

EMPLEO DE MARCADORES RAPD PARA EL ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN GENOTIPOS DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum*, Mill.)

J. P. Mukandama[✉], Belkis Peteira y María C. González

ABSTRACT. In the National Center of Agricultural Health (CENSA), seeds from six possible tomato radiomutants with their respective donating varieties were sown in glasshouses, with the objective of evaluating their genetic variability by means of RAPD markers. The 14 primers used generated 80 polymorphic bands, determining a total of 90 bands. These results suggest the existence of a great genetic diversity inside the analyzed material, molecularly differing four genotypes from their respective donating varieties.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, genetic variation, genetic markers, RAPD

RESUMEN. En el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), se sembraron en condiciones semicontroladas seis posibles radiomutantes de tomate con sus respectivos donantes, con el objetivo de evaluar la variabilidad genética de estos mediante el empleo de marcadores RAPD. Los 14 cebadores utilizados generaron 80 bandas polimórficas, determinando un total de 90 bandas. Estos resultados sugieren la existencia de una gran diversidad genética dentro del material analizado, diferenciándose molecularmente cuatro genotipos de sus respectivas variedades donantes.

Palabras clave: *Lycopersicon esculentum*, variación genética, marcadores genéticos, RAPD

INTRODUCCIÓN

Ha sido demostrada la importancia de los marcadores morfológicos y bioquímicos (1, 2) en la evaluación de las diferencias entre genotipos de tomate, para la discriminación de variedades de esta hortaliza, a través de programas de mejoramiento genético, para su adaptación a las condiciones climáticas. Sin embargo, los marcadores morfológicos y bioquímicos no son capaces de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas, debido a que son resultados de la expresión genotípica, del ambiente y de la interacción entre el genotipo y el ambiente (3), por lo que es imprescindible caracterizar con la mayor acuciosidad posible la diversidad genética que presenta cada colección. Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades (4). En este sentido, un método muy efectivo es la aplicación de marcadores moleculares como RAPD, RFLP, AFLP, etc., que suministran un buen diagnóstico sobre la estructura de las poblaciones silvestres o sobre la diversidad de las colecciones establecidas (5). En el presente trabajo se emplearon los marcadores RAPD,

con el objetivo de corroborar si los genotipos seleccionados, por su alto potencial productivo en condiciones de bajos suministros de agua, se diferencian molecularmente de sus respectivas donantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de los genotipos de tomate seleccionados en condiciones de bajos suministros de agua en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), se colocaron conjuntamente con sus respectivas variedades donantes (Tabla I) en cajuelas con suelo Ferralítico Rojo esterilizado, mantenidas en casa de cristal en condiciones semicontroladas a temperatura de 23°C +/- 2°C y a una humedad relativa entre 80-85 %, con un fotoperíodo natural en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

Tabla I. Relación y origen del material vegetal utilizado

Genotipos	Origen
INCA-9-1	Cruzamiento de Ontario 7710 X Campbell-28 (variedad donante)
R16-300	Irradiación de la variedad INCA-9-1 con 300 Gy de rayos gamma ⁶⁰ Co
R20-300	Irradiación de la variedad INCA-9-1 con 300 Gy de rayos gamma ⁶⁰ Co
R4-300	Irradiación de la variedad INCA-9-1 con 300 Gy de rayos gamma ⁶⁰ Co
R19-500	Irradiación de la variedad INCA-9-1 con 500 Gy de rayos gamma ⁶⁰ Co
Amalia	Cruzamiento y retrocruces entre Campbell-28, Caribe, INCA -3 y HC-2580 (variedad donante)
R15-500	Irradiación de la variedad Amalia con 500 Gy de rayos gamma ⁶⁰ Co
R17-500	Irradiación de la variedad Amalia con 500 Gy de rayos gamma ⁶⁰ Co

J. P. Mukandama, Doctorante extranjero y Dra.C. María C. González, Investigadora Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de Las Lajas, La Habana, CP 32 700; Belkis Peteira, Investigadora Auxiliar del Departamento de Fitopatología, División de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de Las Lajas, La Habana, Cuba.

