

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE GENOMAS VEGETALES (GARBANZO) Y ALGUNAS APLICACIONES POTENCIALES

SOME MOLECULAR TECHNIQUES TO CHARACTERIZE PLANT GENOMES (CHICKPEA) AND THEIR POTENTIAL APPLICATIONS

Ernestina Valadez-Moctezuma^{1*}, Günter Kahl, Juliane Ramser², Bruno Hüttel² y ³Abraham Rubluo-Islas

^{1*} Universidad Autónoma Chapingo, Depto. de Fitotecnia, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Chapingo, Estado de México. Tel y Fax: (01) 5952-1642. E-mail: evaladez@taurus1.chapingo.mx. ² Universidad Johann Wolfgang Goethe, Departamento de Biología Molecular de Plantas, Frankfurt am Main, Alemania. Tel. (69) 7982-9266. E-mail: kahl@em.uni-frankfurt.de. ³ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Circuito Interior, Cd. Universitaria, C.P. 04510 México, D.F. Tel. (01)5622-9048. E-mail: arubluo@ibunam.ibiologia.unam.mx

RESUMEN

La clasificación taxonómica de organismos generalmente involucra el análisis de sus características morfológicas. Sin embargo, los taxónomos tienen serios problemas al tratar de ubicar adecuadamente a individuos que perteneciendo a la misma especie, subespecie, variedad, línea, etc., presentan el mismo fenotipo. El fitomejorador necesita conocer sus plantas desde el punto de vista genético para incorporar eficientemente en sus programas a las que posean el mejor potencial; tal selección puede dificultarse si las plantas son fenotípicamente indistinguibles. Por lo general, los investigadores cruzan individuos sobresalientes y seleccionan las progenies, lo que les permite, a largo plazo, conformar variedades o líneas endogámicas. Este proceso es costoso económicamente y tardado. Con la finalidad de facilitar la apropiada selección de plantas, en la década pasada se desarrollaron técnicas moleculares que permiten conocer de manera inequívoca el perfil específico del ADN para establecer una tipificación única y confiable, referida como "huellas de ADN", así como la detección de marcadores asociados a diferentes aspectos tales como, resistencia a patógenos, a estrés o a rendimiento, entre otros. Por otro lado, estas técnicas también han permitido elaborar mapas genéticos en menor tiempo y conducir programas de mejoramiento genético más eficientes. El objetivo de este trabajo es describir algunas de estas técnicas utilizadas para tipificar genomas vegetales, e ilustrar con resultados propios aquéllas que son particularmente eficientes en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.).

Palabras clave adicionales: *Cicer arietinum* L., ADN, PCR, RFLP, RAPD, AMP-PCR, MP-PCR, AFLP, RAMPO, fitomejoramiento, fenotipo, genotipo.

SUMMARY

The taxonomic classification of organisms generally involves the analysis of their morphologic characteristics. However, taxonomists have serious problems trying to locate, in a suitable manner, individuals who belong to the same species, subspecies, variety, accession, etc., with identical phenotypes. The breeder needs to identify his plants from a genetic point of view, in order to incorporate

efficiently in his programs, those who possess the best potential; such selection may become difficult if plants are phenotypically indistinct. Researchers usually cross outstanding individuals and select the offspring, which allows them, in a long term, to make endogamic varieties. This process is very expensive and very slow. In order to facilitate the appropriate plant selection, during the past decade, molecular techniques were developed to determine with precision the specific DNA profile, which allows to establish a unique and trustable typification called "DNA fingerprints", and the detection of markers that are related to different aspects such as pathogen or stress resistance, or yield, among others. On the other hand, these techniques have also granted two things: the elaboration of genetic maps in a lesser time, and the making of more efficient programs in the genetic breeding. The purpose of this work is to describe some of these techniques, normally used to typify plant genomes, and show with its own results those who are particularly efficient for the chickpea (*Cicer arietinum* L.).

Additional index words: *Cicer arietinum* L., DNA, PCR, RFLP, RAPD, AMP-PCR, MP-PCR, AFLP, RAMPO, plant breeding, phenotype, genotype.

INTRODUCCIÓN

En el fitomejoramiento, la identificación y selección de plantas superiores, se ha llevado a cabo con la idea de desarrollar variedades que tengan características favorables; sin embargo, para lograr este objetivo se requiere bastante tiempo cuando se aplican esquemas tradicionales de mejoramiento.

En algunas ocasiones, el investigador inicia con la selección y cruzamiento dentro y entre especies (cultivadas o silvestres) que presenten caracteres deseables, teniendo como meta obtener una población híbrida, para después seleccionar plantas genética o fenotípicamente

deseadas. Este tipo de selección basada sólo en el aspecto externo suele proporcionar datos que pueden ser erróneos y variables, debido a que el fenotipo está parcialmente determinado por la información genética del individuo e influido por el ambiente en el que se desarrolle. La selección, por tanto, se vuelve difícil y para lograr el éxito el investigador puede necesitar retrocruzadas consecutivas para fijar las características y hacer numerosas evaluaciones en ambientes diferentes, lo que encarece la investigación.

Considerando los problemas anteriores, desde hace algunas décadas se han desarrollado estrategias que permiten detectar diferencias más finas entre las plantas, respecto a las detectadas solamente con descripciones morfológicas. Estas estrategias han sido bioquímicas, como es el caso de las isoenzimas o proteínas de reserva; y más recientemente, sobre todo en la década de los noventa, se han descrito técnicas para diferenciar de manera directa el material genético de los individuos a través de patrones de bandas provenientes del ADN, conocidas como "huellas genómicas o huellas de ADN". En un símil, estos patrones de bandas corresponderían por ejemplo, a los códigos de barras que identifican a los productos comerciales o las huellas dactilares de humanos, lo que hace posible una tipificación genética precisa y única del organismo en estudio (Phillips y Vasil, 1994).

Las tecnologías para analizar genomas se han agrupado convencionalmente en tres categorías: la primera de ellas está basada en hibridación molecular en donde se requieren sondas específicas marcadas, como es el caso de los **RFLP** (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms, por sus siglas en inglés) y los **VNTRs** (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats) como los **mini** o **microsatélites**; la segunda se basa en la tecnología de la **PCR** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, por sus siglas en inglés), tales como los **DAF** (**D**N **A**mplification **F**ingerprinting), **RAPD** (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**N **A**), **MP-PCR** (**M**icrosatellite **P**rimed-**P**CR), **AMP-PCR** (**A**nchored **M**icrosatellite **P**rimed-**P**CR), entre otros; y la tercer categoría corresponde a huellas generadas por la combinación en diferente medida de las dos primeras, como es el caso de **RAMPO** y **AFLP** (**R**andom **A**mplified **M**icrosatellite **P**olymorphisms y **A**mplification **F**ragment **L**ength **P**olymorphisms, por sus siglas en inglés respectivamente) (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997).

Esta variedad de técnicas ha mostrado ser de gran utilidad en diferentes áreas del conocimiento; por ejemplo, en taxonomía para la ubicación adecuada de organismos de dudosa identidad; en medicina para la detec-

ción de enfermedades congénitas y diagnóstico de otras tales como el SIDA; en problemas jurídicos para el caso de pruebas de paternidad y en medicina forense. En la agronomía, su utilización ha repercutido de manera notable favoreciendo principalmente programas de fitomejoramiento; por ejemplo, en la selección de plantas apoyada por marcadores genéticos, elaboración de mapas genéticos, identificación de genes específicos de resistencia en plantas, caracterización genómica con fines de registro de variedades comerciales u obtención de derechos de patentes.

Específicamente en el fitomejoramiento, la selección de plantas apoyada con marcadores genéticos ha sido la más utilizada, debido a que permite identificarlas desde estados tempranos de su desarrollo. Esta identificación se lleva a cabo mediante la búsqueda de alguna huella o huellas asociadas a un carácter agronómico específico de interés para el investigador. La selección en estas condiciones reduce notablemente el tiempo para obtener las plantas que presenten el óptimo potencial genético, sin necesidad de esperar a su madurez y evaluar en ambientes diferentes. El estudio y la ubicación de estos marcadores de ADN en los cromosomas de los organismos en estudio, facilita la elaboración de mapas genéticos más completos y en menos tiempo, como ha sido el caso del maíz (*Zea mays* L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y trigo (*Triticum aestivum*) (Winter y Kahl, 1995; Valadez y Kahl, 2000)

Otra aplicación que recientemente han tenido los marcadores genéticos, ha sido para la identificación de genes de virulencia en poblaciones de fitopatógenos y en el estudio de cambios evolutivos drásticos que pueden presentarse en las poblaciones de estos microorganismos. Este último se ha estudiado en el hongo *Ascochyta rabiei* causante de la "rabia" en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en lugares como Siria, España, Turquía, India y África, principalmente, donde el cultivo es básico para la alimentación y la rabia es un problema severo que no ha sido posible controlar con pesticidas. Al respecto, los científicos han aportado datos que tratan de explicar la causa de la resistencia que ofrece este patógeno, indicando que debido a la presión de selección ocasionada por los diferentes agroquímicos que se utilizan para su control en el campo, su tasa de mutación se incrementa en poco tiempo, por lo que esta estrategia de control no es del todo funcional para este caso (Kaemmer *et al.*, 1992). En México se está efectuando un estudio similar con el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* que afecta drásticamente a cultivares mexicanos de garbanzo apoyado con técnicas moleculares. En dicho estudio se pretende, en primer lugar, identificar y ubicar las posibles

razas del patógeno que ocurren en las zonas garbanceras del país; en segundo lugar, estimar la variabilidad genética de éstas e intentar asociar dicha variabilidad con la virulencia del mismo; y en tercer lugar, seleccionar los genotipos disponibles en el germoplasma nacional más resistentes a las razas detectadas.

MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES

La información que distingue a los organismos está contenida en sus genes y éstos se encuentran distribuidos en los cromosomas. Los genes son secuencias específicas de bases nitrogenadas que cuando se expresan, determinan el desarrollo y características particulares del individuo. Esta expresión está mediada por la formación de *novo* de una molécula de ARN mensajero que se traduce en una molécula de proteína.

Básicamente se han descrito dos grupos de proteínas que son codificadas por el genoma: las estructurales y las que tienen actividad reguladora, estas últimas son esenciales para controlar los procesos metabólicos en la célula. La producción organizada de proteínas y metabolitos da lugar a la diferenciación de ciertos tipos de células y a propiedades particulares de un organismo.

Todas las diferencias genéticas que se pueden apreciar entre los individuos son ocasionadas por cambios en su ADN; estos cambios pueden demostrarse en dos maneras: analizando directamente esta macromolécula o bien, analizando sus productos genéticos en la célula; es decir, cambios en las proteínas, enzimas, metabolitos o características fenotípicas. Tanto el ADN como sus productos, pueden utilizarse como marcadores o indicadores con el propósito de identificar una cierta propiedad en el individuo. Cuando se utiliza el término de marcador genético-molecular, normalmente se hace referencia a un marcador encontrado en el ADN; es decir, a una banda definida, obtenida a través de alguna técnica particular asociada o correlacionada a una característica específica (por ejemplo agronómica). Pero cuando se cita a un marcador bioquímico, se refiere a una proteína o enzima asociada a un fenotipo particular (De Loose y Gheysen, 1995). Estos marcadores pueden obtenerse con metodologías tales como las que a continuación se describen.

Isoenzimas (polimorfismo de proteínas)

Las isoenzimas son formas múltiples de una enzima que cataliza la misma reacción y que difieren en su estructura primaria, sus propiedades fisicoquímicas y su regulación. Estas moléculas pueden consistir de varias

cadena polipeptídicas en combinaciones aleatorias; por ejemplo, la isoenzima lactato deshidrogenasa, presenta tetrámeros de la cadena polipeptídica A y B en cinco diferentes combinaciones: AAAA, AAAB, AABB, ABBB y BBBB. Se ha observado que la concentración relativa de las isoenzimas en las células, tejidos u órganos está determinada por las proporciones relativas de los polipéptidos sintetizados A y B, que a su vez dependen de las proporciones relativas de la expresión de los genes estructurales A y B (Kahl, 1995).

Las isoenzimas pueden detectarse después de separarlas unas de otras con métodos bioquímicos convencionales; por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico, punto isoeléctrico o electroforesis en geles de poliacrilamida o almidón. Muchos trabajos se han reportado al respecto, en los cuales los investigadores utilizan extractos totales de proteínas obtenidos de células o tejidos del organismo en estudio. Después de la electroforesis respectiva, el gel se mantiene en contacto con un sustrato cromogénico (específico para la enzima a detectar) y posteriormente, se podrá observar una banda coloreada que indica la actividad de la enzima y la localización de ésta en el gel. En algunas ocasiones se pueden observar diferentes bandas en un mismo carril, lo que hace referencia a la presencia de más de una isoenzima en el organismo analizado.

Esta metodología es confiable y fácil de realizar, por lo que se ha utilizado para hacer caracterizaciones bioquímicas, e incluso hasta inferencias genéticas de plantas; sin embargo, su uso se ha limitado, en primer lugar porque su reproducibilidad depende del estado de desarrollo y de las condiciones de los tejidos utilizados para el análisis; y en segundo lugar, porque sólo es posible detectar una cantidad reducida de polimorfismos.

Polimorfismo del ADN

Actualmente, para realizar análisis genéticos se prefiere recurrir al polimorfismo presente en el ADN en vez de las isoenzimas. Esta decisión tiene que ver con dos aspectos principales: primero, porque estos polimorfismos son mucho más abundantes, ya que se encuentran distribuidos por todo el genoma; es decir, tanto en el ADN codificante como en el no codificante (que en algunas plantas llega a ser hasta de 95%); y en segundo lugar, porque su presencia no es afectada por condiciones ambientales o su expresión estar limitada a ciertos tejidos (como el caso de las isoenzimas).

Los polimorfismos en el ADN se originan por cambios en la secuencia de las bases nitrogenadas que conforman

la molécula, y por lo regular no están asociados con caracteres fenotípicos. Estos cambios normalmente se deben a:

1. Cambios (adición o delección) en las bases nitrogenadas: Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T).
2. Reorganizaciones en la secuencia de ADN tales como delecciones, inversiones, inserciones o duplicaciones de segmentos de ADN.
3. Expansión o contracción del polimorfismo de VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats, por sus siglas en inglés) o simplemente secuencias satélite (minisatélites o microsátélites).

Para el caso de los VNTRs, se han descrito dos categorías: los "minisatélites" y los "microsatélites". Los microsátélites consisten de secuencias de ADN repetidas colocadas en forma seriada (tandem) a lo largo del genoma, con una unidad básica de 10 a 36 pares de bases. Estas secuencias se caracterizan porque contienen regiones ricas en GC que con frecuencia hibridan entre especies diferentes y se encuentran dispersas por todo el genoma (Poulsen *et al.*, 1993; Nyborn *et al.*, 1992; Weising *et al.*, 1992).

Los microsátélites, conocidos también como "secuencias simples repetidas", tienen una arquitectura parecida a la de los minisatélites, ya que los "motifs" (secuencias principales) están también repetidos en serie, pero solamente constan de dos a 10 pares de bases. Ambas categorías de ADN polimórfico se han encontrado en la mayoría de los genomas eucariontes estudiados, lo que da lugar a la obtención de patrones de bandeo individuales y específicos para cada organismo cuando se utilizan como sondas durante el análisis. Algunas secuencias de microsátélites que se han reportado para la obtención de huellas genómicas son por ejemplo: (GATA)₄, (GACA)₄, (TCC)₅, (GTG)₅, (GGAT)₄, (CT)₈ y (CA)₈ (Poulsen *et al.*, 1993, Weising *et al.*, 1992).

Se ha observado que ciertas regiones en el ADN son más polimórficas que otras. Esto puede hacerse evidente en algunas ocasiones mediante la síntesis *in vitro* del ADN utilizando la tecnología de la PCR; pero a veces es necesario recurrir a técnicas más finas como es la de AFLP o RAMPO (descritas posteriormente), que han permitido detectar polimorfismos en cultivos altamente endogámicos y bastante manipulados desde el punto de vista de fitomejoramiento, tales como el garbanzo.

Todas las metodologías que se han utilizado para la detección de este tipo de cambios en el ADN, están ba-

sadas en patrones de bandas electroforéticamente diferentes que resultan de las diferencias en un *locus* particular, por lo que se manifiestan como fragmentos visibles de ADN de longitud variable después de teñir los geles con sales de plata, bromuro de etidio, autorradiografía o métodos no radioactivos (Winter y Kahl, 1995; Hoetzel, 1992).

Estos diferentes patrones de bandeo que exhibe el genoma de los organismos, pueden traducirse a árboles filogenéticos o dendrogramas con el uso de programas de computación apropiados, lo que permite establecer de manera más clara la relación a nivel de ADN entre los individuos de una determinada población (Weising *et al.*, 1995).

MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE POLIMORFISMOS DEL ADN

1. Técnicas basadas en hibridación: RFLP y VNTRs

Una de las primeras técnicas desarrolladas para analizar polimorfismos en el genoma de las plantas fue la de "RFLPs" propuesta a mediados de la década de los ochentas. Esta técnica consiste en detectar fragmentos específicos de ADN mediante la hibridación de una sonda particular; es decir, mediante el uso de una secuencia específica de ADN que puede provenir de alguna región de un gen particular o algún otro fragmento del genoma, previamente marcada con radioactividad o con algún compuesto químico, como la digoxigenina o la biotina.

La técnica inicia con la obtención y fragmentación del ADN, con enzimas de restricción, separación de los fragmentos obtenidos por electroforesis, transferencia de éstos a una membrana cargada positivamente (transferencia tipo "Southern") y posterior hibridación con la sonda apropiada. Los RFLPs se generan por rearreglos en el genoma que originan alteraciones en los sitios de reconocimiento para las endonucleasas que se utilizan en la digestión (Figura 1). Este tipo de marcadores son utilizados principalmente para localizar genes específicos y sus alelos en genomas complejos, para discriminar individuos cercanamente relacionados y para establecer mapas genómicos, principalmente.

