

Uso de marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) para evaluar la variabilidad genética en 7 cultivos de *Jatropha curcas* L

Luis Alberto Williams*, Eleazar Ramos* y Lourdes Callejas**

Resumen. - En este estudio se aplicó la técnica molecular RAPD para evaluar la variabilidad existente a nivel de genoma en una colección de plantas de *Jatropha curcas* L. correspondiente a 7 cultivares. El ADN de cada planta fue extraído por el método Möller y luego amplificado al azar con diferentes primers para identificar polimorfismos los cuales fueron usados como marcadores genéticos (marcadores RAPDs). Los 10 primers usados generaron un total de 54 marcadores, de los cuales 12 establecieron diferencias entre cultivares. El dendograma obtenido de los análisis de agrupamiento según distancias genéticas reveló poca variación en los 6 cultivares importados y un alto grado de variabilidad genética en el caso del cultivar "Nicaragua".

Introducción

El banco de germoplasma de la UNAN-León contiene una colección de plantas de *Jatropha curcas* o tempate (cultivo de importancia industrial como fuente de combustible bio-diesel) provenientes de diferentes localidades de Nicaragua, y también importadas de otros países. Con el fin de evaluar la variabilidad genética existente en esta colección, se aplicó a genotipos representativos de este germoplasma la técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Esta herramienta de Biología Molecular, basada en la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), simplifica la identificación de polimorfismos o marcadores de ADN al amplificar fragmentos de ADN genómico con un solo primer corto (10 nucleótidos de largo) de secuencia

arbitraria, lo que incrementa la posibilidad de encontrar al azar muchas

Regiones del genoma que sean complementarias al primer. Si en estos sitios ha ocurrido una sustitución, delección o inserción, la amplificación de los mismos no se lleva a cabo, generándose un polimorfismo que indica variación en la información genética. Los productos de amplificación son detectados sobre el gel de electroforesis como un patrón de bandas, producido por la separación de los fragmentos de ADN de diferentes tamaños. Una banda de ADN presente en un individuo y ausente en otro constituye un polimorfismo que se denomina *Marcador RAPD* (Williams *et al.*, 1990).

Los resultados generados con el uso de estos marcadores permiten, no sólo

* Investigadores UNAN-León.

identificar genotipos individuales, sino también conocer la medida de la variación de un germoplasma, lo que hace más eficiente la selección de material vegetal en los programas de mejora genética.

Materiales y métodos

Las muestras de *Jatropha curcas* L. obtenidas del banco de germoplasma corresponden a 51 plantas pertenecientes a siete cultivares: Nicaragua (27 genotipos), Cabo Verde (11), Tailandia (3), Madagascar (3), México (3), El Salvador (3) y la India (1). De cada planta se recolectaron hojas jóvenes que fueron liofilizadas y pulverizadas; luego se les extrajo el ADN por el método Möller para, posteriormente, amplificarlo usando la

técnica RAPD y finalmente, con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico correspondiente.

Extracción del ADN: Los componentes celulares son liberados con un buffer de extracción; las proteínas y demás restos celulares son eliminados por centrifugación, inicialmente con proteinasa y luego con sales a altas concentraciones, separando así el ADN de la solución. Las sales y otros contaminantes son removidos del sobrenadante con alcoholes, que también concentran y precipitan el ADN. El ADN sedimentado es secado, resuspendido en buffer y tratado con ARNasa para, finalmente, conservar las muestras a -20°C (Möller *et al.*, 1992) (ilustración 1)

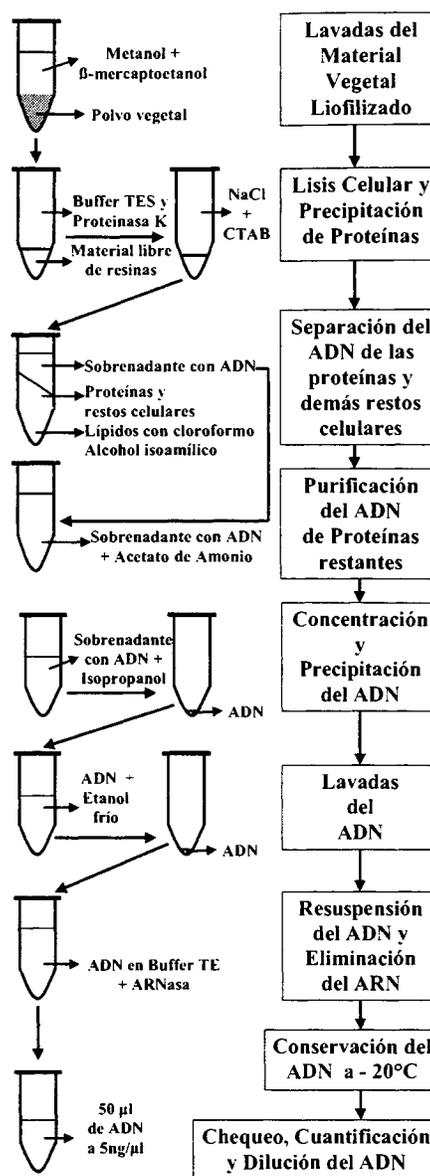


Ilustración 1.- Proceso de Extracción del ADN total por el método Möller.

Amplificación del ADN. Este proceso se realiza en un termociclador en el que la muestra de ADN (mezclada con H₂O, buffer PCR, MgCl₂, 4dNTPs, primer y la enzima *Taq* polimerasa) es sometida a 45 ciclos de temperatura, cada uno de los cuales incluye: la desnaturalización del ADN a 92°C, la hibridación del primer con el ADN a 42°C y la exten-

sión del fragmento de ADN a 72°C. Los fragmentos amplificados son separados por electroforesis (2 horas a 180V) en un gel de agarosa 1.4%, que luego se tiñe con bromuro de ethidium para visualizar el ADN y fotografiarlo sobre una lámpara UV (260 nm) (Williams *et al.*, 1990). (ilustración 2)

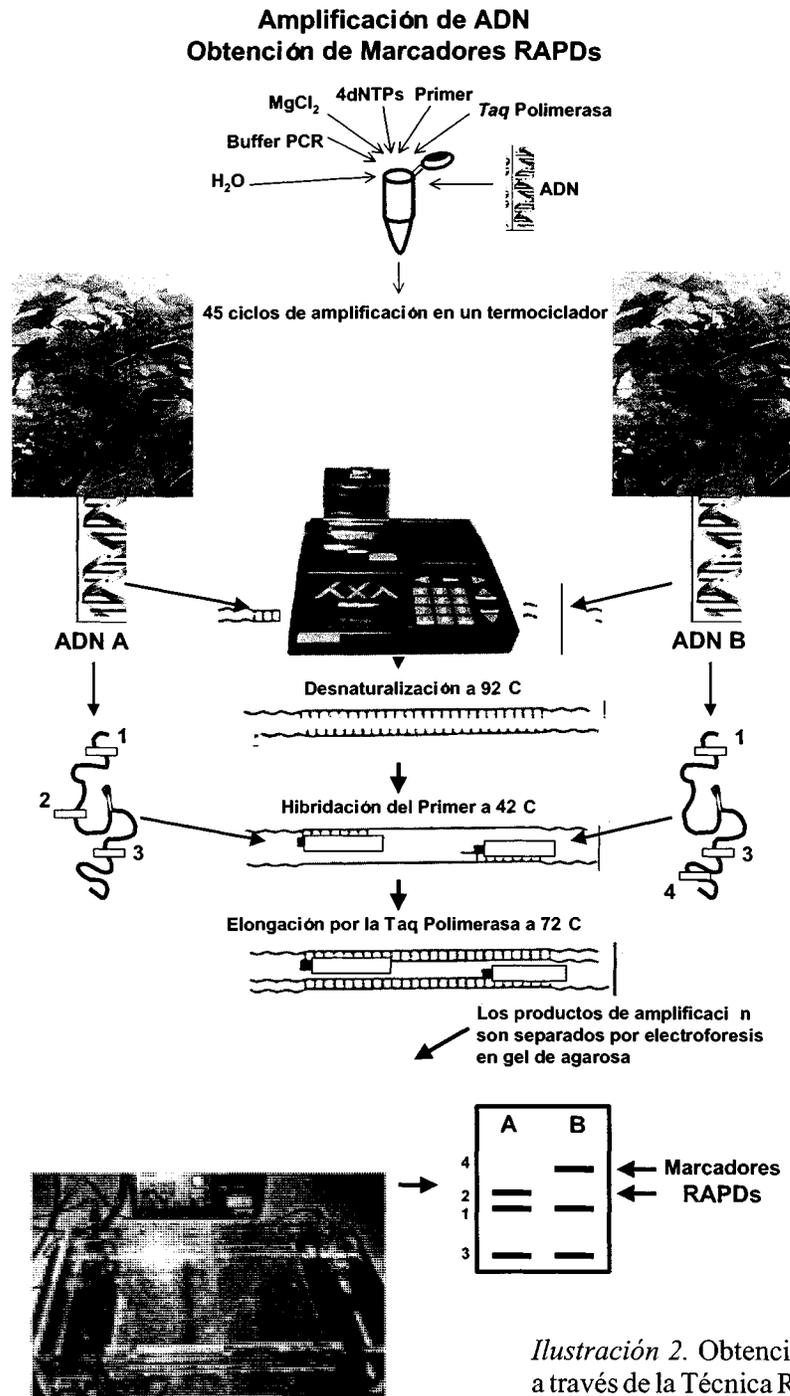


Ilustración 2. Obtención Marcadores a través de la Técnica RAPD.

Análisis estadístico. Con los marcadores RAPDs obtenidos se construye una matriz presencia-ausencia con la que se calcula la similitud entre genotipos, usando el índice de Jaccard para agrupar las muestras según sus distancias genéticas por el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Average*), produciéndose así el correspondiente dendograma (Stiles *et al.*, 1993). Estos cálculos se efectuaron usando el paquete estadístico NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*).

Resultados y discusión

De 14 primers ensayados de forma preliminar en cinco genotipos, 10 fueron seleccionados por su capacidad

de generar polimorfismos y patrones de bandas bien definidos, para amplificar el ADN de las 51 muestras de *Jatropha curcas* evaluadas en el estudio. Los fragmentos amplificados por estos primers fueron detectados como bandas que variaban en intensidad y posición; a partir de las bandas más obvias (con suficiente intensidad y cuya ubicación en el gel podía ser fácilmente reconocida con la ayuda de un marcador de ADN Ladder), se estableció un patrón específico para cada primer (ilustración 3).

Con los patrones establecidos se definieron un total de 73 fragmentos o productos de amplificación de peso molecular variable (entre 344 y 2036 pb). El número promedio de fragmentos amplificados por primer fue de siete, con un rango de 3-13. (cuadro 1).

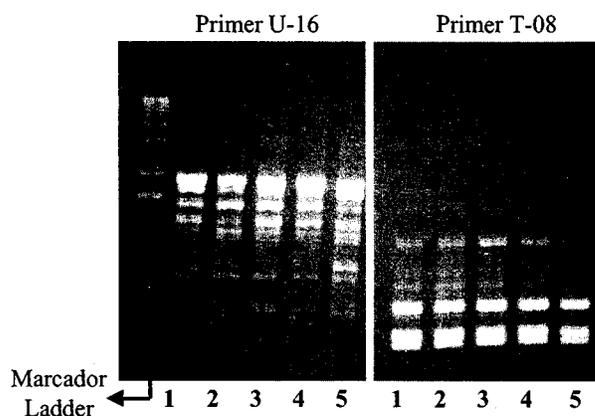


Ilustración 3.- Patrón de bandas de ADN que generaron dos primers distintos en los mismos 5 genotipos de *Jatropha curcas*