✉ mukajp@yahoo.fr

A los 30 días de germinadas las semillas, se tomaron las hojas jóvenes y se realizó una extracción de ADN (6) a todo el material vegetal mencionado anteriormente. La calidad del ADN se constató por electroforesis de los extractos en geles de agarosa al 0.8 % y solución amortiguadora de corrida TBE 0.5X (45mM Tris-Borato, 1mM EDTA pH 7), teñidos con bromuro de etidio (5 mg.mL⁻¹) y observados en un transiluminador (Bioblock Scientific). La concentración se estimó por la medición de la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro *Ultrasepec Plus Spectrophotometer* Pharmacia LKB.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 uL que contenía: 10 mM Tris-HCl a pH 8,3; 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.001 % de gelatina, 100uM de cada dNTPs, 5 pmoles de cebador (Kits OPA y OPF de la firma comercial *Operon Technologies*), 100ng de ADN genómico y 2U de Taq ADN polimerasa (Ampligen). La amplificación se produjo en un termociclador marca *Techme* de la firma Progene programado para 45 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 36°C y 2 min. a 72°C, y un ciclo de 10 min. a 72°C. Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en solución amortiguadora TBE 0.5X y se tiñeron con bromuro de etidio, antes de ser observados en un transiluminador. Se informaron los productos de la PCR, tomando las bandas más intensas, como presentes [1] o como ausentes [0] en cada genotipo, creando así una matriz de valores binarios que se analizó a través de la aplicación del software computacional CLATAX (7), para determinar el grado de similitud utilizando el coeficiente de similitud de Nei y Li (8), entre el material genético analizado, para luego construir un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA por medio del paquete STATISTICA (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir del análisis molecular basado en los 14 cebadores empleados, se puso de manifiesto que estos generaron 90 bandas producto de la amplificación (Tabla II), de las cuales 80 fueron polimórficas para un promedio de 5.7 bandas por cebador. Es de destacar que casi la totalidad de los cebadores usados fueron muy informativos, con excepción del OPA 13, que no detectó polimorfismo entre el material genético estudiado.

El cebador OPA 12 y todos los cebadores OPF, excepto OPF 01, alcanzaron el 100 % de bandas polimórficas, resultando útiles en la determinación de polimorfismo. Se destacó el cebador OPF 13 por el gran número de bandas generadas, de las cuales el 100 % fueron polimórficas. De acuerdo con la literatura consultada, los porcentajes de polimorfismo genético alcanzados en este trabajo son altos, en comparación con los que se han obtenido normalmente en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), mediante los marcadores morfoagronómicos y bioquímicos (2, 10), marcadores de RAPD (3, 11) y por medio de otros marcadores moleculares (12, 13, 14).

Tabla II. Cantidad de bandas totales y polimórficas detectadas en el ensayo de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y porcentajes de polimorfismo

Cebador	Secuencia	Total de bandas	Bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
OPA 02	TCCCAGCTG	6	3	50
OPA 03	AGTCAGCCAC	5	4	80
OPA 12	TCGGCCATAG	4	4	100
OPA 13	CAGCACCCAC	5	0	0
OPF 01	ACGGATCCTG	9	8	88
OPF 03	CCTGATCACC	5	5	100
OPF 04	GGTGATCAGG	4	4	100
OPF 05	CCGAATTCCC	5	5	100
OPF 06	CGGAATTCCG	9	9	100
OPF 07	CCGATATCCC	3	3	100
OPF 10	GGAAGCTTGG	8	8	100
OPF 13	GGCTGCAGAA	14	14	100
OPF 14	TGCTGCAGGT	4	4	100
OPF 15	CCAGTACTCC	9	9	100

Con el procedimiento no-jerárquico (K-means) del Análisis de Conglomerados, basado en los índices de similitud, se identificaron al menos dos grupos de diferente diversidad genética (Figura 1): el primer grupo formado por el genotipo R17-500 y su variedad donante Amalia y el segundo por el resto de los genotipos analizados. Este último grupo se dividió a su vez en tres subgrupos, donde el genotipo R19-500 y su variedad donante INCA-9-1 integraron el primer subgrupo, los genotipos R15-500 y R20-300 formaron el segundo subgrupo y el tercero estuvo compuesto por R16-300 y R4-300.