Otra metodología que tiene el mismo fundamento, es la hibridación con sondas marcadas que complementan a minisatélites presentes en el genoma de los organismos; esta técnica ha sido aplicada en el estudio del genoma de garbanzo, lo que ha permitido la detección de un gran número de huellas polimórficas

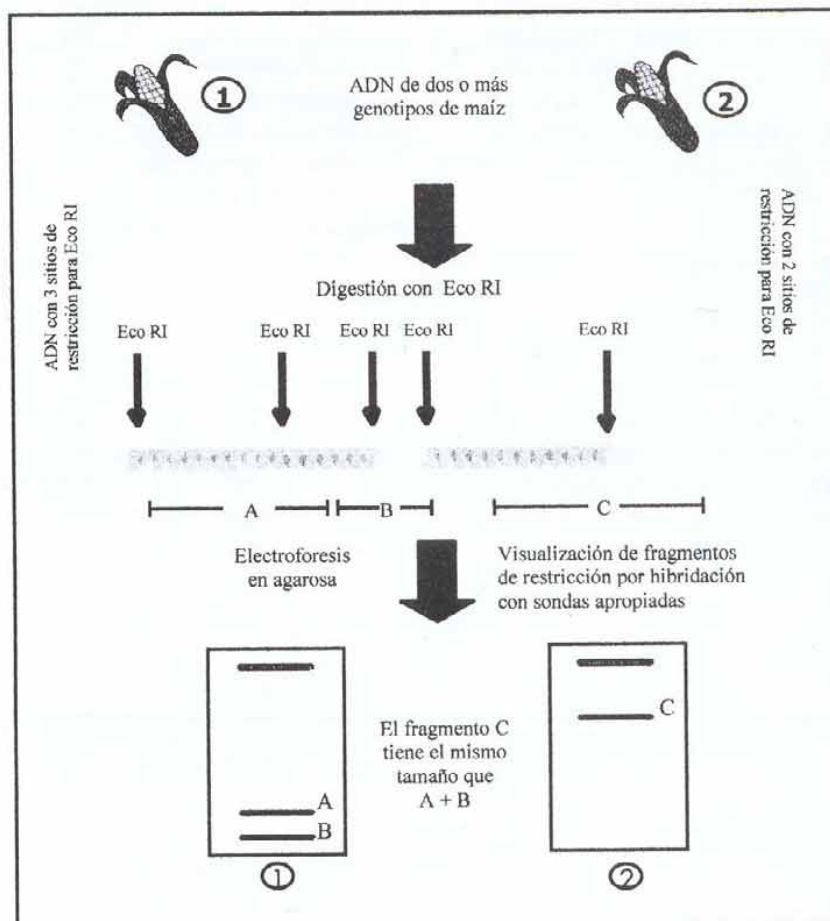


Figura 1. Procedimiento para detectar polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs).

El ADN de dos o más diferentes genotipos de un cultivar [maíz en este caso (*Zea mays L.*)] es primeramente aislado, después cortado (digerido) en sitios específicos por la endonucleasa de restricción Eco RI (origen: la bacteria del colon *Escherichia coli*), que en promedio corta al ADN cada 4096 pares de bases. Como resultado, se obtienen fragmentos de ADN (en este caso: A, B y C) que son separados posteriormente con electroforesis. Después de la separación, el gel es transferido a una membrana en donde el ADN se mantiene como cadena sencilla, posteriormente ésta se hibrida con una sonda de cadena sencilla marcada con radioactividad o algún otro compuesto como la biotina o digoxigenina. Si la sonda encuentra un fragmento de ADN con secuencias complementarias, se podría formar una molécula de doble cadena (híbrido) que podrá detectarse con autorradiografía (en caso de sondas marcadas con radioactividad).

de ADN (Figura 2). La obtención de huellas con cualquiera de estas dos alternativas ofrece mayores ventajas respecto a los RFLPs, ya que se pueden detectar simultáneamente gran número de bandas en un solo experimento (un promedio de 10 a 100) debido a su abundante distribución en el genoma, lo que hace el análisis más eficiente. Esta técnica ha sido de mucha utilidad para la diferenciación genómica en cultivares de garbanzo, ya que es más factible detectar polimorfismos en los VNTRs que en otras regiones de sus genomas debido a su alto nivel de endogamia (Weising *et al.*, 1992).

2. Metodologías basadas en la reacción de polimerización en cadena (PCR).

La Reacción de Polimerización en Cadena (PCR) es una tecnología desarrollada en la misma época que los RFLPs y es el mecanismo usado para multiplicar *in vitro* fragmentos pequeños de ADN (no mayores de 5 kb en promedio). Para esto se requiere una molécula de ADN que servirá de molde, de moléculas iniciadoras de cadena sencilla conocidas como "primers", de los cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), de la

enzima ADN polimerasa y de cloruro de magnesio. Para que la multiplicación ocurra, se requieren tres pasos esenciales: el primero consiste de una **desnaturalización**, en donde las cadenas complementarias del ADN se separan por calentamiento a 94°C, para utilizarse posteriormente como moldes durante la síntesis de fragmentos discretos complementarios; el segundo, en donde la temperatura se disminuye para permitir el **alineamiento** o apareamiento de los iniciadores a la secuencia blanco; es decir, un reconocimiento químico y complementario por parte de las bases del iniciador, donde la temperatura dependerá de la longitud y del contenido de GC que lo conformen; y el tercero, una **extensión** o alargamiento de la molécula iniciadora mediante la adición de nucleótidos por parte de la enzima ADN polimerasa. Estos tres pasos se repiten varias veces en el termociclador (de 30 a 40 ciclos en promedio), de manera que en pocas horas se logran reproducir de manera exponencial, millones de copias del fragmento de ADN (Figura 3). Posteriormente, estos fragmentos "amplificados", se visualizan en un gel de agarosa o poliacrilamida con técnicas comunes de tinción.

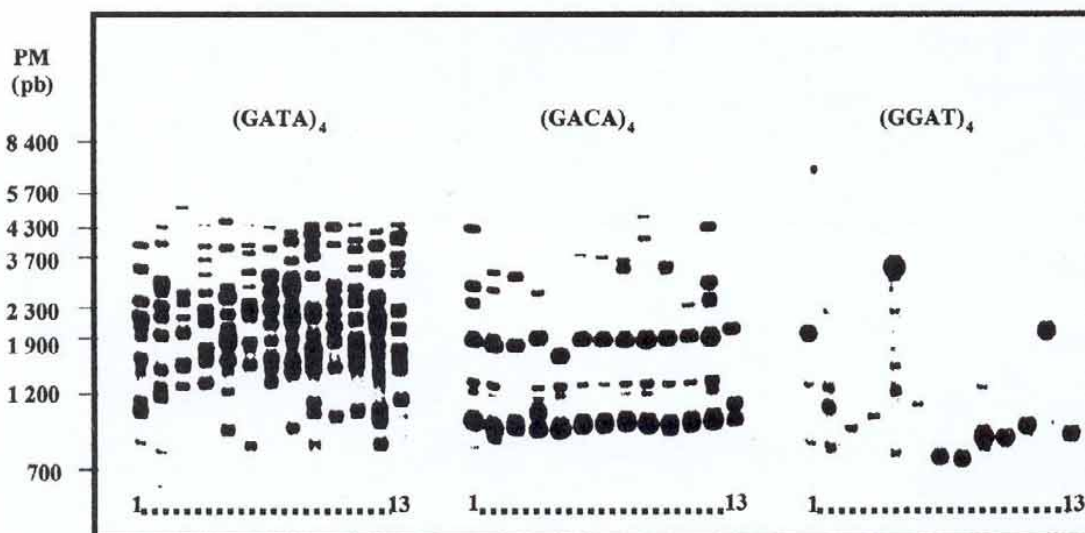


Figura 2. Detección de varias secuencias polimórficas informativas (huellas genómicas) mediante oligonucleótidos complementarios o microsatélites de 13 cultivares de garbanzo, que de otra manera no pueden ser discriminados por la monotonta genómica. Este tipo de huellas de ADN exploran la gran variabilidad de secuencias que originan en el número de unidades repetidas, VNTRs (Modificado de Weising *et al.*, 1992, con permiso de los autores).

