

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y AGRÍCOLAS
INSTITUTO DE AGRICULTURA, RECURSOS NATURALES Y AMBIENTE

Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones

MSc. Aida Vanessa Wilches M.

Serie técnica No. 15.

Guatemala, septiembre de 2004

UNIVERSIDAD RAFAEL LANDÍVAR

Rector:

Lic. Gonzalo de Villa y Vásquez, S.J.

Vicerrector general:

Licda. Guillermina Herrera Peña

Vicerrector académico:

Dr. Rene Poitevin

Vicerrector administrativo:

Arq. Carlos Haeussler

Director de investigación:

Peter Marchetti, SJ

Secretario general:

Lic. Luis Estuardo Quan

Decano FCAA:

MSc. Jaime Carrera

Director IARNA:

MSc. Juventino Gálvez

AUTOR:

MSc. Aida Vanessa Wilches M.

Comité editor:

MSc. Juventino Gálvez

MA. Cecilia Cleaves

Universidad Rafael Landívar (Guatemala). Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente.

Wilches, A. (2004). *Descripción de las herramientas moleculares y sus aplicaciones en la agricultura*.

Guatemala: Universidad Rafael Landívar, Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente.

Serie técnica No. 15.

25 p.

Descriptores: genética molecular, ADN, mejoramiento vegetal, biología molecular, agricultura

Publicado por: el proceso de elaboración técnica del presente documento ha sido responsabilidad del Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA). El propósito central del estudio es describir las diferentes metodologías y herramientas de genética molecular existentes, con énfasis en sus aplicaciones en la agricultura.

Copyright © 2004, Universidad Rafael Landívar (URL)
Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente

Está autorizada la reproducción total o parcial y de cualquier otra forma de esta publicación para fines educativos o sin fines de lucro, sin ningún otro permiso especial del titular de los derechos, bajo la condición de que se indique la fuente de la que proviene. El Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente agradecerá que se le remita un ejemplar de cualquier texto cuya fuente haya sido la presente publicación.

Disponible en: Universidad Rafael Landívar
Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA)
Campus central, Vista Hermosa III, zona 16
Edificio Q, oficina 101
Guatemala, Guatemala
Telefax: (502) 24262559 ó 24262626, extensión 2657
Email: iarna@url.edu.gt
www.url.edu.gt/iarna

Únicamente en versión electrónica

Índice

Presentación.....	i
Resumen	2
Summary	3
1 Introducción.....	5
2 Generalidades acerca del ADN	7
3 Principios de la genética molecular.....	9
3.1 Estructura del ADN.....	9
3.2 Replicación del ADN.....	10
3.3 Etiquetado de sondas de ADN	11
3.4 Caracterización del ADN	13
3.5 RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	14
3.6 RAPDs (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	15
3.7 PCR Estándar (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	16
3.8 Polimorfismos con RAPDs	16
3.9 AFLP (<i>Amplified Fragment-Length Polymorphism</i>)	17
3.10 Microsatélites o Repetición de Secuencias Simples (SSR).....	20
3.10.1 Funciones de los microsatélites en el genoma.....	20
3.10.2 Ventajas y aplicaciones de los SSR.....	21
4 Análisis estadístico de los datos generados con marcadores moleculares...23	
5 Transformación genética.....	24
5.1 Bombardeo de partículas	24
5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
5.3 Electroporación	27
6 Consideraciones finales	28
7 Bibliografía.....	29

Presentación

En América Latina, los laboratorios de biología molecular han incrementado su importancia, entre otros aspectos, por el aumento de las motivaciones de los países de la región para mejorar el nivel de conocimiento acerca de la riqueza y diversidad biológica existente, con la finalidad de contribuir tanto a su conservación efectiva como a su uso bajo esquemas que garanticen su perpetua renovación.