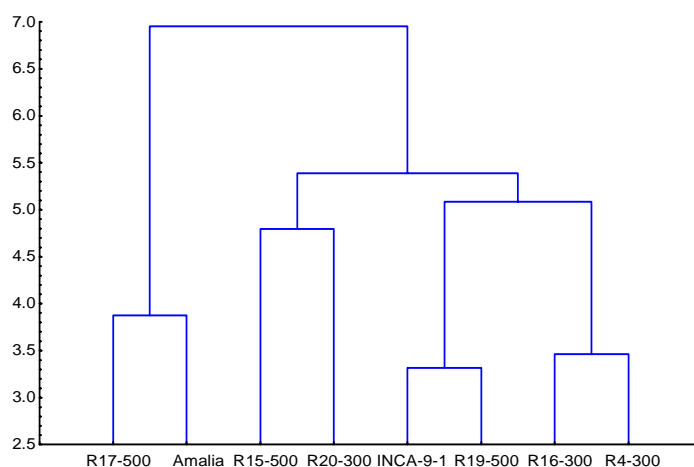


Figura 1. Dendrograma derivado de las distancias genéticas en el material vegetal analizado

Las similitudes encontradas entre R17-500 y R19-500, y sus respectivas variedades donantes Amalia e INCA-9-1, pudieran deberse a que los cebadores empleados en este estudio conllevan a no esclarecer la situación, al no amplificar otras regiones que acentúan más las diferencias, ya que los marcadores RAPD son dominantes porque solo se amplifica un producto o variante alélica: aquel que cumple los requisitos de complementariedad entre el cebador y las cadenas de ADN a una distancia=2 kb (15).

Se pudo observar, además, que los genotipos R15-500 y R20-300 (derivados de Amalia e INCA-9-1, respectivamente), manifestaron un comportamiento similar, aspecto que pudiera relacionarse con lo anteriormente expuesto (15) y/o el origen de ambas variedades donantes (Tabla I). Sin embargo, los genotipos R15-500, R20-300, R16-300 y R4-300 se diferenciaron molecularmente del resto de los genotipos y de las variedades donantes, por lo que se corroboró que el genotipo R15-500 es radiomutante de la variedad Amalia y R20-300, R16-300 y R4-300 son radiomutantes de la variedad INCA-9-1, comprobándose la efectividad de la selección realizada para la obtención de dichos genotipos potencialmente productivos en condiciones de bajos suministros de agua.

Se debe significar que el alto grado de polimorfismo molecular detectado en este trabajo, mediante el empleo de RAPD, corrobora las diferencias alcanzadas en las evaluaciones morfoagronómicas efectuadas entre los mismos genotipos y las variedades donantes y el resto de los genotipos analizados, en condiciones de campo (16, 17), lo que demuestra la importancia de los marcadores RAPD, para la detección de variabilidad genética en el cultivo del tomate, resultando los más informativos aquellos cebadores como: OPA 12, OPF 03, OPF 04, OPF 05, OPF 06, OPF 07, OPF 10, OPF 13, OPF 14 y OPF 15, los cuales podrían ser utilizados para la selección de caracteres agronómicos e identificar variaciones en la secuencia del ADN entre individuos. Estos resultados ponen de manifiesto la efectividad de los rayos gamma ^{60}Co para generar variabilidad genética; comportamientos similares se han obtenido en el cultivo del arroz (18, 19) y en *Musa* spp (20). El uso directo de mutaciones ha sido de gran valor para los cultivadores de planta, particularmente cuando se desea mejorar algunas características específicas, a fin de extender la vida agrícola de buenas variedades (21). Muchas variedades derivadas de la utilización directa de mutaciones inducidas en trigo, cebada, arroz, frijol, caña de azúcar, etc., han demostrado que características tales como talla baja, precocidad, resistencia a ciertas enfermedades, tolerancia a la salinidad y calidad, son inducidas en las variedades bien adaptadas sin variar significativamente sus demás atributos. En el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), se han obtenido somaclones resistentes a distintas enfermedades y se continúa investigando en la selección de plantas que superen al donante en rendimiento y adaptación a diferentes épocas del año (22).

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en este trabajo permiten reafirmar el poder de la técnica de RAPD, para el estudio de la diversidad en la secuencia de una población y corroboran la efectividad del uso de rayos gamma ^{60}Co , para la inducción de variabilidad genética y la selección realizada para la obtención de genotipos de tomate con alto potencial productivo en condiciones de bajos suministros de agua.