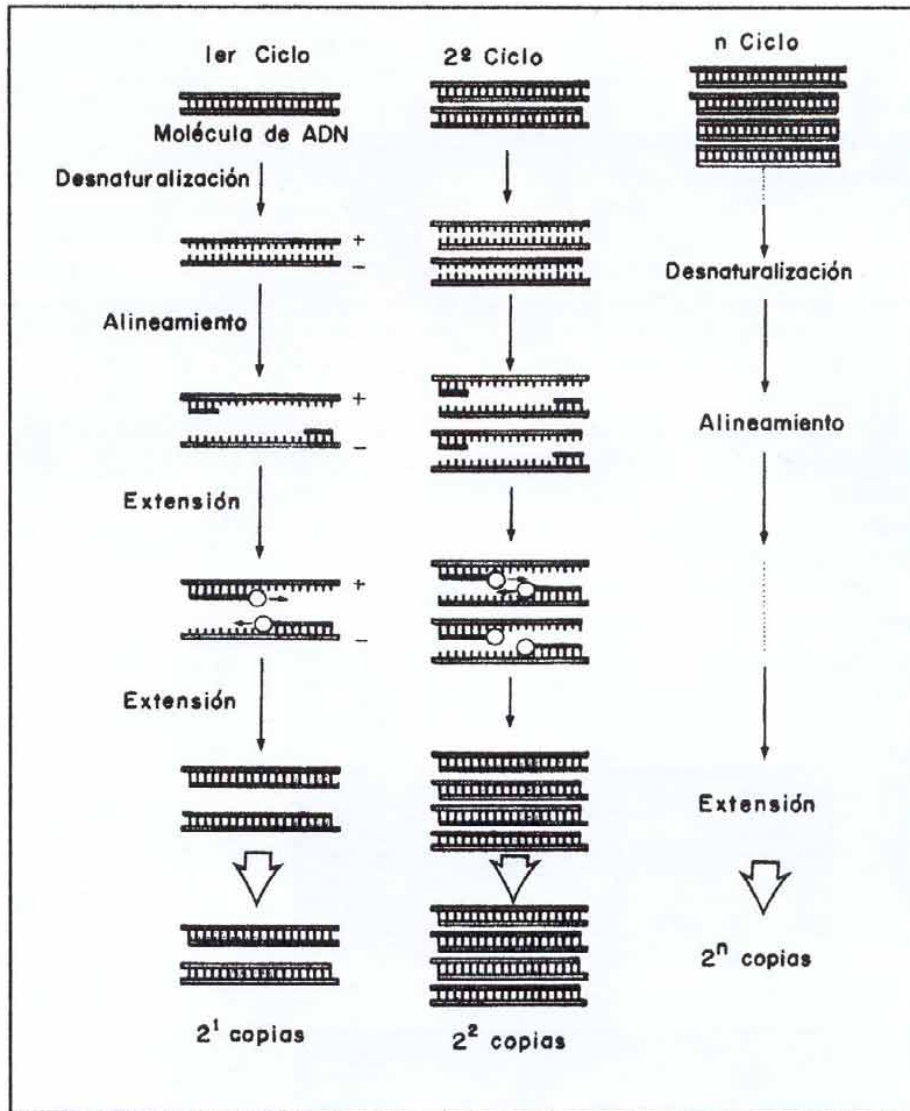


Figura 3. Secuencia de pasos que definen la Reacción de Polimerización en Cadena.

La técnica de la PCR es altamente sensible y para que se lleve a cabo con éxito, es conveniente considerar al inicio pocas moléculas del ADN molde (en el orden de nanogramos); pero debido a esta propiedad, es fácil amplificar secuencias exógenas de ADN (contaminantes) si no se toman las precauciones necesarias durante el establecimiento de la reacción. Esta tecnología se ha utilizado ampliamente para estudiar genomas de diferentes especies, para aislar genes específicos o para detectar alelos particulares. Algunas metodologías basadas en esta tecnología son los **DAF**, **RAPDs**, **MP-PCR**, **AMP-PCR**, entre otras; y la diferencia de cada una de ellas estriba en el tipo de molécula iniciadora que se utilice, ya que pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas y de diferentes longitudes; más adelante se ilustra la técnica de algunas de ellas. Para el caso de DAF y RAPDs

los iniciadores son aleatorios, para MP-PCR los iniciadores se basan en secuencias que complementan a microsátelites; y para AMP-PCR los iniciadores son igual a los anteriores, pero con bases nitrogenadas adicionales que permiten una discriminación más específica de los fragmentos amplificados respecto a los obtenidos con MP-PCR. Con las dos últimas metodologías es factible hacer análisis de genomas bastante confiables; sin embargo, para identificar un gen o alguna otra secuencia específica, es necesario utilizar iniciadores diseñados a partir de las secuencias de bases nitrogenadas que definan a esta región en particular (Staub y Serquen, 1996; Kirby, 1992; Valadez y Kahl, 2000).

a) RAPDs

La técnica de **RAPDs** (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**N**A**) es quizá la herramienta más utilizada para diferentes fines; los más comunes son el análisis de genomas de plantas y para diagnósticos fitosanitarios o médicos. Esta metodología está basada en la PCR y consiste de la síntesis *in vitro* de secuencias discretas de ADN, ubicadas entre dos moléculas iniciadoras aleatorias y complementarias a ciertas regiones de la cadena de ADN molde. Normalmente esta metodología utiliza iniciadores cortos (usualmente de 10 bases) y la síntesis correspondiente generará una cantidad específica de fragmentos diferentes, que dependerá de las veces que el iniciador haya encontrado la región complementaria en el genoma y de la distancia que exista entre ellos; generalmente se han reportado como máximo 15 fragmentos menores de 5 kb por iniciador/genoma. Si se utilizan iniciadores de mayor longitud, la probabilidad de encontrar complementarie-

dad disminuye, por lo que el número de fragmentos obtenido podría verse afectado y en estos casos la metodología cambia de nombre.

Los análisis con RAPDs pueden ser de mucha utilidad, sobre todo al establecer diferencias intraespecíficas. En la Figura 4 se muestra el análisis de 23 cultivares de *Dioscorea bulbifera*, en donde se lograron detectar varios polimorfismos entre los aislamientos de diferentes regiones. En este caso fue suficiente llevar a cabo el análisis con tres iniciadores; sin embargo, en nuestra experiencia, la detección de polimorfismos en garbanzo con esta técnica es poco eficiente, incluso utilizando decenas de iniciadores (datos no mostrados), por lo que ha sido necesario implementar otras estrategias para poder detectar dichas diferencias.

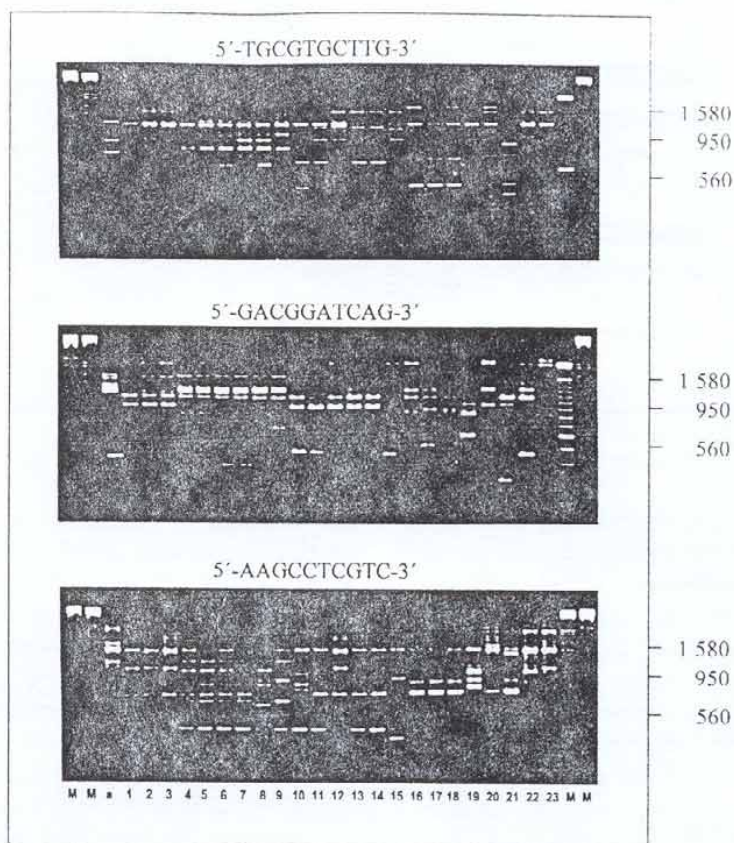


Figura 4. Análisis de RAPDs de 23 cultivares de *Dioscorea bulbifera* para detectar variabilidad genética intraespecífica. MW: marcadores de peso molecular expresados en kilobases; a: *Dioscorea burkiliana* como grupo comparador (tomado de Ramser et al., 1996, con permiso de los autores).

