22	54
Guática	0.25	57.9

Los ecotipos Guática y Trujillo espinas, tuvieron las progenies con mayores variabilidades genéticas (porcentaje de loci polimórfico y heterocigocidad mas altos, Tabla 9), posiblemente sean los que más plasticidad tengan para cruzarse con los demás ecotipos al dejarse a libre polinización. Abrazos y Castilla Juntas tuvieron las progenies con más baja variabilidad genética y poca plasticidad reproductiva.

5.3.1 Agrupamientos genéticos de los medios hermanos

Con el paquete estadístico NTSYS se construyeron dendrogramas de cada ecotipo para observar agrupamientos genéticos de los medios hermanos.

Ecotipo Ranchona Juntas

El análisis mediante el coeficiente de Nei- Li (1979), a un índice de similaridad de 0.94, diferenció los medios hermanos en cuatro grupos. Uno grande con seis hermanos con el mismo genotipo y uno con diferente genotipo, dos grupos con tres hermanos con igual genotipo y un grupo con un solo individuo (Figura 20)

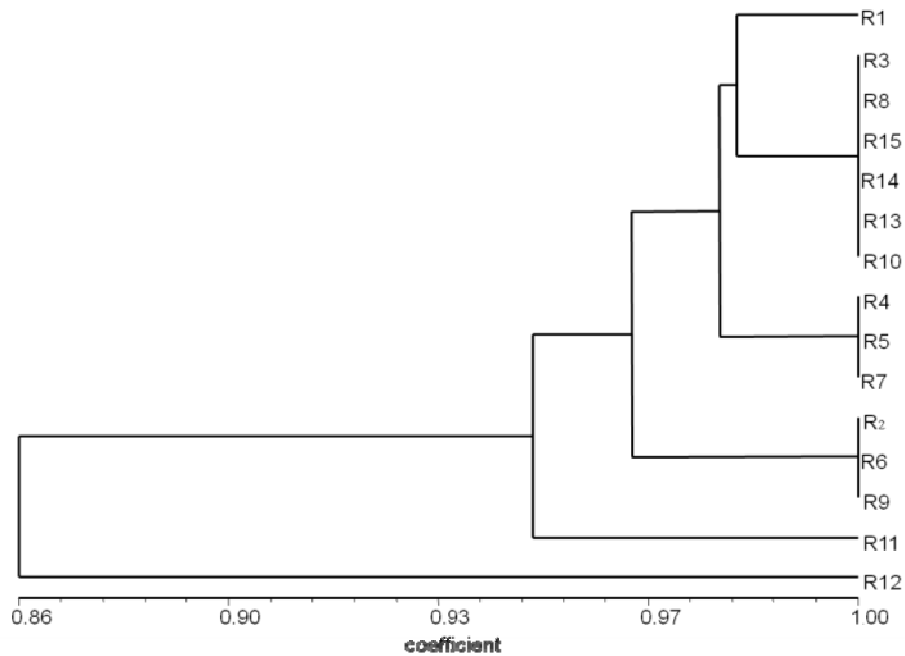


Figura 20. Árbol de la estructura genética de medios hermanos de Ranchona Juntas basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li, calculado de cuatro cebadores RAMs con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SHAN y TREE de NTSYS versión 2.0

Ranchona Juntas fue el segundo ecotipo con la sexualidad más alta (83% de sacos embrionarios sexuales). Aunque se evidenció la mayoría de hermanos con igual genotipo, se diferenciaron claramente cuatro grupos, indicando alguna variabilidad genética.

La baja heterocigocidad y porcentaje de loci polimórfico (0,15 y 38,9%), indican que este ecotipo tiende poco grado de heterocigocis haciéndolo estable y por eso la poca variabilidad genética en sus progenies, también puede tener poca plasticidad genética que no le permite tener fácilmente cruzamientos a libre polinización.

Ecotipo Abrazos

A un índice de similaridad de 0.97 se formaron dos grupos grandes uno de ellos con dos subgrupos y cuatro hermanos con igual genotipo y en el otro con dos subgrupos y dos hermanos con igual genotipo (Figura 21).

