

DIFERENCIACIÓN DE DOS LÍNEAS DE TOMATE Y SU HÍBRIDO CON MARCADORES MOLECULARES

DIFFERENTIATION OF TWO TOMATO LINES AND THEIR HYBRID WITH MOLECULAR MARKERS

Carlos Sánchez-Abarca^{1*}, Ernestina Valadez-Moctezuma², Aquiles Carballo Carballo¹ y Fernando Castillo Gonzalez¹

^{1*} Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Correo electrónico: saac69@hotmail.com ² Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230. Chapingo, Edo. de México. Tel y Fax: 01-595-952-1642.

* Autor responsable

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular, de la Universidad Autónoma Chapingo, durante el año de 1996, con el propósito de establecer diferencias y similitudes genómicas de dos líneas de *Lycopersicon esculentum* Mill. (13-Nar de hábito indeterminado y THE-309 de hábito determinado) y el híbrido resultante de la cruce de ambas, mediante la técnica RAPD. Un total de 101 bandas de ADN que se obtuvieron con seis iniciadores aleatorios de la serie G de Operon, fueron analizadas en el programa NTSYS pc2, con el coeficiente de similaridad genética de agrupamiento simple. El dendrograma respectivo se realizó con el método de agrupamiento UPGMA. Las huellas de ADN generadas con los RAPDs permitieron diferenciar claramente entre y dentro de las poblaciones analizadas.

Palabras clave: *L. esculentum* Mill., descripción varietal, RAPDs, PCR.

SUMMARY

This work was done at the Molecular Biology Laboratory of the Universidad Autónoma Chapingo, during 1996. The main objective was to find genomic similarities and differences among two lines of *Lycopersicon esculentum* Mill. (13-Nar indetermined habit, and THE-309 determined habit), and their hybrid, by means of RAPDs markers. A total of 101 DNA bands were obtained with six random primers of the G Operon kit. These bands were analyzed with the pc2 NTSYS program, using the genetic similarities simple group coefficient. The dendrogram was done with the UPGMA cluster method. The DNA fingerprints allowed a clear differentiation among and within genotypes.

Index words: *L. esculentum*, varietal description, RAPDs, PCR.

INTRODUCCIÓN

La agricultura moderna involucra la aplicación de los adelantos científicos para la generación de variedades o híbridos con alto potencial de rendimiento y calidad, y de la tecnología adecuada en la producción de semillas. Los procesos incluidos son el mejoramiento genético para la creación, validación y liberación de nuevas variedades y la producción, beneficio, almacenaje, análisis de calidad y certificación de semillas (Feistritz, 1975).

La obtención de variedades requiere de una adecuada caracterización para asegurar su identidad genética durante el proceso de la multiplicación de semilla y así poder optar por el registro legal con propósitos de protección y certificación. Esta caracterización comúnmente se realiza con base en descriptores fenotípicos y estructuras reproductivas en una muestra representativa de la población, la cual puede verse afectada si no se consideran los efectos ambientales y la interacción genotipo-ambiente.

En las últimas dos décadas se han utilizado con éxito herramientas moleculares para el análisis del ADN con el objetivo de caracterizar y distinguir entre especies, razas, variedades, cultivares e individuos (Arus *et al.*, 1982; Bassini, 1976; Stegemann, 1984; Valadez y Kahl 2000). Una de esas herramientas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite sintetizar (amplificar) *in vitro* y de manera exponencial fragmentos aleatorios o específicos de ADN a partir de un genoma que sirve como molde (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990; Valadez y Kahl, 2000). La tecnología de la PCR ha revolucionado la genética, ya que ha permitido identificar, clonar, modificar y estudiar genes de diferentes organismos (Watson *et al.*, 1992). También ha dado lugar a avances importantes en la detección fina de microorganismos patógenos, estudio de ADN de especímenes arqueológicos, detección de mutaciones involucradas en la transmisión de enfermedades, estudios de paternidad, localización de genes, elaboración de árboles filogenéticos, taxonomía molecular y para estudios de la expresión genética (Lenstra, 1995; Von Eggeling y Spielvogel, 1995; Winter y Kahl, 1995; Valadez *et al.*, 2001).