REFERENCIAS

1. Solís, A.; Martínez, R.; Pupo, J.; Cabrera, F. y Parra R. Caracterización de germoplasma de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill) con vistas a la implementación de un programa de fitomejoramiento participativo. *Cultivos Tropicales*, 2001, vol. 22, no. 2, p. 33-37.
2. Florido, M.; Álvarez, M.; Lara, R. M.; Plana, D.; Valera, M.; Shagarodsky, T. y Moya, C. Caracterización morfoagronómica y bioquímica de 20 accesiones de tomate (*Lycopersicon* spp). *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 4, p. 61-69.
3. Peteira, B.; Fernández, E.; González-Chávez, M.; Shagarodsky, T. y Miranda, I. Aplicación de marcadores RAPD al estudio de la diversidad genética en variedades de tomate y especies salvajes relacionadas en Cuba. *Rev. Protección Veg.*, 2001, vol. 16, no. 2-3, p. 84-91.
4. Weising, K.; Ramser, J.; Kaemer, D. y Kahl, G. Multilocus DNA fingerprinting on genetic relatedness in plants. A case study with banana and tomato. *Molecular Ecology and Evolution. Approaches and applications*. 1994.
5. Saavedra, G.; Spoor, W. y Harrier, L. Molecular markers and genetic base broadening in *Lycopersicon* spp. *Acta Hort.* (ISHS), 2001, vol. 546, p. 503-507.
6. Dellaporta, S. L.; Wood, J. y Hichs, J. B. A plant molecular DNA minipreparation, version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1983, vol. 1, p. 19-21.
7. CENSA. CLATAX, Software para la clasificación taxonómica. Departamento de Matemática, Edición 1.0 para Windows 95. 1999.
8. Nei, M. y Li, W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, p. 5267-5273.
9. StatSoft, Inc. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, 1998.
10. Gómez, O.; Casanova, A.; Laterrot, H. y Anaís, G. Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. La Habana: Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". 2000, 159 p.
11. Miranda, E. Estudio preliminar de la variabilidad genética en el género *Lycopersicon* mediante el empleo de marcadores RAPD. [Trabajo de diploma]. Universidad de La Habana, 1997.
12. Kaemmer, D.; Weising, K.; Beyerman, B.; Borner, T.; Eplen, J. T. y Kahl, G. Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant. Breed.*, 1995, vol. 114, p. 12-17.
13. Vosman, B.; Cooke, R., Ganal, M.; Peeters, R.; Isaac, P. y Bredimeijer, G. Standardization and application of microsatellite markers for variety identification in tomato and wheat. *Acta Hort.* (ISHS), 2001, vol. 546, p. 307-316.
14. Vosman, B. The use of molecular markers for the identification of tomato cultivars. New York: Chapman & Hall, 1998, 287 p.
15. Rodríguez, M. y Arencibia, A. Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. En: Marcadores moleculares: Nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. La Habana: Editorial Félix Varela, 2002, p. 13-35.
16. Álvarez, M. /et al./ Obtención de nuevos genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) por métodos biotecnológicos y nucleares con tolerancia a estrés bióticos y abióticos. Informe Final de Proyecto CITMA (Código 300075). 1999.

17. Mukandama, J. P.; González, M. C.; Suárez, L. y Alvarez, Y. Incremento de alto potencial productivo en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por rayos gamma ^{60}Co en condiciones de sequía agrícola. Alimentario. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, 2003, no. 340, p. 95-98.
18. Álvarez, A.; Fuentes, J. L.; Deus, J. E.; Duque, M. C. and Cornide, M. T. Genetic diversity analysis in rice mutants using isozyme and morphological markers. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 4, p. 39-44.
19. González, L. M. Uso de la radioinducción de mutaciones en la obtención de genotipos de arroz tolerantes a la salinidad. [Tesis de doctorado]; ISCAH, 1996.
20. Peteira, B.; Finalet, J. A.; Fernández, E.; Sánchez, I. y Miranda, I. Caracterización de la variabilidad genética en *Musa* spp. con la utilización de marcadores RAPD. *Rev. Protección Veg.*, 2003, vol. 18, no. 2, p. 112-118.
21. Ortega, J. Uso de técnicas nucleares y biotecnológicas para la obtención de nuevas variedades de gladiola (*Gladiolus* sp.). Doctorado en Biotecnología de Plantas. Universidad Veracruzana, Córdoba, Ver. 1998.
22. Xiqués, X.; Román, M. I.; Morales, C.; González, C.; Santana, N. y González, A. Caracterización citogenética de somaclones de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Rev. Biología*, 1998, vol. 12, p. 51-56.

Recibido: 15 de julio de 2003

Aceptado: 11 de marzo de 2004

Cursos de Verano

Precio: 320 USD

Uso de técnicas biotecnológicas y nucleares en el mejoramiento genético para la tolerancia al estrés abiótico

Coordinador: Dra.C. María C. González Cepero
Fecha: 1 al 5 de julio

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (64) 6-3773
Fax: (53) (64) 6-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu