

Empleo de los marcadores *AFLP* para la caracterización molecular de dos cultivos con interés agrícola

Luis E. Rojas^{1*}, Jorge López², Rafael G. Kosky¹, Orelvis Portal¹. * Autor para correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km. 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830. e-mail: luis@ibp.co.cu

²Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53 000, Villa Clara, Cuba.

RESUMEN

La técnica de *AFLP*, está basada en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) y consta de cuatro etapas fundamentales; digestión con enzimas de restricción del ácido desoxirribonucleico (ADN), ligazón de los adaptadores con los fragmentos de ADN, amplificación de los fragmentos obtenidos en la etapa anterior empleando combinaciones de cebadores selectivos y detección del polimorfismo utilizando radioisótopos, colorantes fluorescentes o tinción de plata. Se utiliza ampliamente en la evaluación de diversidad genética, análisis de distancia genética, huella identificadora de ADN, análisis de colecciones de germoplasma, construcción de mapas genéticos y seguimiento de marcadores de diagnóstico. Con el objetivo de caracterizar molecularmente dos especies de cultivos con interés agrícola (caña de azúcar y plátano) se generaron marcadores *AFLP*. Se demostró la capacidad para identificar variaciones en el genoma de los cultivos estudiados.

Palabras clave: caña de azúcar, *Musa*, 'Navolean', *Saccharum officinarum*

ABSTRACT

The *AFLP* technique is based on the selective amplification of restriction fragment by polymerase chain reaction (*PCR*) and consists of four basic steps; digestion with restriction enzymes of deoxyribonucleic acid (DNA), adapter ligation with fragments of DNA and amplification of the fragments obtained in the earlier steps using combinations of selective primers and detection of polymorphism using radioisotopes, fluorescent dyes or silver staining. It is widely used in the evaluation of genetic diversity, analysis of genetic distance, DNA fingerprint, germoplasm collections analysis, genetic maps construction and markers diagnostic monitoring. In order to characterize molecularly two species of crops with agricultural interests (sugar cane and banana) were generated *AFLP* markers. In this study was demonstrated the ability to identify variations in the genome of crops studied.

Key words: *Musa*, 'Navolean', *Saccharum officinarum*, sugarcane

INTRODUCCION

La técnica de *AFLP* (del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphic*, Vos *et al.*, 1995) está basada en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*). Es una técnica muy sensible para caracterizar el ácido desoxirribonucleico (ADN) cualquiera sea su origen y su complejidad, puede ser aplicado con ADN genómico total o con ADN complementario (perfiles de transcripción). Los *AFLP* permiten una exploración rápida de los polimorfismos del genoma entero al generar un gran número de marcadores, y cada uno de ellos da una huella identificadora de ADN sumamente informativa, estos marcadores son altamente reproducibles, no se necesita información previa de las secuencias ni hay que generar sondas de hibridación. La base molecular de los polimorfismos de *AFLP* generalmente se origina en los nucleótidos, se detectan cambios de un solo nucleótido cuando: (1)

se afectan los propios sitios de restricción; y (2) se afectan los nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción, lo que hará que los cebadores hibriden erróneamente en el extremo 3' impidiendo la amplificación. La mayoría de los marcadores de *AFLP* son de tipo mono-alélico, lo que significa que sólo se podrá registrar un alelo porque el complementario no se detecta.

Todos los métodos de mejoramiento genético y propagación masiva, que de una forma u otra pueden introducir variaciones en el genoma de las plantas, así como los estudios de diversidad genética, requieren de herramientas moleculares capaces de detectar cambios genómicos.

Teniendo en cuenta la versatilidad de estos marcadores *AFLP*, el objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente dos especies de plantas en la búsqueda de variaciones en su genoma mediante marcadores *AFLP*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

- Plantas adultas de plátano del cultivar 'Navolean' (*Musa*AAB) del segundo ciclo de cosecha, obtenidas por: embriogénesis somática a partir de brotes de yemas axilares, embriogénesis somática a partir de multiyemas y organogénesis a partir de ápices. Además, se incluyó un control referido a la propagación por cormos.
- Mutantes de caña de azúcar obtenidos de la variedad 'SP 70-1284' susceptible a la roya de la caña, seleccionados en campo, durante cinco multiplicaciones clonales que mostraron resistencia a la enfermedad y cuyo fenotipo era similar a la original.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic)