Una de las técnicas para detectar marcadores moleculares basada en la PCR es la de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que se distingue de otras porque utiliza iniciadores con secuencia de bases arbitrarias para la amplificación, lo que implica que pueden parearse químicamente en cualquier región donde encuentren complementariedad; la probabilidad de que la amplificación ocurra es bastante alta, ya que normalmente los iniciadores son secuencias de 10 bases (Roux, 1995). Los polimorfismos de ADN detectados de esta manera se

comportan como marcadores dominantes y se heredan en forma mendeliana se pueden generar en cualquier especie y los datos que proporcionan pueden utilizarse para estudios de diversidad genética y para caracterización genómica (Williams *et al.*, 1990; Welsh *et al.*, 1991; Caetano-Anollés *et al.*, 1991).

En especies vegetales y animales, los RAPDs se han utilizado con diferentes objetivos; por ejemplo, para la detección de híbridos y para la construcción de mapas de ligamiento genético (que es uno de sus principales usos, debido a que proporcionan mayor cantidad de información que los RFLPs), además de la facilidad y rapidez para aplicar la técnica (Xu *et al.*, 1993; Valadez y Kahl, 2000). En tomate (*L. esculentum* Mill.) y algunos genotipos silvestres, los RAPD han permitido estimar su diversidad genética (Williams y St. Claire, 1993). Paran *et al.* (1995) demostraron que los marcadores RAPD se pueden usar para determinar la pureza y la identidad de híbridos de tomate provenientes de diversas genealogías. Bogani *et al.* (1996) emplearon este tipo de marcadores para encontrar variación somaclonal en clones de tomate obtenidos por cultivo de tejidos. Asimismo, Foolad y Chen (1998) utilizaron RAPD para identificar QTLs asociados con la tolerancia a sales durante la germinación de semillas de tomate. Se han realizado también otros trabajos con objetivos similares por Klein *et al.* (1991), Majid *et al.* (1993) y Ohmori *et al.* (1996).

En México, el tomate es una de las especies de mayor importancia para el consumo y exportación; se ubica entre las primeras cuatro hortalizas, con alrededor de 72 000 ha con una producción de 2.3 millones de toneladas (Productores de Hortalizas, 2000); también es la especie que genera más divisas por exportación (INEGI, 1999).

Estas cualidades del cultivo justifican los esfuerzos necesarios para desarrollar o adaptar técnicas que permitan caracterizar los genotipos que se utilicen en los procesos de mejoramiento genético, u otras aplicaciones relacionadas a la generación de variedades comerciales o con fines de protección legal. El objetivo del presente trabajo fue establecer las diferencias y similitudes de dos líneas de tomate y su híbrido, mediante las huellas genómicas detectadas por la técnica de RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se consideraron 10 plantas de cada línea de tomate desarrolladas en condiciones de invernadero; la línea uno (13-17 Nar) de hábito de crecimiento indeterminado, la línea dos (THE-309) de hábito determinado, y el híbrido resultante que tiene hábito de crecimiento indeterminado. El ADN se extrajo de acuerdo con

Dellaporta *et al.* (1983) y se trató con ARNasa (10 mg mL⁻¹) para eliminar los ARNs que se obtienen simultáneamente durante el proceso. Finalmente, el ADN se re-suspendió en una solución de amortiguador tris-EDTA a pH 8 (Tris-HCl 10 mM a pH 8, EDTA 1 mM).

Previo a la aplicación de la técnica, se estandarizaron las condiciones para la reacción de la PCR, habiéndose determinado que 40 ng de ADN de tomate y una unidad de *Taq* ADN polimerasa (Perkin Elmer) eran concentraciones óptimas para obtener huellas reproducibles y nítidas. El resto de los reactivos (dNTPs, MgCl₂, amortiguador para *Taq* ADN polimerasa e iniciadores, se utilizaron de acuerdo con las sugerencias del fabricante.

Los RAPDs se realizaron por duplicado con seis iniciadores de la serie G de la Compañía Operon (Cuadro 1). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total 25 µL que contenían 21 µL de solución madre (Cuadro 2) y 40 ng de ADN genómico (10 ng µL⁻¹). En todos los casos se incluyó un testigo negativo en el que se sustituyó el ADN por agua bidestilada y otro con ADN de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) que se utilizó como grupo no relacionado (comparador). Finalmente, cada tubo se cubrió con 25 µL de aceite mineral ultrapuro para evitar la evaporación durante la amplificación. Para la PCR se utilizó un termociclador modelo DNA Thermal cycler 480 de Perkin Elmer con el siguiente programa: 1 ciclo a 94 °C 1 min, 38 ciclos [94 °C 30 s; 35 °C 30 s; 72 °C 90 s] y 1 ciclo de extensión final a 72 °C durante 2 min 30 s. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa (SIGMA, Tipo I-A) a 1.2 % y después de la electroforesis el ADN se tiñó en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) durante 20 min y se destiñó con agua destilada durante 10 min; posteriormente se documentó con el equipo Kodak Digital Science 1D 2.0, mismo que se usó para la detección de bandas de ADN, cuya sensibilidad permite detectar bandas que no aparecen a simple vista. En todos los geles se incluyó el marcador de peso molecular de 1 kb (Gibco BRL).

