Cultivos Tropicales 15(1):82-84, 1994

MARCADORES DE AMPLIFICACION ALEATORIA DE ADN POLIMORFICO (RAPD) Y POLIMORFISMO GENETICO

R. Rojas, Belkis Corona y D. Rivas

ABSTRACT. Five tomato varieties were analyzed through polymerase chain reaction technique with arbitrary primers (PCR-AP). Two arbitrary primers were used, they showing differences at the patterns obtained by means of genome amplification of these varieties. The application of RAPD as genetical markers or to detect intravarietal polymorphism is appraised in this paper.

Key words: Polymerase chain reaction, tomato, genetic polymorphism, RAPD markers

RESUMEN. Mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios (PCR-AP), se analizaron cinco variedades de tomate. Se utilizaron dos cebadores arbitrarios, los que revelaron diferencias en los patrones obtenidos mediante la amplificación del genoma de estas cinco variedades. Se valora la utilización de los RAPD como marcadores genéticos o para la detección de polimorfismo intravarietal.

Palabras claves: Reacción en cadena de la polimerasa, tomate, polimorfismo genético, marcadores RAPD

INTRODUCCION

La aplicación de técnicas moleculares a la agricultura ha despertado mucho entusiasmo entre varios científicos de todo el mundo. En los momentos actuales un gran número de investigaciones están dirigidas a la búsqueda de marcadores moleculares asociados a genes de interés, entre los que se destacan aquellos relacionados con la resistencia a patógenos y a factores abióticos (calor, humedad, salinidad, etcétera). Los marcadores moleculares que han demostrado estar ligados a caracteres de interés han sido ampliamente usados, tanto para monitorear la introgresión de genes en programas de cruzamiento como en el clonaje de genes de interés económico (AVRD, 1991).

El polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) ha sido ampliamente usado para estos fines, tanto en animales como en plantas (Helentjaris *et al.*, 1985). Recientemente se ha demostrado la utilidad de la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como marcador molecular para una gran variedad de organismos eucarióticos: animales, hongos y plantas (Paran, Kessell y Michelmore, 1991). Otros autores plantearon que la amplificación aleatoria del ADN por PCR constituye una alternativa interesante para la detección de polimorfismo genético (D'Ovidio, Tanzarella y Porceddu, 1990, y D'Ovidio *et al.*, 1992), pero el PCR convencional requiere de información sobre la secuencia nucleotídica a amplificar. Recientemente se ha comenzado a usar una variante de PCR, en la que los cebadores son de secuencia arbitraria (PCR-AP), con lo que se evita tener que conocer la secuencia del ADN a amplificar (Anita Sellstedt *et al.*, 1992).

En el cultivo del tomate se ha informado la existencia de marcadores RAPD, los que se sugiere están asociados con la tolerancia al calor. Particularmente interesante resulta la mención de bandas de 3 y 7.5 Kpb, obtenidas usando el cebador "Universal" de 17 mer del fago M-13 (GTAAAACGACGGCCAGT), en una variedad de tomate resistente al calor (AVRD, 1991).

En el presente trabajo se hace un análisis de los patrones de amplificación obtenidos en cinco variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), usando dos cebadores del fago M-13 y se discute la posibilidad de usar los marcadores RAPD para detectar polimorfismo y resistencia.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal. Se utilizaron hojas de plantas de tomate de 30 días de germinadas. Las variedades empleadas fueron: Criollo Quivicán y Nagcarlán (resistentes al calor), y Roma VF, Campbell-28 y HC-3880 (susceptibles).

Preparación de las muestras. El ADN total fue purificado según la metodología descrita por Dellaporta, Wood y Hecks (1983). La calidad de ADN obtenido para cada variedad se analizó en geles de agarosa 0.6 % en TBE, 0.5 μg.mL^{-1} de bromuro de etidio y visualizados mediante un transiluminador de luz UV LKB modelo 2011.

