

TECNICAS PARA EL MANEJO Y USO DE RECURSOS GENETICOS VEGETALES



EDITORES: RAUL CASTILLO, JAIME ESTRELLA Y CESAR TAPIA

USO DE MARCADORES MOLECULARES (RFLPs) EN CARACTERIZACION DE GERMOPLASMA

Oswaldo Chicaiza

Programa de Cereales, Estación Experimental Santa Catalina - INIAP
Casilla 340, Quito-Ecuador

INTRODUCCION

Diversidad genética es todo material (silvestre y/o cultivado) utilizado por los mejoradores de plantas para obtener nuevos cultivares; la distribución de la diversidad genética presente en un determinado cultivo es el resultado de un proceso de evolución ocurrido ya sea por mutaciones, selección, migración, deriva genética antes y/o después de la domesticación.

Cualquier información relacionada con la organización y distribución de esta diversidad genética facilitará el proceso de mejoramiento de un determinado cultivo. Los tipos de caracteres utilizados para caracterizar la diversidad genética son numerosos. Tradicionalmente se ha utilizado las variaciones morfológicas relacionadas especialmente con el hábito de crecimiento, tamaño, forma y color de la semilla. Esta variación es mayor en las formas cultivadas que en las formas silvestres, como lo demuestran estudios realizados en girasol (Ashri, 1973); arroz (Jawahar y Panwar, 1970); y, trigo (Jain *et al.*, 1975).

Ultimamente se han introducido algunos métodos para la caracterización de la diversidad genética, tales como: a) marcadores moleculares de las proteínas de la semilla (seed storage proteins) en trigo (Johnson, 1972); soya (Hymowitz y Kaizuma, 1979; 1981); fréjol (Gepts y Bliss, 1986); b) Isoenzimas en tomate (Rick y Fobes, 1975); arroz (Second, 1982); maíz (Smith *et al.*, 1984); y c) RFLPs (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) en arveja (Palmer *et al.*, 1985); *Brassica* spp. (Palmer *et al.*, 1983; Erickson *et al.*, 1983). etc.

La ventaja de los marcadores moleculares es que ellos reflejan la constitución genotípica y como consecuencia proporcionan un mejor entendimiento de la verdadera relación genética entre genotipos. El objetivo de este artículo es explicar en términos sencillos el uso de los marcadores RFLPs para la caracterización de germoplasma.

Uso marcadores moleculares (RFLPs)

MARCADORES RFLPs

La información genética de las plantas superiores se encuentra almacenada en la secuencia del ADN de los cromosomas nucleares y los genomas de los organelos. Las plantas son capaces de replicar su ADN con mucha rapidez y exactitud, pero durante este proceso pueden ocurrir cambios en el ADN como resultado de inversiones, translocaciones y transposiciones. Debido a la gran cantidad de ADN presente en las células de las plantas superiores, es casi imposible encontrar dos organismos con una misma secuencia de ADN.

La variación natural en la secuencia de ADN puede ser detectada en varias formas. Una de ellas es utilizando una clase especial de enzimas llamadas enzimas de restricción. Estas son nucleasas producidas por una variedad de microorganismos y que tienen la habilidad de reconocer sitios llamados de restricción, los cuales están conformados por una secuencia específica en el ADN. Si la secuencia de bases está presente en el ADN, la enzima de restricción cortará el ADN en el sitio requerido. Por tanto, un segmento de ADN será reducido a una serie de fragmentos pequeños de tamaño definido como resultado de la digestión con una enzima de restricción.

El número de fragmentos y tamaño de cada uno refleja la distribución de los sitios de restricción en el ADN. Los fragmentos producidos serán por tanto específicos para cada combinación de ADN y para la enzima de restricción utilizada. Dichos fragmentos pueden ser utilizados como una huella digital específica para un determinado ADN o para el organismo que contiene ese ADN.

Pequeñas estructuras de ADN, tales como el ADN de los cloroplastos, producen cerca de 40 fragmentos de restricción cuando son digeridos con una enzima de restricción determinada tal como EcoRI. Los fragmentos de restricción producidos por digestión del ADN purificado pueden ser separados de acuerdo al tamaño, mediante el método conocido como electroforesis, después de la digestión con una enzima de restricción. Luego de tñirse con ethidium bromide, el patrón de restricción puede ser directamente observado o fotografiado en luz ultravioleta. El ADN que difiere del patrón en secuencia de bases, o ha sido alterado en la secuencia de bases por efecto de inserciones, pérdidas o inversiones, producirá fragmentos de diferente tamaño. Tales diferencias en tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión con enzimas digestivas del

Uso marcadores moleculares (RFLPs)

ADN son conocidos como fragmentos de restricción (RFLPs) y pueden ser usados como una medida de la variabilidad genética.