Actualmente, se han llevado a cabo estudios para el mejoramiento genético de especies importantes en la agricultura y en la forestería. Por ejemplo, en México se han realizado estudios de mejoramiento genético en raíces de *Paulownia*, con el objetivo de incrementar su capacidad de fijación de nitrógeno y con ello, acelerar el crecimiento de los árboles en plantaciones comerciales. Igualmente, en países como España y Uruguay se han hecho numerosos estudios de caracterización de *Eucalyptus* spp. *Pinus* sp., que han permitido la diferenciación entre clones y la verificación de genotipos para seleccionar aquellos que son superiores con fines de rendimiento comercial.

Asimismo, a través de estudios en este ámbito en el Reino Unido, se ha determinado la calidad genética de especies forestales forrajeras y se han identificado aquellas que ofrecen mejor calidad utilizando herramientas moleculares que aceleren estos procesos y aseguren un mejor trabajo a nivel de selección de los mejores clones a propagar, ya sea por vía *in vitro* o a través de métodos convencionales.

Guatemala cuenta con varios laboratorios ubicados en universidades e institutos estatales, como el ICTA, que podrían impulsar este tipo de investigaciones para dar apoyo a iniciativas productivas en los ámbitos agrícola, pecuario, forestal y agroforestal. Esto permitiría por un lado, optimizar los recursos que generalmente son escasos para programas de investigación y por otro, obtener resultados a corto plazo que permitan una renovación tecnológica en los ámbitos ya mencionados.

Es en este contexto que el Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente (IARNA) en el marco del Programa Institucional de Investigación sobre Biotecnología, pone a disposición el presente documento, mismo que ofrece un panorama de fácil comprensión acerca de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones en el agro guatemalteco. Nuestra aspiración es que esta publicación sea útil para fortalecer procesos de investigación aplicada y docencia.

Ing. Jaime Arturo Carrera
Decano
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas
Universidad Rafael Landívar

MSc. Juventino Gálvez Ruano
Director
IARNA
Universidad Rafael Landívar

Resumen

La biología molecular es considerada como una herramienta indispensable en los programas de mejoramiento genético. En este sentido, y en apego al espíritu de las entidades académicas, es fundamental procurar su máxima utilización en apoyo a los programas de investigación, docencia y proyección social.

La utilización eficiente de los recursos fitogenéticos depende de su adecuada caracterización. Tradicionalmente, estas caracterizaciones se han realizado utilizando largas listas de descriptores fenotípicos, principalmente de tipo morfológico o agronómico. Esto ha permitido diferenciar algunos materiales, pero en ocasiones, en forma imprecisa, debido a la interacción de estas variables con las condiciones ambientales.

Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo y la caracterización de germoplasma.

Los trabajos con marcadores moleculares parten del estudio del ADN o sea, de la información genética de cada individuo que se encuentra contenida en el núcleo de la célula. Posteriormente, se realiza la caracterización del mismo mediante distintas técnicas, y finalmente su manipulación de acuerdo con el objetivo que se haya planteado previamente.

El estudio del ADN ha permitido señalar aquellas características que resultan útiles o ventajosas para ciertas especies. Algunas de estas características son la resistencia natural a ciertos patógenos y plagas, un alto nivel de productividad, altura ideal de las plantas, color y otras características de interés agronómico. Para ello, se han desarrollado distintas aplicaciones que buscan conocer la estructura del ADN de los organismos, estudiarlo, identificar y localizar genes de interés, insertar ciertos genes en el ADN de otros organismos para evaluar su expresión; todo ello enmarcado en programas de investigación y fitomejoramiento avanzado.

Cuando se desea comparar a dos o más individuos de una misma especie o a especies diferentes pero emparentadas filogenéticamente, o bien si se planea elaborar un mapa genético de cierta especie, y/o ubicar genes dentro de los cromosomas; se puede acudir a varias técnicas que permiten detectar diferencias en el ADN de los individuos involucrados en el estudio. Las técnicas más conocidas son el RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), el RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y el AFLP (*Amplified fragment-length polymorphism*), por sus siglas en inglés. Otra técnica más reciente es la conocida como microsatélites, es decir, *Simple Sequence Repeats* (SSR).