Amplificación por PCR-AP. Se emplearon 100 ng de ADN purificado de cada variedad, utilizándose para la amplificación de los mismos un cebador en cada reacción, probándose dos cebadores pertenecientes al fago

R. Rojas, Investigador del departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal No. 1, San José de las Lajas; Belkis Corona, Investigadora y D. Rivas, Investigador Agregado del departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apdo. 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

M-13: el "Universal" de 17 mer (GTAAAACGACGC-CCAGT) y el "Reverso" de 16 mer (AACAGCTATGAC-CATG) sin previo conocimiento de la secuencia nucleotídica del genoma de las variedades de tomate seleccionadas. Estos cebadores fueron sintetizados en el CIGB, Cuba.

La técnica de amplificación se realizó en un volumen de 50 μL, conteniendo Tris HCl 10 mM, pH 8.3; KCl 50 mM; $MgCl_2$ 2.5 mM; BSA 0.1 $mg.mL^{-1}$; 1 mM de cada dNTP; 50 pM del cebador y 1 μL por muestra de la Taq-Polimerasa AmpliCen, CENSA, Cuba.

Todas las amplificaciones se ejecutaron en un equipo Thermal Reactor Hybaid, mediante el siguiente programa: cinco ciclos de 94°C- 1 minuto, 45°C- 1 minuto, 72°C- 2 minutos; 25 ciclos de 94°C- 30 segundos, 45°C- 30 segundos, 72°C- 2 minutos; un ciclo de 72°C- 10 minutos.

Los resultados obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 4 % en TBE, y el producto amplificado se visualizó en un transiluminador de luz UV.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1 se observa la desaparición de dos bandas de aproximadamente 1 Kpb en la variedad Campbell-28 y que se encuentran presentes en las variedades resistentes, pero esas mismas bandas aparecen también en las variedades Roma VF y HC-3880, por lo que no puede afirmarse que exista correlación entre estas bandas y la resistencia al calor. También se pueden observar variaciones en la región de entre 2.2 y 4 Kpb. Aunque estas variaciones pueden aportar datos sobre el polimorfismo genético intravarietal (Rivas, Belkis Corona y Rojas, 1993), no existen evidencias para que sean consideradas como marcadores asociados a características de resistencia.

En la figura 2 el comportamiento es similar, sin encontrar suficientes evidencias para relacionar la presencia/ausencia de bandas con características de resistencia.

El cebador "Reverso" (Fig. 2) mostró mayor polimorfismo intravarietal y los patrones de amplificación obtenidos son perfectamente diferenciables en las cinco variedades. Helentjaris *et al.* (1985) encontraron poca variabilidad entre variedades de *L. esculentum* mediante análisis de RFLP y plantean que las líneas de esta especie son muy conservadas, por lo que nuestros resultados sugieren que este cebador se une a regiones no conservadas en el genoma de tales variedades y pudiera ser usado en trabajos de identificación varietal o para la inspección de muestras, con vistas a determinar el grado de polimorfismo entre diferentes variedades.

Debe tenerse en cuenta que variaciones en la secuencia nucleotídica, aún en regiones codificantes, pueden generar RAPD sin ninguna otra variación fenotípica (Laurie, Snape y Gale, 1992).

Para la elección de un marcador debe demostrarse un estrecho ligamiento entre el marcador en cuestión y el carácter deseado. Por lo general, se prefiere que el marcador reconozca solamente el locus del gen que se desea identificar. En los estudios de polimorfismo, identificación varietal, filogenia, etcétera, es una ventaja usar un marcador que reconozca varios loci, pues nos aportará mayor cantidad de información sobre el genoma en análisis (Giese, 1992).