El análisis estadístico de la información obtenida se realizó con el coeficiente de agrupamiento simple (Sokal y Sneath, 1963), y el dendrograma se construyó con el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages); para ambos casos se utilizó el programa NTSYSpc 2.0 (Rohlf, 1997).

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores aleatorios de la serie G de Operon que se utilizaron para generar los marcadores RAPD.

Código	5' → 3'
OPG-04	AGCGTGTCTG
OPG-07	GAACCTGCGG
OPG-10	AGGGCCGTCT
OPG-11	TGCCCGTCGT
OPG-16	AGCGTCCTCC
OPG-19	GTCAGGGCAA

Cuadro 2. Componentes de la mezcla de reacción (solución madre) sin ADN genómico.

6.1 µL	agua bidestilada
10.0 µL	dNTP's (200 µM de cada uno), Gibco BRL
2.0 µL	amortiguador para <i>Taq</i> ADN polimerasa (1X final), Perkin Elmer
2.5 µL	MgCl ₂ (2 mM final), Gibco BRL
0.2 µL	Iniciador, Operon
0.2 µL	<i>Taq</i> ADN polimerasa 5 U µL ⁻¹ (Perkin- Elmer)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran, en orden descendente, los perfiles RAPD de las líneas progenitoras y del híbrido de tomate con los iniciadores OPG-07 y OPG-19. Cada gel contiene dos repeticiones de las reacciones de PCR. Nótese que el patrón de bandas del ADN dentro de sus respectivas repeticiones es igual, lo que demuestra la reproducibilidad bajo las condiciones en que se llevó a cabo la investigación. El patrón de bandas del garbanzo (carril g panel C), no coincide con las bandas de los genotipos de tomate, lo cual muestra la falta de relación con esta especie. La amplificación con los otros iniciadores (imágenes no mostradas) también produjo patrones de bandas reproducibles nítidas, pero obviamente diferentes porque cada iniciador reconoce distintas zonas del genoma.

Con base en la presencia o ausencia de bandas de ADN de un determinado peso molecular, se conformó una matriz binaria en donde el dígito "1" representa presencia y el "0" ausencia de esa banda particular. El número de bandas de ADN obtenidas con cada iniciador fue variable, incluyendo el testigo (garbanzo); para OPG-10 se obtuvieron 17 bandas; con OPG-11, 4 bandas; OPG-16, 14 bandas; OPG-04, 13 bandas; con OPG-19, 21 bandas y con OPG-07, 32 bandas. Los pesos moleculares considerados variaron desde 350 hasta 3890 pb. La matriz de datos moleculares se conformó con un total de 101 bandas y 31 genotipos (10 de cada muestra de tomate y uno de garbanzo).

El dendrograma de la Figura 2 muestra la separación de cuatro grupos con un coeficiente de similitud de 0.64 aproximadamente, que corresponden a las dos líneas progenitoras (grupos A y C), al híbrido (grupo B) y al garbanzo (grupo D). El híbrido se ubica más cerca de la línea 1 con un coeficiente aproximado de 0.63. Esta cercanía posiblemente responde a que comparten algunas caracterís-