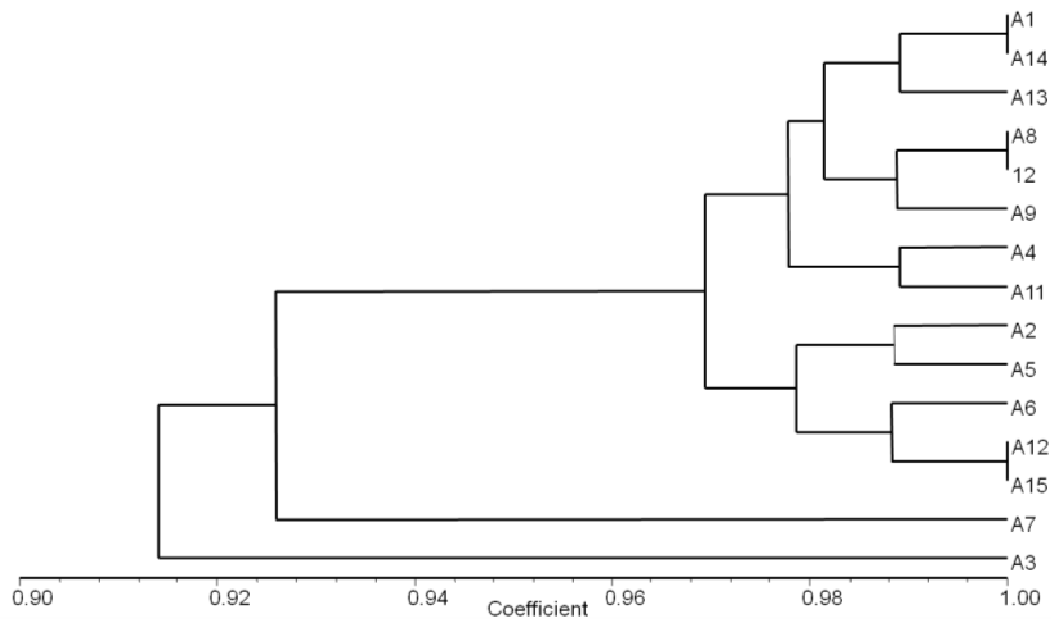


Figura 21. Árbol de la distancia genética de medios hermanos de Abrazos basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li, calculado de cuatro cebadores RAMs con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SHAN y TREE de NTSYS versión 2.0

Aunque se formaron subgrupos todos los hermanos tienen similitudes entre 0,97 y 1% indicando la variabilidad más baja de todas las ecotipos. La heterocigocidad y loci polimórfico de 0,10 y 32,6%, indican que este ecotipo tiene alto grado de homocigocis y sea estable por lo tanto sus progenies tengan poca variabilidad genética. Abrazos tuvo casi la mitad de sacos apomicticos y la otra mitad de sexuales (46,6 y 53,4%) y esto también influyo en la baja variabilidad. Estos resultados concuerdan con los de Kolleman *et al.* (2000), quienes encontraron variabilidad genética dentro de progenies de moras apomícticas facultativas.

Ecotipo Castilla Juntas

A un índice de similaridad de 0.94 se formaron tres grupos, uno grande con cuatro subgrupos y tres individuos con igual genotipo, otro con dos individuos y el último con un individuo (Figura 22).

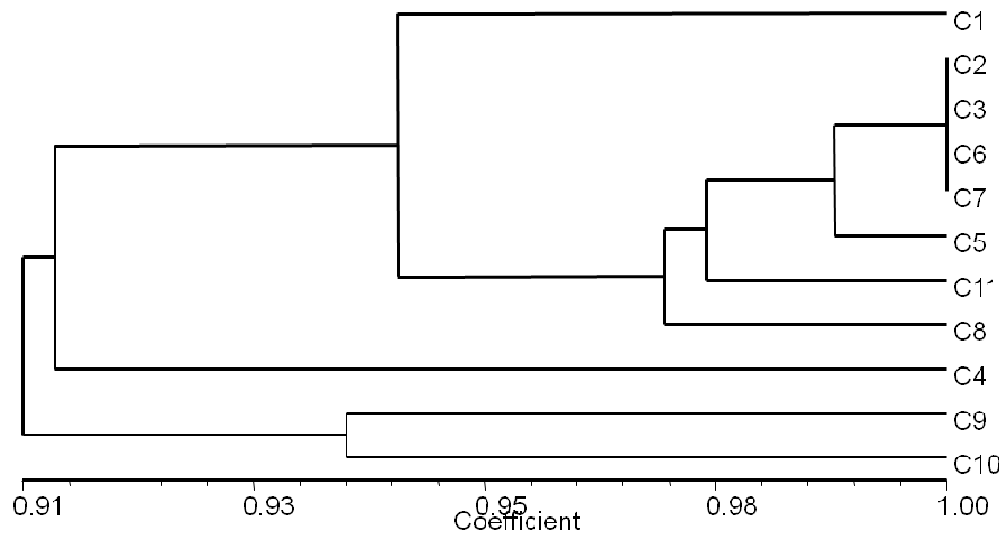


Figura 22. Árbol de la estructura genética de medios hermanos de Castilla Juntas basado en el coeficiente de Nei-Li, calculado de cuatro cebadores RAMs con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SHAN y TREE de NTSYS versión 2.0