Muchos estudios han utilizado RFLPs de ADN de los cloroplastos para estudios de filogenia y sistemática en varios grupos de plantas. Estos estudios han mostrado que el análisis de variación a nivel de RFLPs es muy útil para revelar relaciones genéticas y sistemáticas en plantas. Los análisis de RFLPs también pueden ser aplicados a ADN cromosómicos aun cuando es más complicado debido a la complejidad del ADN nuclear. La digestión del ADN nuclear de plantas superiores con una enzima de restricción específica produce millones de discretos fragmentos de ADN en un rango continuo de tamaños. Si el ADN digerido es sujeto a electroforesis y luego teñido con ethidium bromide, los fragmentos no pueden ser visualizados, siendo necesario el uso de técnicas más complejas como las pruebas de ADN clonado y ADN híbrido.

EL ADN PRUEBA

Debido a que los RFLPs del ADN nuclear no pueden ser visualizados directamente, es necesario utilizar pequeños segmentos de ADN cromosómico como pruebas para detectar fragmentos de restricción individuales. Por la alta especificidad del ADN-ADN híbrido, estas pruebas pueden detectar fragmentos de restricción individuales dentro de una compleja mezcla de fragmentos de ADN nuclear. Para utilizar esta técnica es necesario preparar fragmentos de ADN cromosómico que son utilizados como pruebas. Este set de pruebas es conocido como *library*, término que significa biblioteca en inglés, y que por extensión se refiere a un conjunto de diversos ADN. El ADN aislado de las especies de interés es digerido con una enzima de restricción, y fragmentos relativamente pequeños (generalmente 2-5 kb) son utilizados como pruebas de ADN híbrido. Aún cuando los fragmentos de restricción individuales pueden ser utilizados como prueba, es necesario disponer de copias originales de estos fragmentos. Puesto que es difícil aislar directamente los fragmentos en forma individual, es necesario utilizar la técnica de clonación de genes y la habilidad de una bacteria (*Escherichia coli*) para realizar la replicación exacta del ADN. Con esta técnica, fragmentos de restricción individuales son ligados al plásmido de la bacteria, y luego transformados dentro de una célula de la bacteria. La bacteria replica el plásmido mientras ésta crece y se divide. Cultivando la bacteria transformada y luego

Uso marcadores moleculares (RFLPs)

aislando el plásmido, se obtiene una buena cantidad de fragmentos de restricción individuales, los cuales pueden ser utilizados para pruebas posteriores. La bacteria que lleva el fragmento de restricción puede ser mantenida por largo tiempo y ser utilizada las veces que sean necesarias.

USO DEL ADN PRUEBA

La detección de RFLPs en el ADN nuclear se realiza de la siguiente forma: los ADN de las plantas que van a ser comparados para ver la diferencia de RFLPs, son aislados y digeridos con una enzima de restricción y luego fraccionada sobre un gel de agarosa. Como consecuencia de ello, el ADN se encuentra en forma de millones de fragmentos de acuerdo al peso molecular. Para utilizar el complejo ADN-ADN híbrido con el objeto de detectar fragmentos individuales, tanto el ADN prueba como el ADN en el gel deben ser divididos en los filamentos simples de su estructura helicoidal original, lo cual se consigue humedeciendo el gel con una base (NaOH). Para facilitar la hibridación, el ADN es transferido a una membrana filtro mediante un procedimiento llamado "Southern blot", el mismo que se basa en el uso de una serie de papeles secantes. Puesto que el filtro está en contacto directo con el gel, el patrón del fragmento de restricción en el gel es mantenido sobre el filtro, el cual puede ser utilizado para experimentos de hibridación. Después de que el filtro es preparado mediante la técnica de "Southern blot", éste puede ser probado con uno de los ADN pruebas. Esta prueba consiste en hibridar el ADN prueba con el filtro conteniendo ADN nuclear. Bajo condiciones apropiadas de temperatura y concentración de sal, la prueba hibridará a cualquier fragmento de restricción homólogo presente sobre el filtro. La prueba identificada con fósforo radioactivo es hibridada con el ADN filtro, el cual está listo para la autorradiografía, la misma que permitirá detectar los fragmentos de restricción a los cuales ha sido hibridada la prueba. De esta forma se puede detectar individualmente los fragmentos de restricción dentro de una preparación compleja de ADN.

PROPIEDADES DE LOS MARCADORES MOLECULARES (RFLPs)

La gran utilidad de los marcadores moleculares tales como los RFLPs se debe a que éstos poseen características que les distingue de los marcadores morfológicos; así:

Uso marcadores moleculares (RFLPs)

1. Los genotipos de los marcadores moleculares pueden ser determinados a nivel de toda la planta, tejido o célula, mientras que los fenotipos de los marcadores morfológicos solo pueden ser distinguidos en un determinado estado de desarrollo de la planta; por ejemplo, genes para el color de la flor solo pueden ser identificados cuando las plantas han florecido.
2. En el caso de los marcadores morfológicos es muy difícil depender de la variación natural, siendo necesario producir variantes mediante el uso de mutantes. Por otro lado, los marcadores moleculares (RFLPs) utilizan la abundante variación natural presente en la secuencia del ADN y por tanto no requieren del uso de mutantes.
3. Los alelos de muchos marcadores moleculares son codominantes, permitiendo distinguir todos los genotipos posibles en cualquier generación segregante. Los alelos en los marcadores morfológicos generalmente interaccionan en una forma de dominancia y recesividad. Las mutaciones de muchos genes son recesivos, los mismos que pueden ser identificados solo en plantas homocigóticas para el gene mutante; este mismo gene no puede ser identificado en plantas heterocigóticas, puesto que éstas se confunden con las plantas homocigóticas dominantes.
4. Los efectos epistáticos limitan el número de marcadores morfológicos que segregan en una determinada generación, pero en el caso de los marcadores moleculares este efecto epistático no existe, facilitando la identificación de un gran número de marcadores moleculares en una sola población y en una sola generación segregante.
5. Con los marcadores morfológicos la expresión del genotipo depende de la expresión del gene, la misma que es influenciada por el medio ambiente. Los marcadores moleculares no son afectados por el medio ambiente por cuanto no dependen en la expresión del gene, sino que simplemente representan la presencia o ausencia de una determinada secuencia de bases en el ADN.

Uso marcadores moleculares (RFLPs)

CONCLUSIONES

Es evidente que los marcadores moleculares (RFLPs) pueden ser utilizados directamente como pruebas para detectar la presencia o ausencia de ciertos segmentos de cromosomas. Por tanto tienen muchas aplicaciones en Genética Vegetal, Biología Molecular y Fitomejoramiento.

BIBLIOGRAFIA

- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67: 35-43.
- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica.* 35: 111-124.
- Ericksen, L.R., N.A. Strauss and W.D. Beverdorf. 1983. Restriction patterns reveal origins of chloroplast genomes in *Brassica* amphiploides. *Theor. Appl. Genet.* 65: 201-206.
- Evola, S.V., Burr, F.A. and Burr, B. 1986. The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor. Appd. Genet.* 71: 765-771.
- Gepts, P. and F.A. Bliss. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40: 469-478.
- Hymowitz, T. and N. Kaizumo. 1981. Soy bean seed protein electrophoresis profiles from 15 Asian countries or regions: hypothesis on paths of dissemination of soy bean from China. *Econ. Bot.* 35: 10-23.
- Jain, S.K., C.O. Qualset, G.M. Bhatt and K.K. Wu. 1975. Geographic patterns of phenotypic diversity in a world collection of durum wheats. *Crop Sci.* 15: 700-704.
- Jawahar, R. and D.V.S. Panwar. 1970. Introspecific divergence in rice. *Ind. J. Garret. Plant Breed.* 30: 1-10.

Uso marcadores moleculares (RFLPs)

- Johnson, B.L.** 1972. Seed protein profiles and the origin of hexaploid wheat *Amer. J. Bot.* 59:952-960.
- Osborn, T.C., Alexander, D.C. and Fobes, J.F.** 1987. Identification of restriction fragment length polymorphisms linked to genes controlling soluble solids content in tomato fruit. *Theor. Appl. Genet.* 73: 350-356.
- Palmer, J.A., R.A. Jorgensen, W.F. Thompson.** 1985. Chloroplast DNA variation an evolution in *Pisum*: patterns of change and phylogenetic analysis. *Genetics.* 109: 195-213.
- Rick, C.M. and J.F. Fobes.** 1975. Allozyme variation in the tomato and closely related species. *Bull. Torrey Bot. Club.* 102: 376-384.
- Smith, J.S.C., M.M. Goodman and C.W. Stuber.** 1984. Variation within teosinte. III. Numerical analysis of allozyme data. *Econ. Bot.* 38: 97-113.
- Tanksley, S.D.** 1983. Molecular markers in Plant Breeding. *Plant Molecular Biology Report* . 1: 3-8.