Estas técnicas sirven de base para la elaboración de mapas genéticos donde se pueden ubicar posteriormente locus relacionados con características cuantitativas y, en etapas más avanzadas, la identificación, aislamiento y manipulación de genes deseables.

Las metodologías para el análisis estadístico de los datos generados a partir de marcadores moleculares son variadas y permiten hacer múltiples análisis. Como ejemplos, se pueden citar los programas MAPMAKER 2.0 y MAPMAKER/EXP.

Uno de los propósitos de hacer estudios sobre ADN, es detectar genes ligados a características deseables es incorporarlos a plantas que, a pesar de su buen rendimiento agronómico, presentan susceptibilidad a enfermedades y plagas; o bien, que se desean mejorar puntualmente sin alterar otras características que se encuentran en el genoma. Para ello existen métodos más fáciles y económicos que el mejoramiento convencional. Actualmente, los procedimientos más utilizados para introducir los genes de interés al ADN blanco, son el bombardeo de partículas, la técnica de *Agrobacterium tumefaciens* y la electroporación.

En Guatemala se impulsan varios proyectos de investigación enmarcados dentro de programas nacionales y con alianzas internacionales que sin duda ofrecen nuevas alternativas a la investigación y optimizan los recursos que son generalmente escasos para estos fines. Su aplicabilidad se ha extendido a diferentes campos, como el del mejoramiento fitogenético y las ciencias forenses, entre otros.

Summary

Molecular biology is considered as an essential tool in genetic improvement programs. By this reason, and in support to the academic entities spirit, it is fundamental to maximize its use in support to investigation, curriculum and social projection programs.

The efficient utilization of the phylogenetic resources depends on its adequate characterization. Traditionally, these characterizations had been done using big phenotypical lists of descriptors, basically on morphological and agronomic type. This had allowed the classification of some materials, but sometimes in a fuzzy way, due to the interaction of these variables with the environmental conditions.

The molecular markers present lots of advantages in comparison with the morphological genetic markers, especially for its high number and its independence on the environmental effects. The markers allow revealing the differences between the genoma, as a product of the evolution process and the germplasm characterization.

All molecular markers studies come from a DNA study, which is the genetic information of each individual contained in the cell nucleus. Afterwards, the characterization is made using different techniques and finally its manipulation according to the goal adopted previously.

The study of the DNA had allowed pointing out those advantageous and useful characteristics for some species. Some characteristics found are: the natural resistance to some pathogens and plagues, a high rate of productivity, an ideal height of plants, color and other characteristics of agronomic interest. Different applications have been developed in order to know and study the organisms DNA structure, to study, to identify and to locate genes of interest, to insert certain genes into other organisms' DNA to evaluate its expression; all these framed into research programs and advanced genetic improvement of plants.

When comparing two or more individuals or different species related phylogenetically, or when planning to make a genetic map of some specie and/or identify genes into the chromosomes; diverse techniques can be used to detect differences in the DNA of the individuals under study. The most known techniques are: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*), and AFLP (*Amplified fragment-length polymorphism*). A more recent technique is the *Simple Sequence Repeats* (SSR).

These techniques are the base for the elaboration of genetic maps, where locus related to quantitative characteristics can be found and, in more advanced stages, identify, isolate, and manipulate the desired genes.

The methodologies for the statistical analysis of generated data from the molecular markers, are many and allow making multiple analyses. For example: the MAPMAKER 2.0, and the MAPMAKER/EPX programs.