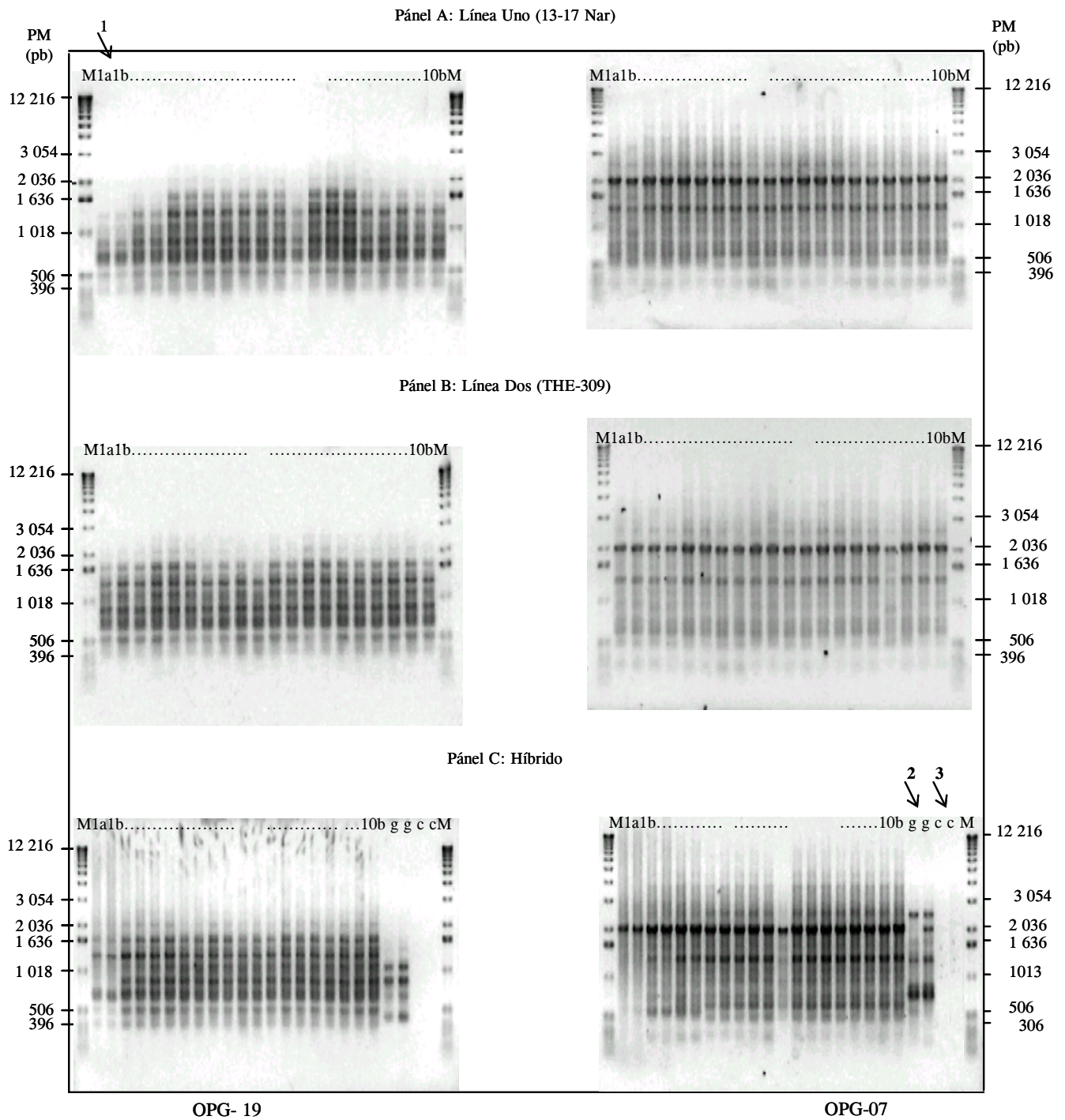
ticas fenotípicas; por ejemplo, ambas son de hábito de crecimiento indeterminado en contraste con la línea 2 que es de crecimiento determinado; por otro lado, la línea 1 y el híbrido son de fruto más redondo que la línea 2 cuyo fruto es más ovoide. Lo anterior se menciona sólo como referencia, sin que por ello se infiera que los datos moleculares estén asociados con el hábito de crecimiento o con el tipo de fruto de estos genotipos. Con un coeficiente cercano a 1.0, se puede apreciar que algunos genotipos que conforman los grupos de tomate no fueron diferenciados individualmente por los RAPD; por ejemplo, en el grupo A los genotipos denotados como P1, P3, P4 y P7; P5 y P6; P8, P9 y P10 a su vez formaron subgrupos, lo que indica similitud entre los que permanecieron juntos.