Cuadro 1
SECUENCIA DE LOS 10 PRIMERS EMPLEADOS EN LAS REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN

Nombre del Primer	Secuencia de nucleótidos 5' a 3'	Número de Productos de Amplificación Generados
J-14	CACCCGGATG	5
H-18	GAATCGGCCA	3
F-01	ACGGATCCTG	6
P-08	ACATCGCCCA	10
Y-14	GGTCGATCTG	4
U-16	CTGCGCTGGA	13
C-18	GAGAGCCAAC	7
N-12	CACAGACACC	8
T-08	AACGGCGACA	5
N-09	TGCCGGCTTG	12
	Total	73

Para que se amplifique un fragmento de ADN genómico es necesario que en sus extremos sobre las cadenas opuestas existan secuencias complementarias al primer empleado en la reacción y que además, estén orientadas de forma inversa y separadas por una distancia amplificable (200-2000 bp). Esta distancia es la que determina el tamaño del fragmento (Phillips *and* Vasil, 1994:453).

El hecho de utilizar primers cortos en la técnica RAPD, incrementa la posibilidad de encontrar varios sitios complementarios en el genoma y con diferentes distancias amplificables (Tingey *and* del Tufo, 1993), por lo que se producen fragmentos de distintos pesos moleculares que se visualizan en el gel de agarosa como patrones de bandas de variada intensidad y posición específica. La variación en intensidad se debe al hecho de que, por el tipo de

enlace débil que establece la asociación primer-ADN genómico, se pueden dar algunas asociaciones que no sean 100% complementarias, de tal manera que se ejerce una competencia entre los sitios alternativos a los que el primer puede unirse, originando un gran número de productos de amplificación a partir de los sitios con perfecto apareamiento y un reducido número a partir de los sitios con apareamiento imperfecto (Gallego, 1994:63).

Cuando el mismo fragmento amplificado aparece en todos los genotipos evaluados se denomina "banda monomórfica"; por el contrario, si el fragmento está presente para determinado(s) genotipo(s) y está ausente para otro(s) se denomina "banda polimórfica" o marcador RAPD y es el que se utiliza para medir la variación genética (Williams *et al.*, 1990). De los 73 productos de

amplificación generados con los 10 primers seleccionados, 19 fueron monomórficos (se presentaban en las 51 plantas) y 54 constituyeron marcadores RAPDs (ilustración 4, cuadro 2).

Los polimorfismos se detectan cuando un individuo presenta en su genoma secuencias de ADN complementarias al

primer que además permiten la amplificación, y que están ausentes en otro individuo, producto de una mutación puntual (que afecta la unión entre el ADN y el primer) o de inserción o deleción de material genético (que también pueden afectar los sitios de hibridación con el primer así como la distancia amplificable entre los primers) (Williams *et al.*, 1990).

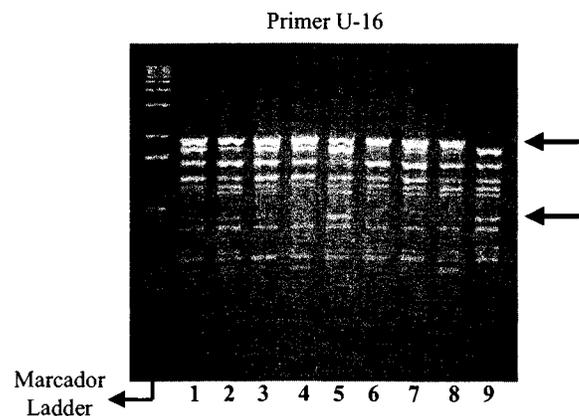


Ilustración 4. Las flechas señalan los polimorfismos detectados con uno de los primers en 9 genotipos de *Jatropha curcas*

Cuadro 2
NÚMERO DE BANDAS MONOMÓRFICAS Y POLIMÓRFICAS
GENERADAS CON LOS 10 PRIMERS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.