One of the purposes of making DNA studies is to incorporate genes linked to desirable characteristics into plants that, even if having high agronomic yield, can be vulnerable to illnesses and plagues; or, that can be improved specifically without changing other genome characteristics. More easy and economic methods are available rather than conventional improvement. At present, the most used procedures to introduce genes of interest into the target DNA are: particles bombing, *Agrobacterium tumefaciens* technics and electroporation.

In Guatemala, several research projects are being developed, framed into national programs, with international cooperation; that doubtless offer new alternatives to the investigation and optimization of resources, usually insufficient for those purposes. Its application had extended into different fields, such as the genetic improvement of plants and forensic sciences, among others.

1 Introducción

El mejoramiento tradicional de especies consiste en el cruzamiento de plantas que muestran alguna característica novedosa. Sin embargo, para alcanzar la manifestación de una nueva característica deseable se hace necesario la selección de aquellas plantas recombinantes que logran adquirirla. Este proceso puede necesitar hasta 10 generaciones de selección de las plantas mejoradas y el descarte de aquellas en donde la característica no se logra expresar completamente. Con los avances de la biología molecular se ha logrado ubicar e incorporar solamente el gen o los genes que tienen esta característica novedosa y se ahorra mucho tiempo en la obtención de variedades mejoradas. Igualmente, se asegura que el mejoramiento inducido sea más puntual y directo, ya que existen técnicas que permiten corroborar la presencia o ausencia del gen en plántulas jóvenes, lo cual a su vez agiliza notablemente los procesos de selección de los individuos agronómicamente interesantes.

La utilización eficiente de los recursos fitogenéticos depende de su adecuada caracterización. Tradicionalmente, estas caracterizaciones se han realizado utilizando largas listas de descriptores fenotípicos, principalmente de tipo morfológico o agronómico. Esto ha permitido diferenciar algunos materiales, pero a veces en forma imprecisa, debido a la interacción de estas variables con las condiciones ambientales.

Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo. Como aplicaciones de estas técnicas se puede mencionar la definición de grupos genéticos a nivel intra-específico (entre la misma especie) y la organización filogenética de las especies, o sea, las relaciones evolutivas entre distintas especies (Anthony *et al*, 1997).

Otra aplicación del uso de marcadores moleculares es la caracterización de germoplasma. Philips (2001), resume las distintas aplicaciones a nivel mundial, y los ejemplos son innumerables en café, cacao, especies forestales, hongos fitopatógenos, especies nativas de América tropical como zapotes (*Pouteria sapota*), musáceas (*Musa* spp.), jícama (*Pachyrhizus tuberosus*) y otras. Puede hacerse la verificación de cultivares es decir, que a nivel molecular se puede corroborar la historia de algún cultivar que está siendo conservado en un banco de germoplasma y catalogarlo como híbrido o como material parental, entre otros.

La construcción de mapas de ligamiento genético también es posible gracias a estas técnicas, ya que en ellos se muestran las posiciones relativas de los genes y/o marcadores en los grupos de ligamiento (cromosomas), donde el número de trabajos a nivel mundial es enorme. En Guatemala, se reportan estudios de identificación de geminivirus en *Bemisia tabaci* y de distribución de los distintos biotipos en varias zonas de plantaciones del país usando marcadores moleculares (Orozco, 1999; Universidad del Valle, 1999).

Existen numerosas técnicas para detectar diferencias entre individuos, algunas de ellas más costosas y laboriosas que otras. Existen técnicas más recomendables para cierto tipo de estudios y otras que no son fácilmente repetibles en distintos laboratorios, por lo cual ya no son muy utilizadas dada su alta sensibilidad a los cambios que ocurren de un laboratorio a otro.

Todo trabajo con marcadores moleculares parte del estudio del ADN o sea, de la información genética de cada individuo que se encuentra contenida en el núcleo de la célula. Posteriormente, viene la caracterización del mismo mediante distintas técnicas, y por último su manipulación de acuerdo con el objetivo que se haya planteado.

2 Generalidades acerca del ADN

El ADN o Ácido desoxirribonucleico es una doble cadena enrollada alrededor de proteínas conocidas como histonas. En esta doble hélice se encuentra la información genética de todo organismo viviente. El ADN se enrolla nuevamente hasta constituirse en un cromosoma. El número de cromosomas varía entre los distintos organismos, pero no existe una clara relación entre la complejidad del organismo y el número de cromosomas que el mismo posee.

Sin embargo, existen varias especies de plantas que tienen más de un juego de cromosomas y se cree que esto se debe a las complejas rutas metabólicas que debe tener una planta para llevar a cabo todas sus funciones. Los animales tienen en general rutas más sencillas.

Los genes están localizados en los cromosomas, cada uno de los cuales codifica para una característica específica. Por ejemplo, el gen que da el color de los ojos de una persona, el color del cabello, la altura, el color de las hojas, tamaño de la planta, longitud entre ramas, ángulo de las hojas, productividad y resistencia, entre otros. Y los alelos son las distintas formas que puede tener este gen: azules, negros, verdes, altos, bajos, lacio, crespo, resistentes, susceptibles, entre otros.

Existe una ruta para que la información genética que está contenida en el ADN se exprese, y en ella se ven involucrados algunos pasos y varias enzimas que hacen el trabajo. La ruta general se puede resumir en la Figura 1:

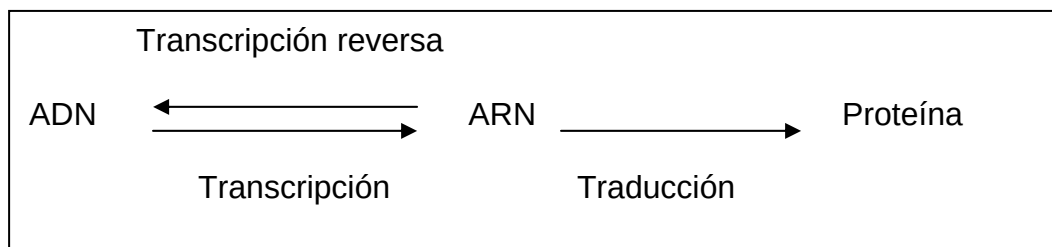


Figura 1. Ruta de expresión de la información genética en el ADN

La primera traducción de la información del ADN constituye una cadena simple de información conocida como ARN mensajero, la cual posteriormente será traducida en una cadena de aminoácidos y, el conjunto de aminoácidos, constituirá una proteína. Dado que el ARN es una copia sencilla del ADN, es posible conocer la composición del ADN teniendo sólo la información del ARN, mediante un proceso que se conoce como transcripción reversa.

El conocimiento de la estructura y los mecanismos de replicación del ADN rompen, sin dudas, las barreras naturales que existen entre las especies. De este modo, no debe

hacerse referencia a especies, sino a ADN, que se comporta de manera similar y por lo tanto, puede estudiarse en iguales condiciones, modificarse y mejorarse.

El estudio del ADN ha permitido señalar aquellas características que resultan útiles o ventajosas para ciertas especies, como son la resistencia natural a ciertos patógenos y plagas, un alto grado de productividad, altura ideal de las plantas, color y otras características de interés agronómico. Algunas de estas características están conferidas por un gen, pero otras, son el resultado de la expresión de varios genes, con lo que su transferencia a otros organismos o su localización dentro del genoma se hace un poco más compleja.

3 Principios de la genética molecular

3.1 Estructura del ADN

El ADN está compuesto por una columna vertebral de azúcares tipo fosfato desoxirribosa y bases nitrogenadas conocidas como purinas (Figura 2): guanina (G) y adenina (A), que son comunes en el ADN y ARN; las pirimidinas: citosina (C) y timina (T), presentes en el ADN y ARN; y el uracilo (U), presente sólo en el ARN.