En el híbrido la similitud entre los individuos se aprecia al interior de los subgrupos conformados con HP2, HP9, HP6, HP8, HP5, HP3 y HP4, HP10 y HP7. En la línea 2 prácticamente todos los genotipos fueron iguales, con excepción de L2P1. Esta diferenciación sugiere que las líneas de tomate no son completamente homocigóticas. Lo anterior concuerda con Paran *et al.* (1995) y Bogani *et al.* (1996), quienes reportaron que los RAPDs ayudan a demostrar la pureza e identificación de híbridos de origen diferente y la presencia de variación somaclonal. Otra de las ventajas de utilizar datos moleculares es la posibilidad de establecer relaciones de parentesco entre los genotipos, sin necesidad de observaciones fenotípicas en campo (Paran *et al.*, 1995; Winter y Kahl, 1995)

Es importante hacer notar que en el híbrido se observaron algunas bandas que no se detectaron en los progenitores con los iniciadores OPG-4, OPG-7 y OPG-19. Es posible suponer que el origen de éstas se debe a amplificaciones inespecíficas ocasionadas por apareamiento incompleto de esos iniciadores, ya que el genoma de los híbridos puede presentar cambios en las secuencias de bases en algunas zonas, ocasionadas por la recombinación genética del genoma de los progenitores.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los marcadores RAPD pueden apoyar en forma directa la identificación de líneas de *L. esculentum* Mill. Sin embargo, no es posible generalizar que con esta técnica también se tenga éxito en otras especies vegetales, ya que en algunos casos no es posible detectar fácilmente polimorfismos, sobre todo en especies endogámicas. Lo anterior implica que para diferenciación varietal o individual con fines legales, es conveniente evaluar otro tipo de marcadores que proporcionen más información.



1/ 1a, 1b a 10b son las plantas por genotipo con dos repeticiones (a y b) respectivamente.

2/ g ADN de garbanzo con dos repeticiones.

3/ C control sin ADN genómico con dos repeticiones.

M Marcador de peso molecular

Figura 1. Productos de amplificación de tres genotipos de tomate, con los iniciadores OPG-07 y OPG-19.