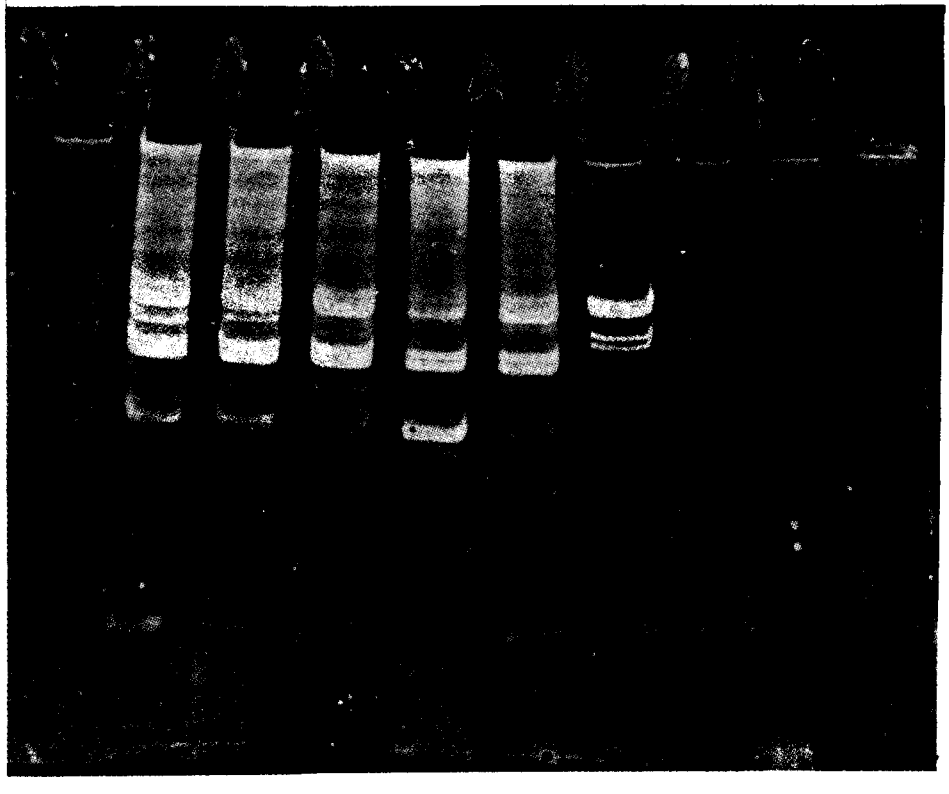

Figura 1. Resultados de la amplificación con el cebador "Universal". De izquierda a derecha: Criollo Quivicán, Nagcarlán, Roma VF, Campbell-28, HC-3880 y Lambda/Hind III