La técnica de AFLP se realizó mediante el protocolo de Vos *et al.* (1995), adaptado para trabajo no

radioactivo. Para la extracción del ADN (mediante el sistema comercial de Qiagen) se tomaron segmentos de hojas jóvenes de las plantas. El ADN se diluyó en agua hasta 100ng y se realizó la digestión con las enzimas de restricción *EcoR* I de corte raro y *Tru*9 I de corte frecuente. Los adaptadores se ligaron con los fragmentos obtenidos en la digestión durante toda la noche a 16°C y de esta mezcla se tomaron 5 µl para la primera amplificación con cebadores que contenían adenina en el extremo 3' como base selectiva, una dilución 1/20 en agua del resultado de esta amplificación fue usada para la segunda amplificación donde se utilizaron cebadores con tres bases selectivas cada uno. Las bandas obtenidas se visualizaron en un gel de poliacrilamida al 6% que fue teñido con plata usando el sistema comercial *Silver sequence*TM *DNA sequencing System* (Promega). Estas bandas se analizaron visualmente y los datos obtenidos se introdujeron en el programa estadístico NtSys PC 2.02 (Rohlf, 1998) para determinar las similitudes genéticas mediante el coeficiente DICE (Dice, 1945). Este procedimiento se siguió para los dos cultivos.

Adaptadores y cebadores usados en la reacción de preamplificación y amplificación.

EcoR I

Adaptador	5' CTCGTAGACTGCGTACC 3' 3' CATCTGACGCATGGTTAA 5'
Cebador de preamplificación Cebador de amplificación	5' GACTGCGTACCAATTCa 3' 5' GACTGCGTACCAATTCaNN 3'

Tru 9 I

Adaptador	5' GACGATGAGTCCTGAG 3' 3' TACTCAGGACTCAT 5'
Cebador de preamplificación Cebador de amplificación	5' GATGAGTCCTGAGTAAa 3' 5' GATGAGTCCTGAGTAaNN 3'

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Plátano 'Navolean' (*Musa* AAB)

Mediante las cuatro combinaciones de cebadores (Tabla 1) se obtuvieron en total 303 marcadores, de ellos dos polimórficos, estos se encontraron en las muestras referidas a las plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de yemas y las obtenidas por embriogénesis somática a partir de multiyemas.

Utilizando los datos de similitud genética se obtuvo el dendograma (Figura 1), donde las cuatro muestras fueron agrupadas. Por un lado, con un nivel de similitud genética de 1.0, aparecen las muestras propagadas por cormos (CC) y por organogénesis a partir de ápices (CCT) y en un segundo grupo con un nivel de similitud menor a uno se observan las muestras de las plantas obtenidas por embriogénesis somática a partir de multiyemas (MY) y por embriogénesis somática a partir de yemas brotadas (Y). Esto indica que los métodos biotecnológicos empleados no provocaron cambios significativos en el genoma de las plantas estudiadas. Estos valores demuestran que el material vegetal mantiene un alto

grado de estabilidad genética, lo cual concuerda con las observaciones obtenidas al evaluar durante dos ciclos de cultivo poblaciones de campo propagadas por estos métodos, a partir de descriptores morfológicos para la especie en estudio (López *et al.*, 2005).

Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* 'SP 70-1284')

A través de seis combinaciones de cebadores (Tabla 2) se obtuvieron en total 700 marcadores, de ellos 13 polimórficos, 10 de estas bandas se localizaron en el mutante 7. Utilizando los datos de similitud genética se obtuvo el dendograma (Figura 2), donde los tres mutantes y el donante ('SP 70-1284') fueron agrupados. Por un lado con un nivel de similitud genética de 1.0 aparecen los mutantes 2, 3 y la variedad donante ('SP 70-1284') y en un segundo grupo compuesto por el mutante 7 cuyo nivel de similitud fue menor a uno (0.99). Estos marcadores polimórficos encontrados, pueden considerarse cambios genéticos, pero no necesariamente tienen que estar relacionados con la resistencia a la roya de la caña de azúcar mostrada por los mutantes.