Nombre del Primer	Bandas Monomórficas	Bandas Polimórficas (Marcador RAPD)
J-14	2	3
H-18	2	1
F-01	2	4
P-08	2	8
Y-14	0	4
U-16	4	9
C-18	2	5
N-12	0	8
T-08	3	2
N-09	2	10
TOTAL	19	54

Con algunos de los primers utilizados se logró detectar polimorfismos (un total de 12) exclusivos para todos los lotes de un determinado cultivar, diferenciándolos genéticamente como grupo perteneciente al mismo país de origen y estableciendo así diferencias entre cultivares. Nicaragua, Tailandia y Madagascar con un marcador cada uno, generados por Y-14, C-18 y N-09 respectivamente; Cabo Verde y la India con dos marcadores cada uno, en el primer cultivar identificados con C-18 y N-09, y en el segundo solo con U-16; México presentó cinco marcadores, tres de ellos determinados con N-09 y los otros dos con T-08 y N-12. Todos estos marcadores corresponden a bandas polimórficas presentes, a excepción de uno de los marcadores para la India. Los 42 polimorfismos restantes revelaron diferencias dentro de los cultivares, y algunos de éstos relacionaron a lotes de distinta procedencia.

En los análisis de agrupamiento realizados a partir de la matriz presencia-ausencia construida con los 54 marcadores RAPDs generados de los 51 genotipos, se comparó la similitud con el coeficiente de Jaccard para agrupar los valores obtenidos, construyéndose así el correspondiente dendograma que expresa la similitud genética en términos de porcentaje donde los 51 lotes evaluados quedan relacionados en cuatro grupos principales, designados como: A, B, C y D (ilustración 5).

El grupo A ubica con 57% a la mayoría de los genotipos (42 lotes), quedando claramente diferenciados en dos subgrupos. El subgrupo A1 relaciona

con 61% al único lote procedente de la India (que se presenta como un genotipo aislado) con una agrupación que a la vez integra con 64% a 21 de los 27 genotipos nicaragüenses. En el subgrupo A2 quedan ubicados con 66% todos los lotes importados de Cabo Verde, Tailandia, Madagascar y El Salvador, de los cuales los tres primeros reúnen a todos sus lotes, diferenciándolos genéticamente como cultivar con 74%, 84% y 88% respectivamente. En el caso de los tres lotes salvadoreños, dos de ellos aparecen relacionados como cultivar con 87%, y el tercero se presenta de manera aislada y más cercano al cultivar Madagascar con el cual se relaciona en 80%. De estos cuatro cultivares, Cabo Verde se separa como grupo y los restantes, Tailandia, Madagascar y El Salvador quedan agrupados con 70%. Los genotipos del grupo B, que corresponden a los tres lotes de México reunidos como cultivar con 85%, quedan relacionados con los del grupo A con 54%, y a la vez estas dos agrupaciones con el grupo C con 46%. En este último se presentan 5 lotes nicaragüenses con una relación de 49% entre ellos. El grupo D representa un único lote nicaragüense, cuya similitud con respecto a los demás genotipos es del 40%, siendo este porcentaje el valor que relaciona a todos los 51 genotipos evaluados (ilustración 5).

Dentro de cultivares se logró diferenciar con los primers utilizados todos los lotes, a excepción de los genotipos 32 y 33 del cultivar Madagascar, que se asociaron con 100% de similitud genética. Los porcentajes menores de 64%, con que se agrupan en el dendograma los

Esta evaluación realizada al nivel del genoma por medio de la técnica RAPD, confirma los resultados obtenidos del estudio de caracteres morfológicos, fenológicos y reproductivos, llevado a cabo en algunas de las plantas del banco, donde también se encontró baja variación dentro de cultivares importados y alta en el caso de Nicaragua. En este estudio se plantea que la baja variabilidad en los cultivares Cabo Verde, Tailandia y Madagascar puede deberse al hecho de que éstos han sido cultivados por muchos años en sus países de origen, lo cual los ha sometido a selección artificial con la consiguiente pérdida de variación (Lezama *et al.*, 1998).

Conclusiones

- Los 10 primers utilizados para evaluar 51 genotipos de *Jatropha curcas* L. pertenecientes a siete cultivares distintos, generaron un total de 54 marcadores RAPDs.
- Con los marcadores RAPDs se diferenciaron genéticamente todos los genotipos evaluados, excepto los lotes 32 y 33 de Madagascar. También se diferenció con al menos un marcador todos los cultivares, excepto el de El Salvador.
- En el dendograma, los genotipos de los 51 lotes se relacionan desde 40% hasta 100% de similitud genética en cuatro agrupaciones principales, donde la mayoría de ellos (21 genotipos de Nicaragua, el genotipo de la India y todos los genotipos de los cultivares Cabo Verde, Madagascar, Tailandia y El Salvador) se relacionan (57%) en un solo grupo, seguido por el cultivar México (54%) y a una mayor distancia, los restantes seis genotipos de Nicaragua (<46%).
- El análisis RAPD al nivel del genoma reveló un alto grado de variabilidad genética dentro de los genotipos del cultivar Nicaragua, y poca variación dentro de los cultivares importados.

Bibliografía

- GALLEGO, P.R. (1994) *Análisis de la variabilidad genética del centeno (Secale cereale) utilizando marcadores bioquímicos y moleculares*. Tesis, MSc. Alcalá de Henares. Universidad de Alcalá de Henares.
- LEZAMA, L.; REYES, A.; CERDA, M. y JOVEL, J. (1998) *Informe de trabajo sobre Subproyecto Germoplasma. Proyecto Tempate*. León. UNAN (No Publicado).
- MÖLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H. y GEIGER, H. (1992). "A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit, bodies, and infected plant tissues". *Nucleic Acid Research* 20:6115-6116.
- PHILLIPS, R.F. y VASIL I.K. (1994) *DNA-based Markers in Plants*. Holanda Kluwer Ed., Academic Press Dordrecht.
- STILES, J.I.; LEMME, C.; SONDUR, S.; MORSHIDI, M.B. y MANSARDT, R. (1993). "Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars". *Theor Appl Genet* 85:697-701.

- TINGEY, S.V. y DEL TUFO, J.P. (1993) "Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA markers". *Plant Physiol* 101:349-352.
- WILLIAMS, J; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.; RAFALSKI, J. y TINGEY, S.V. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Research* 18(22):6531-6535.

REVISTA ESTUDIOS CENTROAMERICANOS (ECA)

Editorial

- * *El Transporte como una cuestión estructural*

Artículos

- * **Luis Armando González** | *Estado, sociedad y economía en El Salvador (1880-1999)*
- * **José María Tojeira, S.J.** | *Solidaridad con los pobres.*
- * **Inst. de Derechos Humanos de la Universidad Centroamericana "José Simeón Cañas"** | *Unas de cal y muchas de "arenas" en el sector público.*
- * **Jordi Corominas** | *Diversidad de culturas, igualdad de derechos*

Comentarios

- * Sustitución de monedas: colón versus dólar
- * Sobre el nuevo plan de seguridad pública
- * Fukuyama diez años después: ¿ahora sí arribaremos al "fin de la historia"?

Revista Estudios Centroamericanos (ECA)

Revista de la extensión cultura de la UCA de El Salvador. Se publica mensualmente con análisis de la realidad nacional salvadoreña y centroamericana.

Suscripciones:

Información en Nicaragua:
Tel. (505) 2783923 al 27. Ext. 192 y 236
Fax: (505) 2670106
email: encuentr@ns.uca.edu.ni
Universidad Centroamericana, Nicaragua

Anúnciese

Suscríbese

Para suscribirse dirigirse a:
Distribuidora de Publicaciones Aptdo. 01-575
San Salvador, El Salvador
Teléfonos 273-3556 (directo) ó 2734400 ext. 240 ó 242
Fax: (503) 2733556
email: ccordova@ued.uca.edu.sv