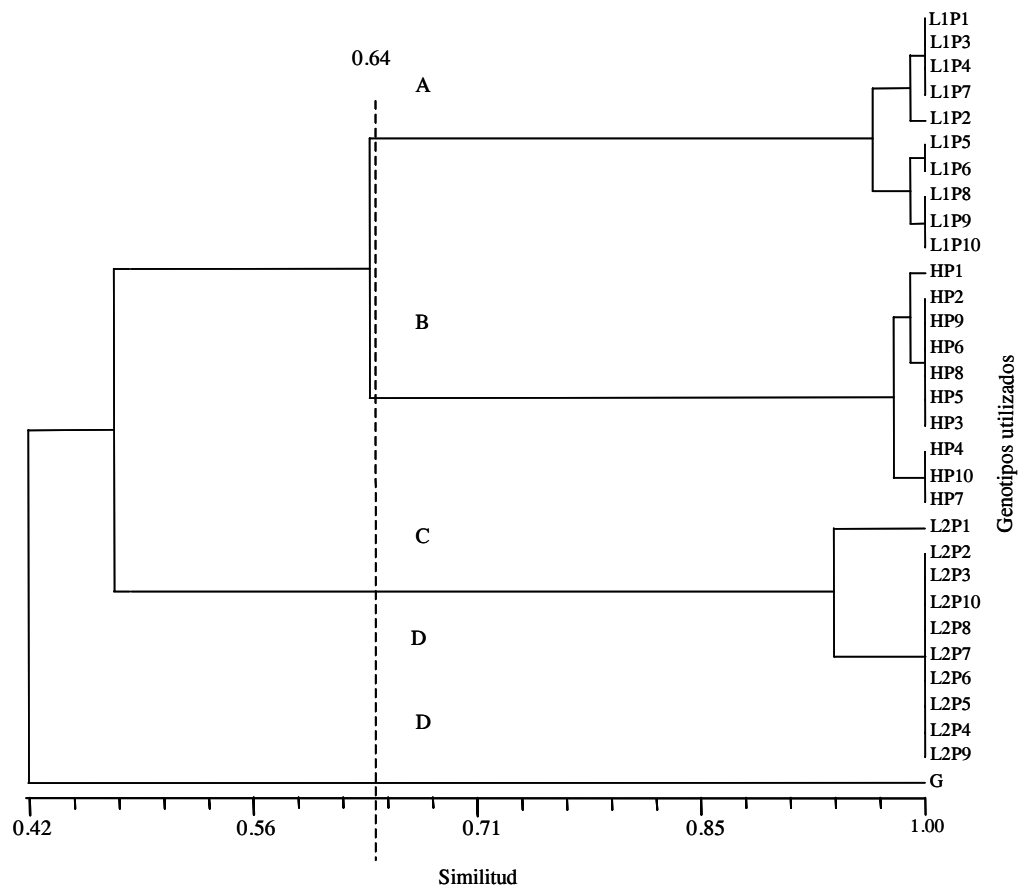


Figura 2. Agrupamiento UPGMA de las líneas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill y El híbrido conformado con seis iniciadores. L1P1 a L1P10 representan a los individuos de la Línea uno (13-67 Nar); L2P1 a L2P10 a los individuos de la línea dos (THE-309) y HP1 a HP10 a los de híbrido. G corresponde al genotipo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) incluido en el análisis como grupo comparador.

BIBLIOGRAFÍA

- Arus P, S D Tansley, T J Orton, R A Jones (1982) Electrophoretic variation as tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 31:417-429.
- Bassini A (1976) Barley cultivar identification by use of isoenzyme electrophoretic patterns. *Can. J. Plant Sci.* 56:1-6.
- Bogani P, A Simoni, P Lio, A Scialpi, M Buiatti (1996) Genome flux in tomato cell clones cultured *in vitro* in different physiological equilibria. II. A RAPD analysis of variability. *Genome* 39:846-853.
- Caetano-Anollés G, B J Bassam, P M Gresshoff (1991) High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* 9:553-557.
- Dellaporta S L, J Wood, J B Hicks (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Feistrizer W P (1975) The role of seed technology for agricultural development. *Seed Sci. Technol.* 3:415-420.
- Foolad M R, F Q Chen (1998) RAPD markers associated with salt tolerance in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii*). *Plant Cell Rep.* 17:306-312
- INEGI (1999) Banco de Información Económica. Grupo de trabajo. SHCP- Banco de México-INEGI.
- Klein-Lankhorst R M, A Vermunt, R Weide, T Linarska, P Zabel (1991) Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83:108-114.
- Lenstra J A (1995) The applications of the polymerase chain reaction in the life sciences. *Cel. Molec. Biol.* 41(5):603-614.
- Majid R F, R A Jones, R L Rodriguez (1993) RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetics maps. *Plant Cell Rep.* 12:293-247.
- Ohmori T, M Murata, F Motoyoshi (1996) Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 92:151-156.
- Paran I, M Horowitz, D Zamir, S Wolf (1995) Random amplified polymorphic DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. *HortScience* 30(2):377.
- Productores de Hortalizas (2000) Tomate, Guía de Bolsillo. Revista de publicación mensual. Año 9, No. 7. México, D.F. 26 p.
- Rohlf F J (1997) NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.00. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. 31 p.
- Roux K H (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. *Manual Supplement. PCR Methods and Applications* 4:185-194.
- Sokal R R, A P H Sneath (1963) Principles of Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Co. Francisco, USA. 359 p.
- Stegemann H (1984) Retrospect on 25 years of cultivar identification by protein patterns and prospects for the future. *Seed Sci. Technol.* 15:20-31.

- Valadez M E, G Kahl (2000)** Huellas de DNA en Genomas de Plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundi-Prensa. Mexico, D. F. 147 p.
- Valadez-Moctezuma E, G Kahl, J Ramser, B Hüttel, A Rubluo-Islas (2001)** Técnicas para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. Rev. Fitotec. Mex. 24 (1): 103-120.
- Von E, H Spielvogel (1995)** Applications of random PCR. Cellular Molec. Biol. 41(5):653-670.
- Watson D J, M Gimán, J Witkowski, M Zoller (1992)** Recombinant DNA. Second ed. Scientific American Books. U.S.A. 625 p.
- Welsh J, M McClelland (1990)** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18:7213-7218.
- Welsh J, R J Honeycutt, M McClelland, B W S Sobral (1991)** Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82:473-476.
- Williams J G K, A E Kubelik, K J Levak, S C Tingey (1990)** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18:6531-6535.
- Williams C E, D A St Clair (1993)** Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. Genome 36:619-630.
- Winter R, G Kahl (1995)** Molecular marker technologies for plant improvement. World J. Microbio. Biotech. 11: 438-448.
- Xu Y, M S Clark, E Pehu (1993)** Use of RAPD markers to screen somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Plant Cell Rep. 12:107-109.