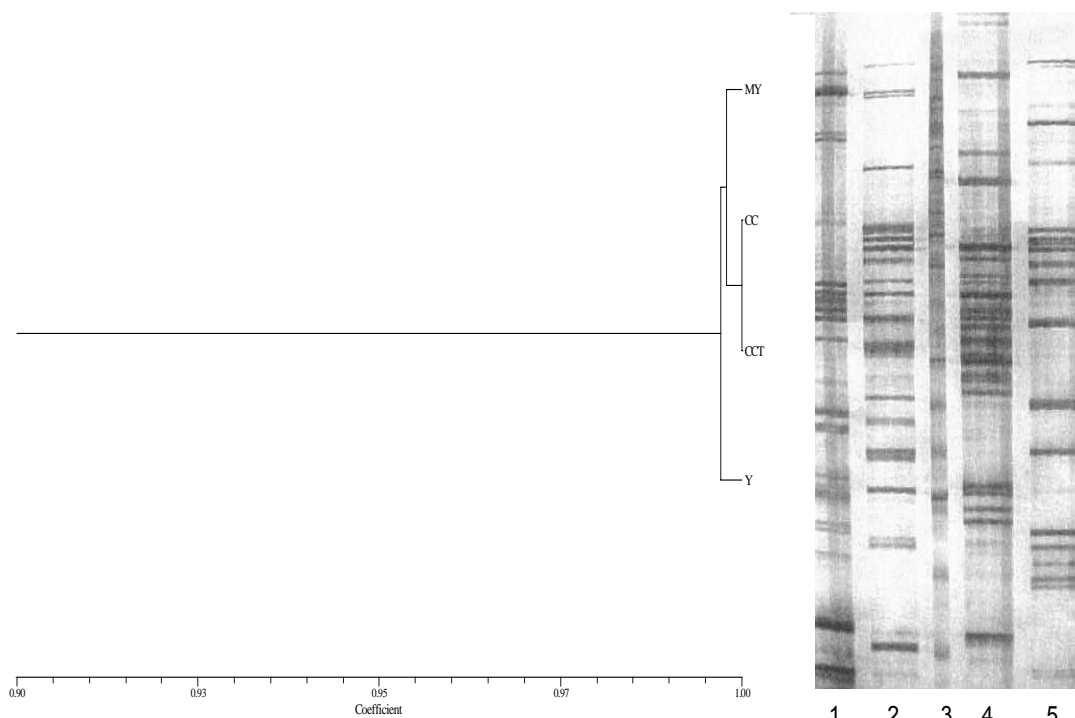
Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* 'SP 70-1284')

A través de seis combinaciones de cebadores (Tabla 2) se obtuvieron en total 700 marcadores, de ellos 13 polimórficos, 10 de estas bandas se localizaron en el mutante 7. Utilizando los datos de similitud genética se obtuvo el dendograma (Figura 2), donde los tres mutantes y el donante ('SP 70-1284') fueron

agrupados. Por un lado con un nivel de similitud genética de 1.0 aparecen los mutantes 2, 3 y la variedad donante ('SP 70-1284') y en un segundo grupo compuesto por el mutante 7 cuyo nivel de similitud fue menor a uno (0.99). Estos marcadores polimórficos encontrados, pueden considerarse cambios genéticos, pero no necesariamente tienen que estar relacionados con la resistencia a la roya de la caña de azúcar mostrada por los mutantes.

Tabla 1. Combinaciones de cebadores *EcoR* I /*Tru9* I, número de marcadores totales y polimórficos obtenidos de las plantas de plátano 'Navolean' (*Musa* AAB) estudiadas.

Combinaciones de cebadores	Marcadores totales	Marcadores polimórficos
<i>EcoR</i> I/ <i>agg:Tru9</i> I/ <i>agt</i>	71	
<i>EcoR</i> I/ <i>aca:Tru9</i> I/ <i>atg</i>	55	
<i>EcoR</i> I/ <i>aca:Tru9</i> I/ <i>acc</i>	92	1 (Multiyemas)
<i>EcoR</i> I/ <i>ata:Tru9</i> I/ <i>acc</i>	85	1 (Yemas brotadas)
Total	303	2
Porcentaje de bandas polimórficas		0.66



1. MY (Embriogénesis somática a partir de multiyemas).
2. Y (Embriogénesis somática a partir de yemas brotadas).
3. CC (Propagación por cormos).
4. CCT (Organogénesis a partir de ápices).
5. O'RangeRuler™ DNA Ladder 100 bp, Fermentas.

Figura1. Dendograma resultado del análisis de clasificación jerárquica ascendente de las cuatro muestras de las plantas de plátano 'Navolean' (*Musa*AAB) estudiadas, y foto del gel con las muestras amplificadas mediante la técnica de AFLP.

Tabla 2. Combinaciones de cebadores *EcoR* I /*Tru9* I, número de marcadores totales y polimórficos obtenidos de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* 'SP 70-1284').