El agrupamiento evidenció la variabilidad genética en los medios hermanos, aunque baja, fue mayor que la registrada en Abrazos. Castilla Juntas tuvo solo 11,75% de sacos apomicticos. Posiblemente este ecotipo tenga poca plasticidad reproductiva para cruzarse fácilmente. La baja heterocigocidad de 0,13, indica que este tiene considerable grado de homocigosis y por eso sus progenies tienen poca variabilidad genética, pese a tener mayor porcentaje de sacos sexuales (78,75%).

Ecotipo Guática

A un índice de similitud de 0.87 se formaron tres grupos un gran grupo con cinco subgrupos y dos individuos con igual genotipo, un grupo con dos subgrupos y el otro con un individuo (Figura 23).

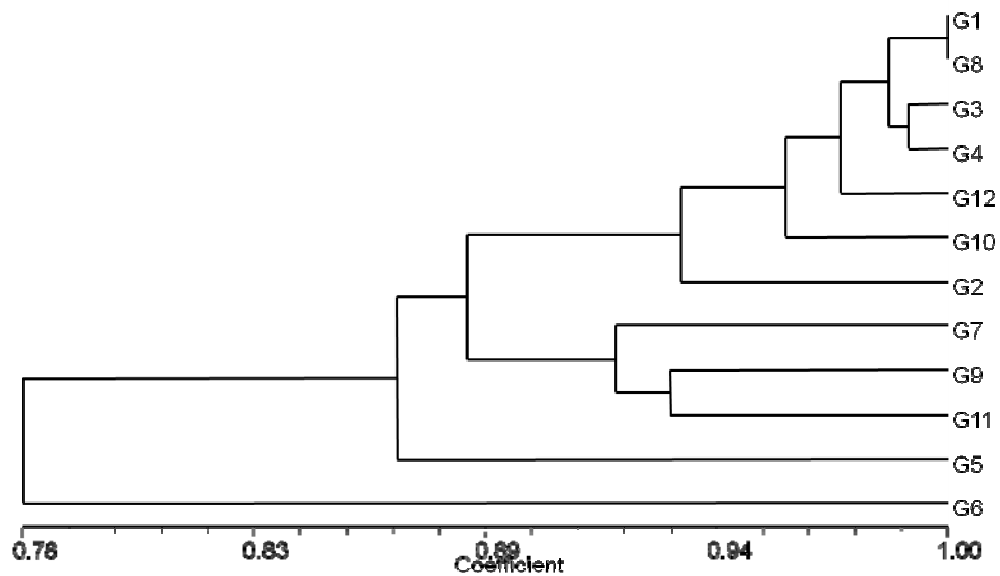


Figura 23 Arbol de la estructura genética de medios hermanos de Guática basado en el coeficiente de Nei-Li, calculado de cuatro cebadores RAMs con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SHAN y TREE de NTSYS versión 2.0

Guática tuvo más sacos apomicticos que sexuales (52,5 y 46,25%), a pesar de esto, los medios hermanos presentaron agrupamientos, indicando variabilidad genética. La heterocigocidad y porcentaje de loci polimórfico (0,25 y 57,9%) indican que este ecotipo tiene alto grado de heterocigocis y este aporta a la segregación en sus progenies. Además la plasticidad reproductiva le permite cruzarse fácilmente y por su condición de facultativo tener progenies con variabilidad genética producto de la reproducción sexual. Antonius y Nybom (1995), mencionan que cuando hay cruzamientos entre moras apomícticas facultativas se tiende a formar hijos sexuales y perder el carácter apomíctico. Kollman *et al.* (2000), encontraron variabilidad genética en hijos de *R. armeniacus* y *R. bifrons*, moras con porcentajes de apomixis mayores que el de Guática.

Ecotipo Trujillo sin espinas

A un índice de similaridad de 0.86 se formaron cinco grupos, cada uno con subgrupos. Uno grande presentó dos individuos con igual genotipo.

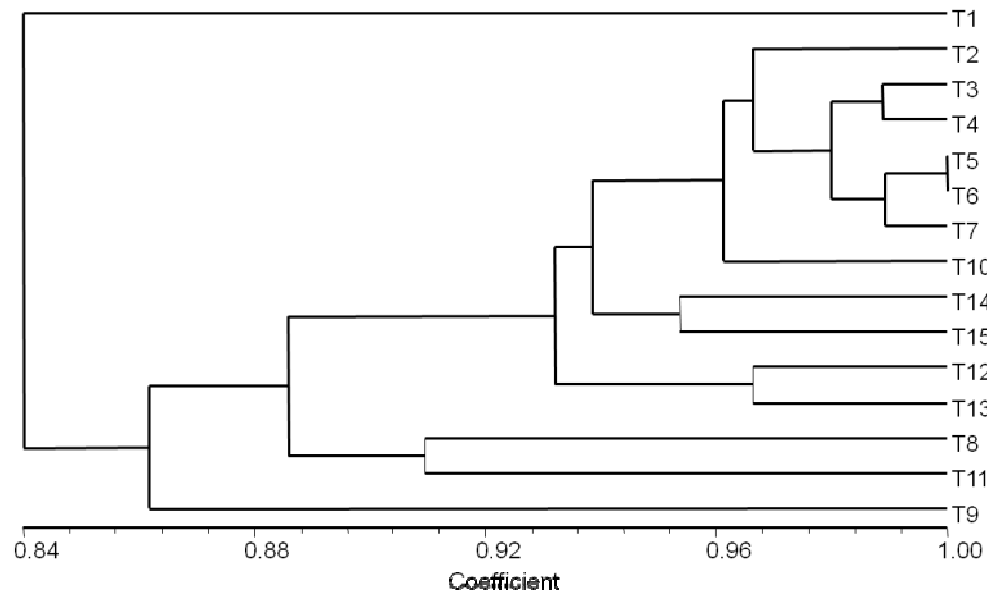


Figura 24 Árbol de la estructura genética de medios hermanos de Trujillo con espinas basado en el coeficiente de Nei-Li, calculado de cuatro cebadores RAMs con el método de clasificación UPGMA, usando los programas SHAN y TREE de NTSYS versión 2.0

La formación de pocos individuos con igual genotipo, solo dos y la variabilidad encontrada en el agrupamiento de Trujillo espinas puede explicarse por: presentar poca apomixis (8,75%) y la más alta sexualidad (88,75%), la heterocigocidad de 0,22 indica que tiene grado de heterocigocis y la plasticidad reproductiva para cruzarse fácilmente a libre polinización.

El análisis de agrupamiento evidenció la variabilidad encontrada en todos los ecotipos y la segregación existente en los medios hermanos. En todos los ecotipos se encontraron individuos con igual genotipo y formación de grupos genéticos. Hay ecotipos con mayor variabilidad genética en las progenies de medios hermanos, posiblemente al grado de heterocigocidad y al porcentaje de polinización cruzada que tenga cada uno.

El análisis de distancia genética para estimar la variabilidad genética entre medios hermanos mostró altas similitudes entre 76 y 84% (Tabla 10) confirmando la plasticidad de la mora de Castilla que le permite tener cruzamientos fácilmente y su alto grado de polinización cruzada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kollman *et al.* (2000), quienes registraron similitudes de 0,86 entre medios hermanos de *R. armeniacos* y *R. bifrons*.

Las altas similitudes de Trujillo espinas con los demás ecotipos (Tabla 10) y su alta sexualidad y viabilidad polínica indican que puede usarse como macho en cruces con los más apomicticos.

Tabla 9. Similitudes entre medios hermanos de mora de Castilla. R=Ranchona Juntas, A=Abrazos, C=Castilla Juntas, T=Trujillo espinas, G=Guática

	A	C	G	T
R	0,82	0,81	0,81	0,80
A		0,83	0,81	0,84
C			0,77	0,84
G				0,84

Dado el amplio cubrimiento del genoma que tiene los marcadores RAMs, se puede asegurar la segregación existente en los ecotipos de mora de Castilla evaluados y evidenciar la polinización cruzada. Además, la baja variabilidad y los individuos con igual genotipo concuerdan con la apomixis facultativa, con predominancia de la sexualidad.

Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas para evaluar variabilidad genética en progenies de moras apomícticas usando marcadores dominantes, como AFLPs y RAPDs. Amsellem *et al.* (2001) reportaron que con estos marcadores se pudo discriminar variabilidad y uniformidad genética en medios hermanos de individuos de *R. alceifolius*. Kolleman *et al.* (2000) también usando AFLPs encontraron baja variabilidad genética entre y dentro de familias de *R. armeniacos* y *R. bifrons*. Werlemark y Nybom (2003) evaluaron progenies de cruces interespecíficos de *R. hartmanni*, *R. sprengelii*, *R. infestus*, *R. vestitus*, *R. laciniatus* y *R. polyanthemus*, usando marcadores RAPDs pudieron discriminar las plantas derivadas de la polinización y de ovarios apomicticos.