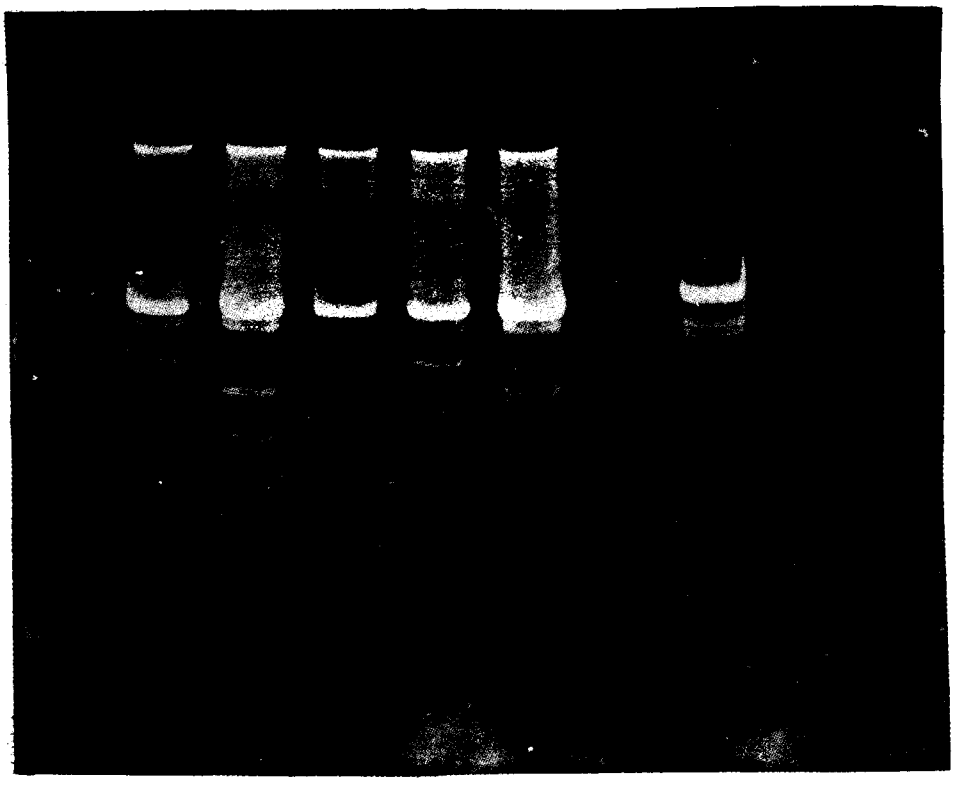

Figura 2. Resultados de la amplificación con el cebador "Reverso". De izquierda a derecha: Criollo Quivicán, Nagcarlán, Roma VF, Campbell-28, HC-3880 y Lambda/Hind III

El uso de marcadores RAPD por sus varias ventajas sobre otros métodos, entre las que se encuentran la rapidez y sencillez, su bajo costo por muestra así como que este método no involucra el uso de sondas radiactivas (D'Ovidio, Tanzarella y Porceddu, 1990), es sin lugar a dudas una alternativa interesante para la detección de polimorfismo genético (Anita Sellstedt *et al.*, 1992; D'Ovidio, Tanzarella y Porceddu, 1990, y Rivas, Belkis Corona y Rojas, 1993) y permite procesar un gran número de muestras en poco tiempo (D'Ovidio *et al.*, 1992). Su utilidad como marcador de resistencia dependerá de la habilidad del investigador de escoger el cebador que verdaderamente esté ligado a características de resistencia.

Nuestros resultados muestran que esta técnica puede ser usada para la detección de polimorfismo genético en el cultivo del tomate (Rivas, Belkis Corona y Rojas, 1993), pero los cebadores usados no revelan diferencias en los patrones que puedan ser atribuidas a características de resistencia al calor. Para esto debe hacerse una inspección más amplia del material en estudio y emplear un número mayor de cebadores para seleccionar aquellos que puedan revelar tales diferencias.

BIBLIOGRAFIA

AVRD. Tomato Physiology. **AVRD Progress Report** (Manila)194-200, 1991.

Dellaporta, S. L., J. Wood y J. B. Hicks. A Plant DNA Minipreparation. Version II. **Plant Molec. Biol. Reporter** (Dordrech)4:19-21, 1983.

D'Ovidio, R., O. A.Tanzarella y E. Porceddu. Rapid and Efficient Detection of Genetic Polymorphism in Wheat Through Amplification by Polimerase Chain Reaction. **Plant Molecular Biology** (Dordrech)15:169-171, 1990.

D'Ovidio, R. */ et al /*. RFLP and PCR Analyses at Gli-1, Gli-2, Gli-1 and Gli-3 Loci in cultivated and Wild Wheats. **Hereditas** 116:79-85, 1992.

Giese, H. The Use of RFLP Markers in Barley Breeding. Barley Genetics / H. Giese.- Copenhagen : Munksgaar International Publisher, t. 2.

Helentjaris, T. / et al. /. Restriction Fragmente Polymorphism as Probes for Plant Diversity and Their Development as Tools for Applied Plant Breeding. **Plant Molecular Biology** (Dordrech)5:109-118, 1985.

Laurie, D. A. DNA Marker Technique for Genetic Analyses in Barley. / D. A. Laurie, J. W. Snape, M. D. Gale.- **En**: Barley Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology.- Wageningen : CAB International, 1992.- p 116-130.

Paran, I., R. Kesseli, R. Michelmore. Identification of Restriction Fragment Length Polymorphism and Random Amplified Polymorphic DNA Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes en Lettuce, Using Near-Isogenic Lines. **Genome** 34:1021-1027, 1991.

Rivas, D., Belkis Corona y R. Rojas. Detección de polimorfismo genético en cinco variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) usando la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios (PCR-AP). **Rev. Salud Animal** (en prensa), 1993.

Sellstedt, Anita / *et al/*. Identification of Casuarina-Frankia Strains by Use of Polimerase Chain Reaction (PCR) With Arbitrary Primers. **FEMS Microbiology Letters** (Amsterdam)93:1-6, 1992.

Recibido: 18 de enero de 1994
Aceptado: 21 de enero de 1994