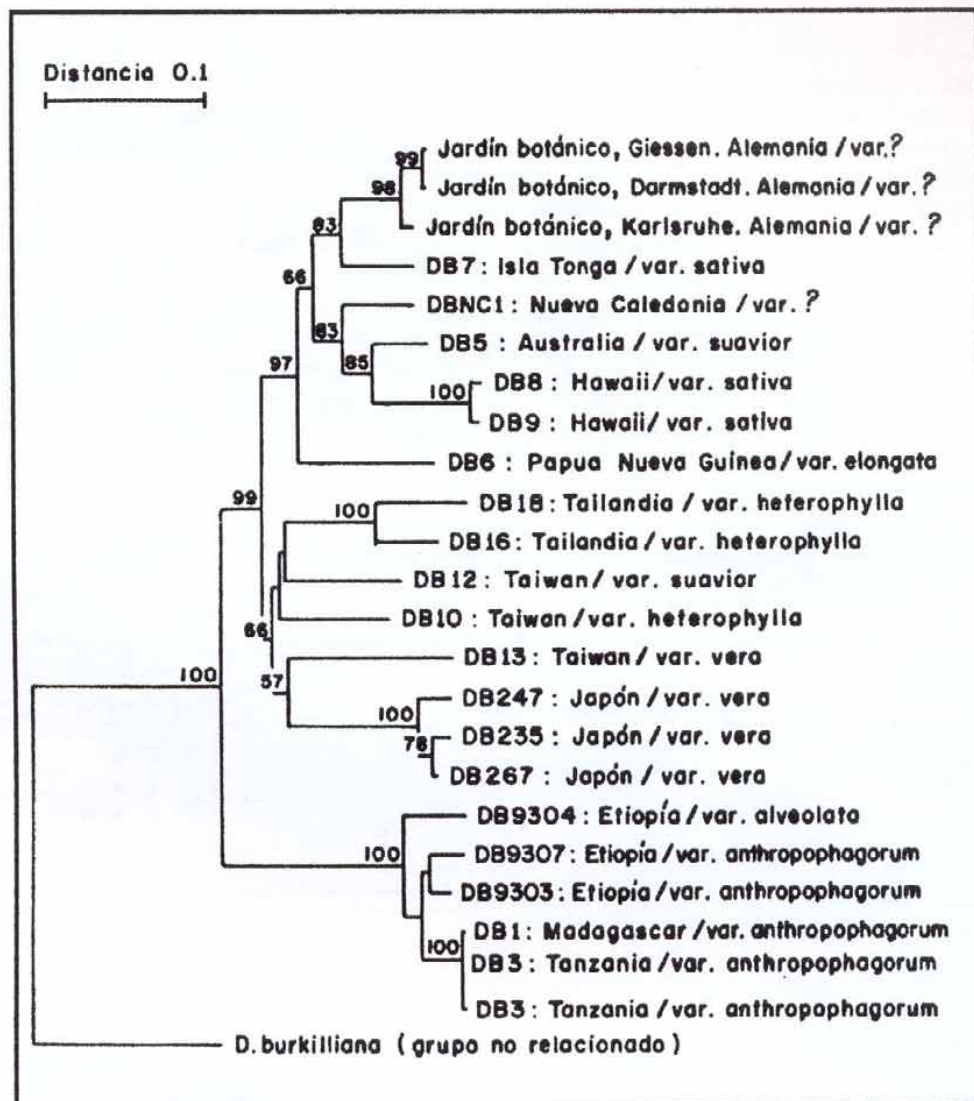


Figura 5. Relaciones genómicas representadas en forma de árbol, producto del análisis de RAPDs de 23 cultivares de *Dioscorea bulbifera* con el software NTSYS-pc (Modificado de Ramser et al., 1996, con permiso de los autores).

En la Figura 5 se muestra el dendrograma que indica la relación genética entre los 23 cultivares de *Dioscorea* deducido del análisis de las bandas de ADN del gel de la Figura 4; nótese que *Dioscorea burkilliana* se mantiene fuera del resto de los cultivares debido a la poca relación genética existente (Ramser et al., 1996).

b) MP-PCR Y AMP-PCR

No siempre es factible encontrar polimorfismos y establecer diferencias entre los organismos utilizando iniciadores aleatorios. De hecho, en ocasiones para poder encontrar diferencias significativas, se requiere ensayar con decenas o cientos de ellos; sin embargo, el diseño y uso de iniciadores semiespecíficos ha permitido detectar

una mayor cantidad de polimorfismos respecto a los revelados con RAPDs, sobre todo en las especies con altos niveles de endogamia. Estos iniciadores están conformados por secuencias que complementan microsatélites y se utilizan como iniciadores en la PCR para sintetizar la región o regiones bordeadas por dicha secuencia. Esta alternativa detecta las diferentes longitudes (polimorfismos) presentes en estas regiones específicas al interior del genoma. En la Figura 6 se ilustra el mecanismo que define dicha técnica.

Los microsatélites se identificaron por vez primera en el genoma de humanos y posteriormente en plantas y hongos patógenos (Caetano-Anollés et al., 1991). Aún cuando no se han reportado funciones claras para este

tipo de secuencias en los organismos, se les ha otorgado un papel importante en los procesos de evolución (Moxon y Wills, 1999). La principal ventaja que los microsatélites ofrecen para el análisis de ADN es su abundancia y dispersión en el genoma, lo que permite detectar una mayor variación en regiones específicas para un locus particular y obtener huellas de diferente longitud; es decir, "DNA fingerprints". Se han descrito básicamente dos modalidades basadas en secuencias que complementan a microsatélites; la primera conocida como **MP-PCR** (Microsatellite Primed-PCR) que utiliza iniciadores tales como (GACA)₄, (GGAT)₄, (TCC)₅, (CT)₈, etc. (Weising *et al.*, 1992). En nuestros respecti-

vos laboratorios hemos aplicado esta metodología para el estudio del genoma del garbanzo. En la Figura 7 se muestran los polimorfismos obtenidos en algunas líneas de este cultivo utilizando el iniciador (GGAT)₄.

La segunda modalidad llamada **AMP-PCR** (Anchored Microsatellite Primed-PCR) es una variante de la anterior y consiste en utilizar también iniciadores para microsatélites, pero con una, dos o incluso tres bases nitrogenadas llamadas "anclas". Esta clase de iniciadores resultan ser más específicos que los utilizados en MP-PCR, puesto que además de seleccionar la región

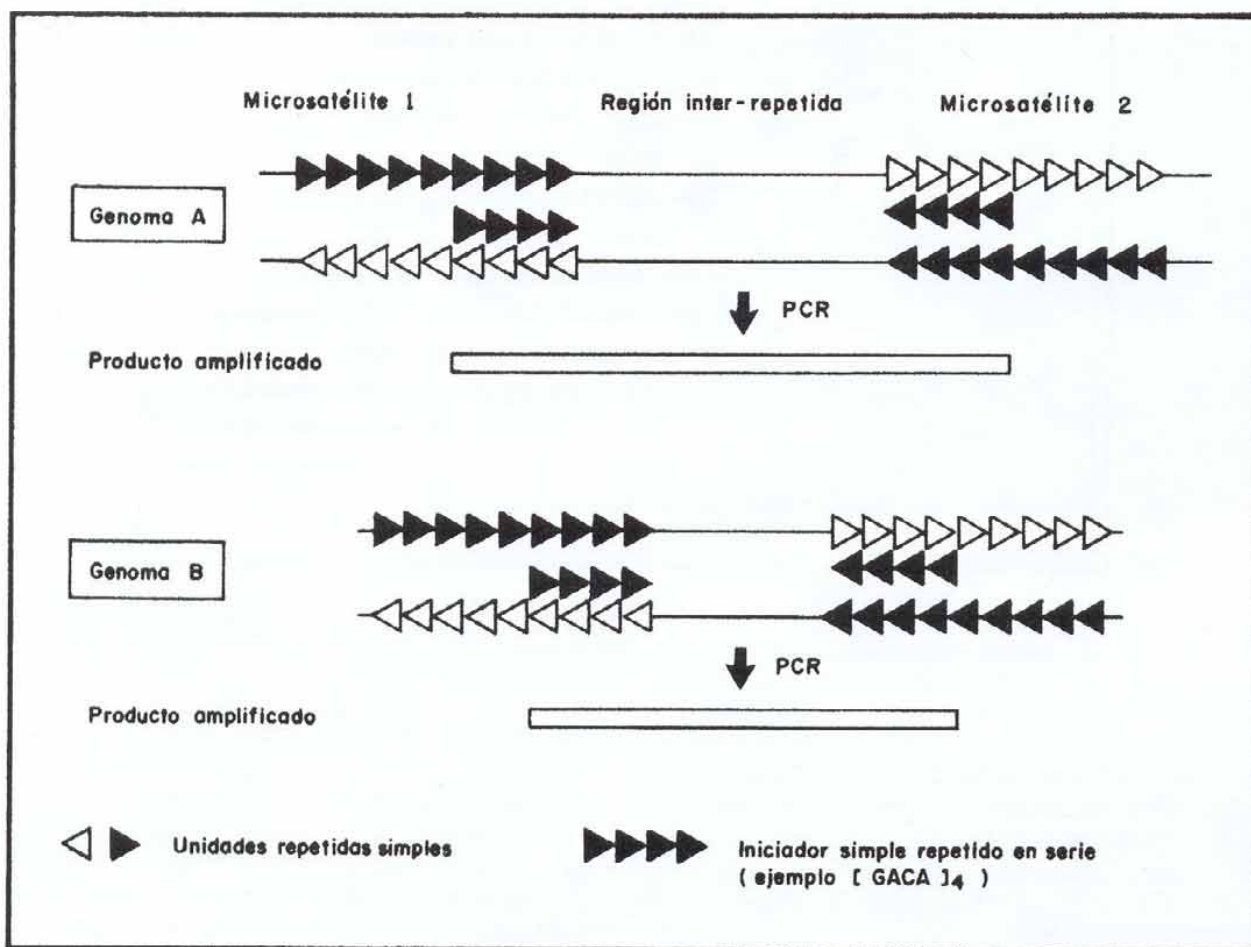


Figura 6. Esquema de la técnica de MP-PCR.