Combinaciones de cebadores	Marcadores totales	Marcadores polimórficos
<i>EcoR</i> I/aca : <i>Tru9</i> I/agg	98	2 (mutante 7)
<i>EcoR</i> I/aca : <i>Tru9</i> I/atg	117	2 (mutante 7)
<i>EcoR</i> I/agg : <i>Tru9</i> I/atg	139	1 (mutante 3) y 1 (mutante 2)
<i>EcoR</i> I/agg : <i>Tru9</i> I/agt	129	3 (mutante 7)
<i>EcoR</i> I/ata : <i>Tru9</i> I/acc	125	2 (mutante 7) y 1 (mutante 2)
<i>EcoR</i> I/ata : <i>Tru9</i> I/agt	92	1 (mutante 7)
Total	700	13
Porcentaje de bandas polimórficas		1.86

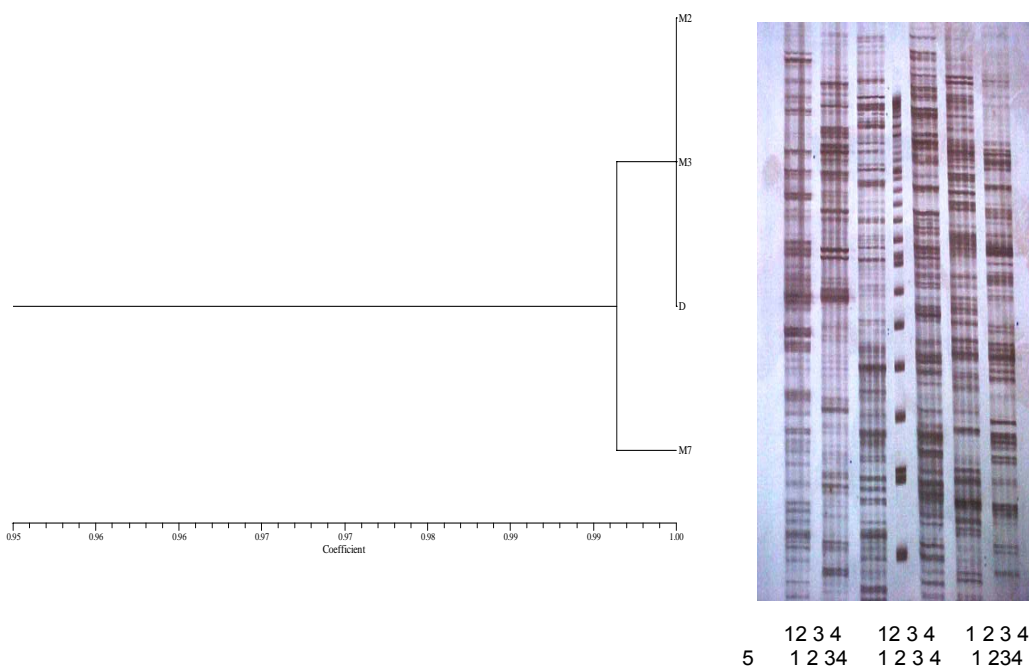


Figura 2. Dendrograma resultado del análisis de clasificación jerárquica ascendente de las muestras de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* 'SP 70-1284') estudiadas y foto del gel con las muestras amplificadas mediante la técnica de AFLP

- 1- M2 (Mutante 2).
- 2- M3 (Mutante 3)
- 3- M7 (Mutante 7)
- 4- D (Donante SP 70-1264)
- 5- O'RangeRuler™ DNA Ladder 50 bp, Fermentas

CONCLUSIONES

Para caracterizar molecularmente las especies de *Musa* spp. y *Saccharum officinarum* la técnica de marcadores tipo AFLP resultó ser adecuada pues al usar varias combinaciones de cebadores se pudo visualizar un gran número de bandas.

REFERENCIAS

Dice LR (1945) Measures of amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302

López J, R Gómez, A Rayas, N Montano, D Reinaldo, R Trujillo, M Cabrera, A Santos, J Ventura, V Medero, M García, M Basail, A Cantero, J Albert (2005) Embriogénesis somática en el cv. 'Navolean' a partir de ápices de brotes de yemas axilares. Biotecnología vegetal 5(2): 109-113

Rohlf, FJ (1998) NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.02 Exeter Publishing, Setauket, NY.

Vos, P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T Van De Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kupier, M Zabeau (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414