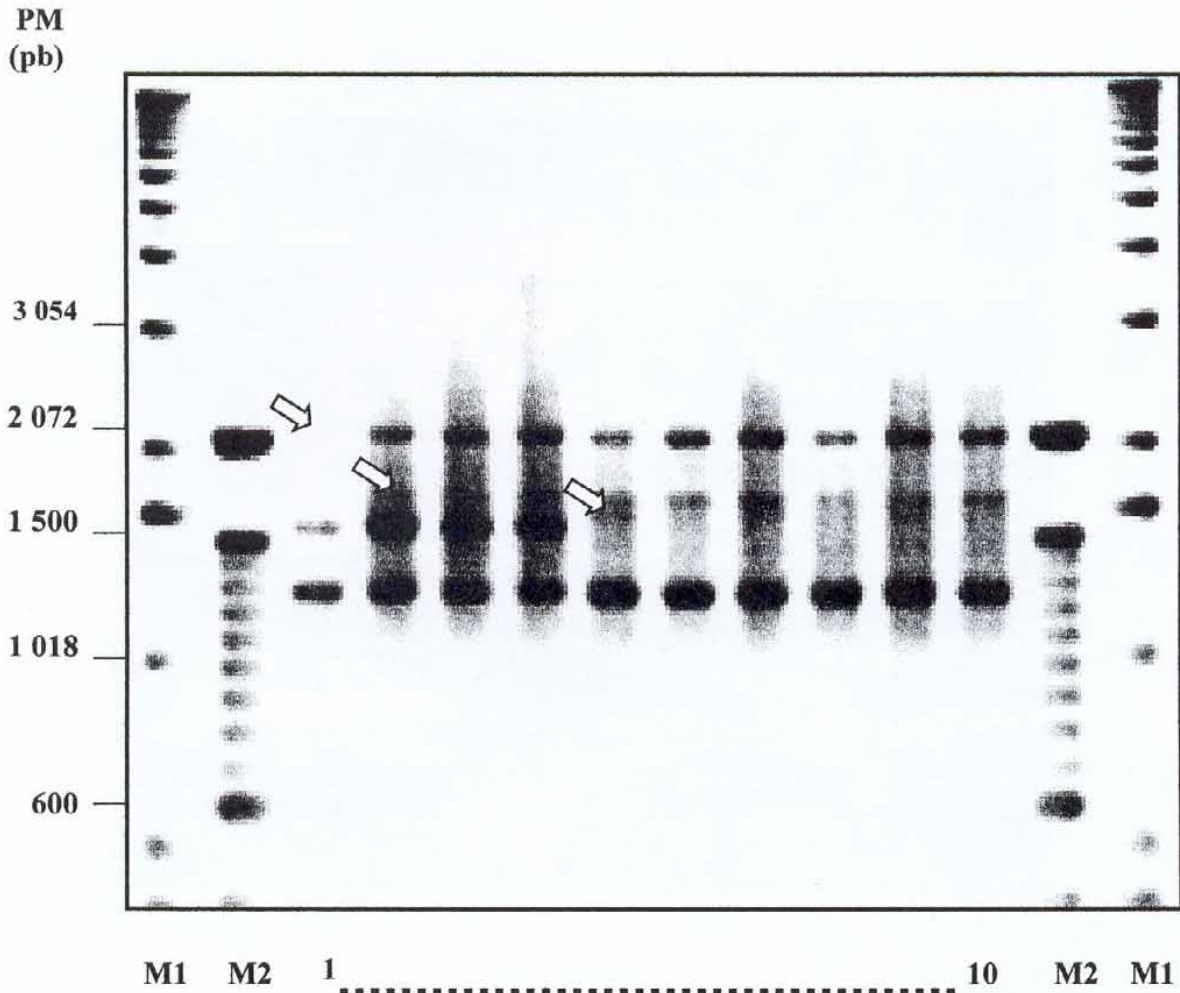


Figura 7. Patrones de MP-PCR de 10 líneas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) seleccionadas del germoplasma Mexicano. Las flechas señalan los diferentes polimorfismos que reflejan inserciones o deleciones en la secuencia entre los dos microsatélites flanqueantes. M1: marcador de peso molecular de 1 kb; M2: marcador de peso molecular de 100 pb.

correspondiente al microsatélite, se deben complementar también las bases adicionales, lo que conlleva a que la especificidad de los productos seleccionados se incremente de acuerdo al número de bases que conformen el ancla una vez que los fragmentos de ADN se han sintetizado, la separación de los mismos y el análisis respectivo se lleva a cabo de la misma manera que para RAPDs. Su aplicación en el análisis del genoma de garbanzo también ha sido abordada por nuestro grupo y se han detectado polimorfismos tanto a nivel intra como interespecíficos (Figura 8).

c) AFLP

La técnica de AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphisms) es una combinación de las metodologías basadas en hibridación y PCR. Al igual que otras técni-

cas de marcadores, inicia con el aislamiento del ADN genómico y su restricción completa con dos endonucleasas diferentes Eco RI y Mse I; la primera de ellas reconoce una secuencia de seis pares de bases (pb) al interior del genoma y la otra reconoce una secuencia de cuatro pb. A través de la acción combinada de ambas endonucleasas, se produce un gran número de fragmentos con frecuencias (en número descendente): Mse I-Mse I >>> Mse I-Eco RI >>> Eco RI-Eco RI. La técnica de AFLP selecciona únicamente los fragmentos Mse I-Eco RI, pero si todos estos fragmentos se amplificaran, el número de productos podría ser muy grande y el correspondiente análisis muy complejo.

La restricción es seguida por la ligación de un adaptador específico de doble cadena de 25 a 30 pb a cada lado

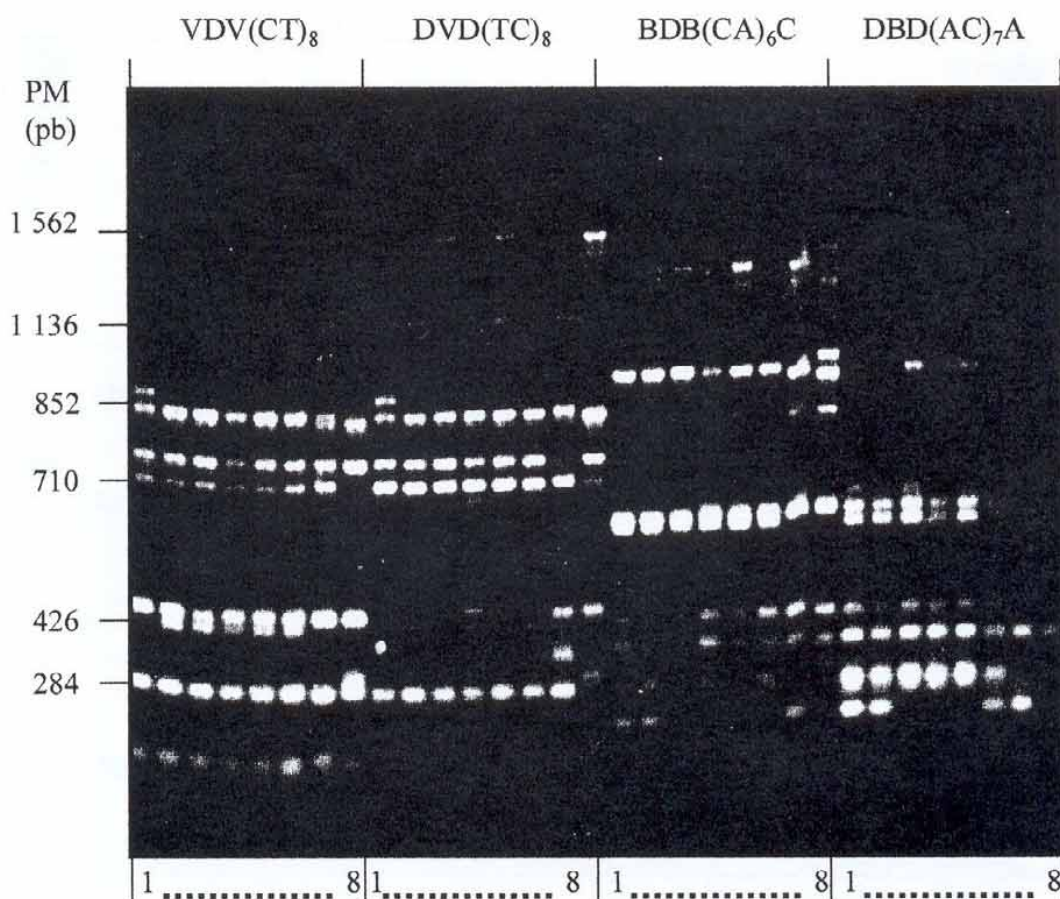


Figura 8. Detección de secuencias polimórficas de diferentes especies de Cicer y varios cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L) con la técnica de AMP-PCR. Carriles 1 a 6: diferentes cultivares de garbanzo; 7: *Cicer reticulatum*; 8: *Cicer echinospermum*. Anclas (B: C, G, T; D: A, G, T; V: A, C, G.)

del fragmento de restricción, dichos adaptadores presentan una pequeña cola 5'. Las secuencias de los adaptadores son reconocidas por iniciadores específicos para la PCR que se unen para dar inicio a la primer "amplificación pre-selectiva"; por lo que, sólo una parte de los fragmentos Mse I-Eco RI se amplifican selectivamente en esta etapa (SRFA, Selective Restriction Fragment Amplification) y se lleva a cabo con iniciadores que contienen una base extra en el extremo 3'; resultando un subconjunto de fragmentos que además de llevar la secuencia complementaria al iniciador, complementan a la base extra adicionada. Posteriormente, estos productos amplificados son sujetos a una segunda selección más rigurosa, en donde se consideran iniciadores con dos o tres bases extras. Los fragmentos resultantes son complementarios además del iniciador, a las extensiones consideradas, razón por la cual sólo una porción del genoma fragmentado es amplificado en la reacción de AFLP.

La amplificación pre-selectiva, se lleva a cabo con el iniciador Eco RI más una extensión de adenina (A) y el iniciador Mse I con una citosina (C). Por razones estadísticas, cada iniciador reconoce aproximadamente sólo el 25% de todos los fragmentos de restricción. Debido a que ambos iniciadores son adecuados para una amplificación exitosa, sólo 6.25 % de todos los fragmentos se reproducen. Este número puede ser alto, especialmente si se utiliza un genoma eucariótico grande, pero puede reducirse mediante el incremento del número de bases selectivas en el extremo 3' del iniciador o iniciadores.

Si se considera, por ejemplo, un genoma de 3×10^8 bases, entonces el fragmento Mse I-Eco RI puede encontrarse representado 10^5 veces; es decir, 100 000 fragmentos con una longitud promedio de 3×10^3 bases (3000 bases). En este ejemplo, sólo 1 de cada 4096 fragmentos (alrededor de 24 fragmentos) puede ser amplificado. Por

esta razón, es esencial reducir el número de fragmentos, lo que se lleva a cabo mediante el segundo paso del protocolo de AFLP (amplificación selectiva).

Generalmente para genomas grandes (5×10^8 a 6×10^9 pb), por ejemplo cebada (*Hordeum vulgare*), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), papa *Solanum tuberosum* L.), uva (*Vitis spp.*), soya (*Glycine max* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum*) o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), se utilizan iniciadores de pre-amplificación que contengan una base como ancla más los iniciadores selectivos Mse I + 3 bases y Eco RI + 3 bases. Para genomas pequeños (1×10^8 a 5×10^8 pb), por ejemplo de *Arabidopsis*, cítricos o arroz, no es necesaria la base que sirve de ancla en los iniciadores para la amplificación pre-selectiva y los iniciadores selectivos serían Mse I + 3 bases y Eco RI + 2 bases.

Normalmente uno de los dos iniciadores de AFLP se marca radioactivamente y los fragmentos amplificados pueden ser detectados después de su separación en geles de secuenciación de alta resolución con autorradiografía. La estrategia general se indica en la Figura 9. Debido a que la técnica de AFLP permite una detección mayor de polimorfismos comparada con las metodologías basadas

en la PCR, es posible identificar marcadores genéticos con más facilidad, lo que da lugar al establecimiento y saturación de mapas del genoma en plantas (Valadez y Kahl, 2000).

Independientemente de las ventajas mencionadas (por ejemplo de la alta proporción múltiple en donde un número mayor de RFLPs pueden ser visualizados en un único experimento), la técnica de AFLP no requiere de hibridación ni clonación, puesto que las bandas que se obtienen son productos de la PCR. Sin embargo, para obtener dichas ventajas, es obligatoria la pureza del ADN genómico así como la restricción total del mismo. Dependiendo del material analizado, es posible que esta técnica no detecte altos niveles de polimorfismo, pero es extremadamente eficiente debido a que permite el análisis simultáneo de un número grande de bandas sobre un solo gel. Estos polimorfismos se heredan típicamente de acuerdo con las leyes mendelianas, por lo que los marcadores resultantes tienen la característica de ser dominantes. Cultivo de garbanzo, el número de polimorfismos detectados con AFLPs es limitado, pero con la combinación de otras metodologías alternativas, ha sido posible integrar un mapa genómico más completo (Figura 10).

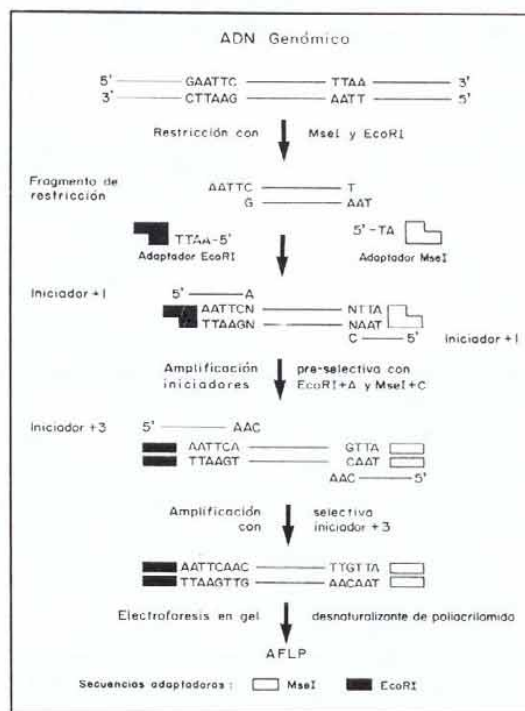


Figura 9. Estrategia general de la técnica de AFLP.

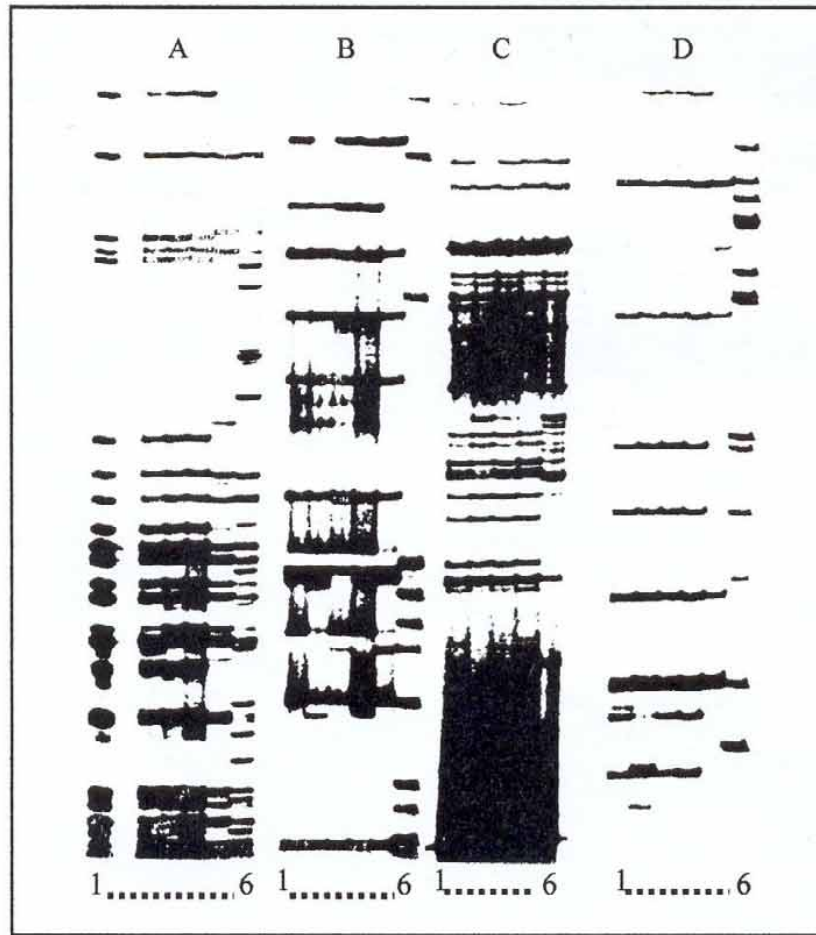


Figura 10. Patrones de AFLP de cinco líneas diferentes de garbanzo (*Cicer arietinum* L.; 1 a 5) y la especie silvestre más relacionada *Cicer reticulatum* (6) detectados con cuatro diferentes iniciadores (A, B, C, D). Debido al alto nivel de autogamia en el cultivo, esta técnica permite detectar solamente de 3 a 8 bandas polimórficas en este caso particular; pero si se utilizan otras combinaciones de iniciadores, es posible detectar más polimorfismos.

d) RAMPO

La técnica de **RAMPO** (Amplificación Aleatoria del Polimorfismo de Microsatélites) es una forma de análisis descrita para plantas y reportada por vez primera a finales de 1995 (Richardson *et al.*, 1995). Consiste en la combinación de los resultados independientes obtenidos con dos metodologías: por un lado, el patrón de bandas producto de PCR separadas en un gel electroforético y la posterior hibridación del mismo con sondas de microsatélites marcadas. Esta alternativa de análisis se diseñó con la finalidad de utilizar óptimamente los productos de amplificación obtenidos en una única reacción de PCR y la detección simultánea de huellas de ADN independien-

tes y polimórficas que pueden estar presentes también al interior de algún producto amplificado. La lógica de esta técnica consiste en que existen amplificaciones de ADN (bandas) en el gel que no se perciben, debido a su longitud o al número de veces que se sintetizaron, pero es posible que en algunos de esos fragmentos se encuentren microsatélites específicos que puedan detectarse mediante la hibridación con sondas que los complementen.

Para este análisis, la síntesis del ADN se puede llevar a cabo utilizando una molécula iniciadora aleatoria (RAPD) o complementaria al microsatélite (MP-PCR); después, los productos se separan, se tiñen y se documentan. En seguida, el gel se seca o se transfiere a una

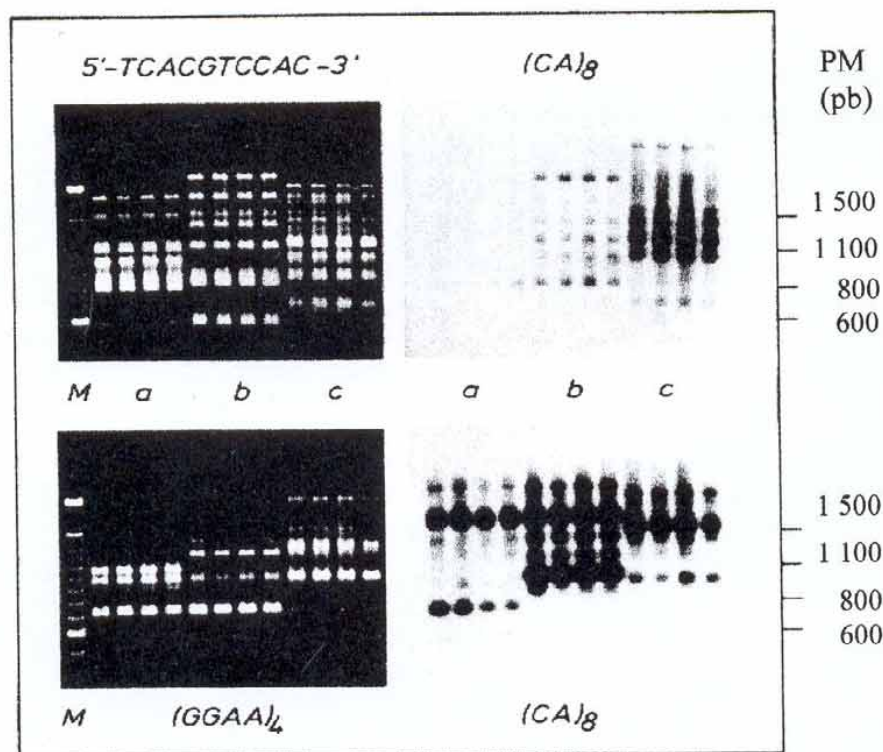


Figura 11. Análisis RAMPO de cuatro réplicas de experimentos con una muestra cada uno de tres diferentes especies de *Dioscorea* (a: *D. cayenensis*, b: *D. rotundata* y c: *D. bulbifera*). En el lado izquierdo del panel superior se muestra el patrón de bandas obtenidos con RAPDs utilizando el iniciador OPG-08 de Operon Technologies (5'-TCACGTCCAC-3'). En el panel superior derecho, se muestran los productos marcados de OPG-08 con la sonda (CA)_n. En el panel inferior izquierdo se muestran los patrones de bandeo obtenidos con el iniciador MP-PCR (GGAA)_n y en el panel inferior derecho, se muestran los productos de (GGAA)_n, marcados con la sonda (CA)_n. Los marcadores de peso molecular (línea M) están expresados en kilobases (Tomado de Ramser et al., 1997, con permiso de los autores).

membrana de nailon y se hibrida con alguna sonda para microsatélites. La autorradiografía permite entonces, la detección reproducible y polimórfica de los perfiles de las huellas que son diferentes a los patrones teñidos de RAPDs, y que a su vez son completamente distintos para cada sonda de microsatélite que se utilice. En la Figura 11 se muestra un estudio realizado con esta metodología.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El panorama que permite visualizar el conjunto de las técnicas y metodologías descritas previamente es muy alentador. En muchos estudios de diferentes disciplinas

científicas se ha demostrado ampliamente la utilidad que ofrecen. En el área agronómica, su principal contribución ha sido para apoyar programas de fitomejoramiento; aunque también han permitido estimar de manera rápida y eficiente la diversidad genética tanto de especies vegetales nativas y cultivadas que existen en un ecosistema particular con fines taxonómicos, así como estudios epidemiológicos específicos.

Las herramientas moleculares que se expusieron anteriormente presenta obviamente ventajas y desventajas. De manera general se puede resaltar que los beneficios que éstas ofrecen, se reflejan en tiempo y confiabilidad de los resultados obtenidos; pero quizá el inconveniente

principal es que su implementación requiere de laboratorios con equipo y personal capacitado, lo que en muchas ocasiones limita su uso.

Sin embargo, vale la pena resaltar algunas perspectivas de las diferentes tecnologías descritas; por ejemplo, desde la década pasada, muchas de estas metodologías se han venido utilizando en muchos países para diferenciar variedades vegetales nuevas que requieren de registro para su protección legal. En este sentido, instancias gubernamentales mexicanas, como el SNICS (Servicio Nacional de Certificación e Inspección de Semillas de la SAGAR), ha considerado su uso para complementar los descriptores fenotípicos que normalmente acompañan la descripción varietal de las plantas sometidas a registro. Lo anterior se debe a que la caracterización o descripción fenotípica de la planta de interés, a menudo no resuelve la diferenciación genética, sobre todo cuando se trata de especies cultivadas con una gama amplia de variedades o cultivares.

En el área de fitosanidad estas herramientas moleculares también ofrecen un uso práctico, ya que las investigaciones están siendo orientadas actualmente al diseño de sondas moleculares para el diagnóstico de patógenos específicos; sobre todo en casos en donde se carece de un método rápido y eficiente que permita identificarlos en muestras de semillas como es el caso del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), o en explantes con reproducción vegetativa como la papa (*Solanum tuberosum* L.), o en papaya (*Carica papaya* L.), que presentan problemas fitopatológicos severos y que pueden causar grandes pérdidas económicas a los productores. La utilización rutinaria de una sonda que permita diagnosticar la presencia o ausencia, por ejemplo de un virus en los tubérculos de papa que se utilizarán como semilla, evitaría pérdidas cuantiosas al sembrar material vegetal aparentemente "sano" pero con el riesgo de ocasionar grandes daños. Por lo anterior, el contar con métodos de diagnóstico rápidos y altamente específicos, permitirán reducir significativamente las fuentes de inóculo y se evitaría en gran medida, la dispersión de los mismos en zonas que no han estado expuestas a ese organismo en particular, como ocurre frecuentemente con la introducción de material enfermo de un país a otro.

Para la aplicación de las técnicas descritas en protección vegetal, vale la pena tomar en cuenta los estudios realizados con el hongo *Ascochyta rabiei* en garbanzo (citado anteriormente) y extrapolar este posible comportamiento a otros fitopatógenos no menos importantes en México. Continuamente el investigador o el agricultor recurre al uso de pesticidas para controlar una determi-

nada enfermedad; sin embargo, a veces esta mecánica no logra controlarla. Este comportamiento de resistencia por parte del patógeno, podría sugerir cambios genéticos acelerados en la población, por lo que estudiar su dinámica a nivel de genoma, permitirá apreciar la velocidad de cambio que sufren, y posiblemente se podrían proponer a tiempo métodos de control alternos y eficientes, lo que repercutiría en la disminución del uso de pesticidas y por lo tanto, en mejorar el ambiente.

Por otro lado, estas técnicas también pueden apoyar indudablemente al mejor conocimiento de la diversidad del germoplasma natural, con la intención de hacer un uso más adecuado de dichos recursos para fines de explotación alimenticia, ecológica, industrial o farmacéutica, entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece profundamente el apoyo constante del Servicio de Intercambio Académico de Alemania (DAAD, Bonn) para G.K.

Parte de esta investigación fue posible gracias al apoyo del INIFAP-CIRNO, al proporcionar las semillas de garbanzo.

BIBLIOGRAFÍA

- De Looses, M. and G. Gheysen. 1995. Identification methods based on molecular techniques. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Third Session. Wageningen, Netherlands, September 19 to 21, 1995. 22 p.
- Caetano-Anollés, G., B. J. Bassam, and P. M. Greshoff. 1991. DNA amplifications fingerprinting: A strategy for genome analysis. *Plant Mol. Biol. Reporter* 9: 294-307.
- Caetano-Anollés, G. and P. M. Greshoff. 1997. DNA Markers. Protocols, Applications, and Overviews. Wiley-VCH, N.Y. 364 p.
- Hoelzel, A.R. 1992. Molecular Genetic Analysis of Populations. IRL Press. England. 315 p.
- Kaemmer, D., J. Ramser, M. Schön, F. Weigand, M. C. Saxena, A. J. Driesel, G. Kahl, and K. Weising. 1992. DNA fingerprinting of fungal genomes: A case study with *Ascochyta rabiei*. *Adv. Mol. Gen.* 5: 255-270.
- Kahl G. 1995. Dictionary of Gene Technology. VCH. Federal Republic of Germany. 550 p.
- Kirby, T. L. 1992. DNA Fingerprinting: an Introduction. W.H. Freeman and Company, USA. 365 p.
- Moxon, R.E. and C. Wills. 1999. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Sci. Am.* 280 (1): 72-77.
- Nybom, H., J. Ramser, D. Kaemmer, G. Kahl, and K. Weising. 1992. Oligonucleotide DNA fingerprinting detects a multiallelic locus in box elder (*Acer negundo*). *Molecular Ecology* 1: 65-67.
- Phillips, L. R. and I. K. Vasil. 1994. DNA-Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 384 p.

- Poulsen, G. B., G. Kahl, and K. Weising. 1993. Abundance and polymorphism of simple repetitive DNA sequences in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* 85: 994-1000.
- Ramser, J., C. López-Peralta, R. Wetzel, K. Weising, and G. Kahl. 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 39: 17-25.
- Ramser, J., K. Weising, V. Chikaleke, and G. Kahl. 1997. Increased informativeness of RAPDs analysis by detection of microsatellite motifs. *Biotechniques* 23:285-290.
- Richardson, T., S. Cato, J. Ramser, G. Kahl, and K. Weising. 1995. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Res.* 23 (19) 3798-3799.
- Staub, E. J. and F.C. Serquen. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31 (5): 729-741.
- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa México. 147 p.
- Weising, K., D. Kaemmer, F. Weigand, F. T. Epplen, and G. Kahl. 1992. Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum*). *Genome* 35: 436-442.
- Weising, K., D. Kaemmer, J. Ramser, S. Bierwerth, and G. Kahl. 1992. Plant DNA fingerprinting with simple repetitive oligonucleotides. *Adv. Mol. Gen.* 5: 135-156.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press. USA. 322 p.
- Winter, P. and G. Kahl. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 438-448.