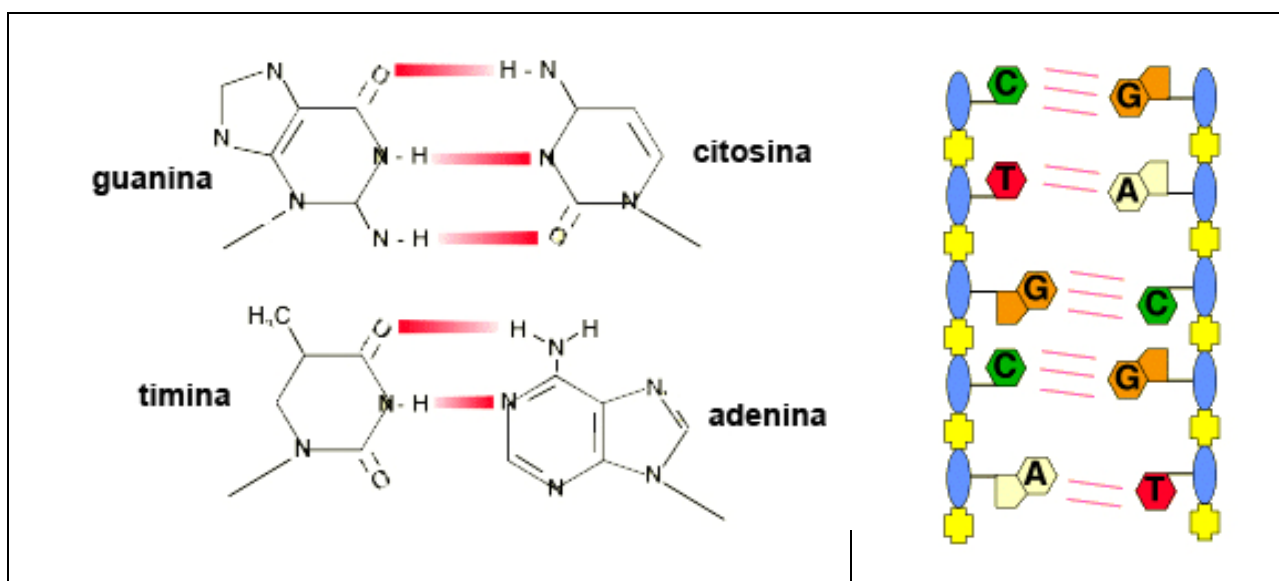


Figura 2. Bases nitrogenadas del ADN

Fuente: www.arrakis.es/~lluengo/adn.html

Todas estas bases se encuentran unidas de forma complementaria dentro de la doble hélice del ADN; es así como la guanina G siempre se encontrará unida a una citosina C (G –C) y la adenina A estará unida a una timina T (A-T); tal y como puede observarse en la Figura 3. La unión entre G y C es un enlace triple de hidrógeno y la unión entre A y T se logra por un enlace doble. Esta diferencia en los enlaces explica en parte la estructura helicoidal que tiene el ADN.



Figura 3. Unión de las bases dentro de la doble hélice del ADN

3.2 Replicación del ADN

Cuando la célula se va a dividir, el ADN hace una copia de su información, lo que se conoce como replicación del ADN. Para ello, requiere de un filamento corto de ARN, que es una cadena sencilla de nucleótidos que se une en el punto donde la cadena de ADN se abre en forma de burbuja para ser copiada. Este ARN se llama iniciador, ya que es el encargado de iniciar la transcripción del ADN. El ARN iniciador de un fragmento de ADN se libera tan pronto como se concluye la síntesis del siguiente fragmento. La muesca o rotura que va quedando entre los fragmentos formados es cerrada por una enzima que se llama ADN ligasa (Ayala & Kiger, 1984).

Cuando el ADN se va a replicar, la doble hélice se abre y se va formando una cadena nueva a partir de cada una de las cadenas parentales, tal y como se muestra en la Figura 4.

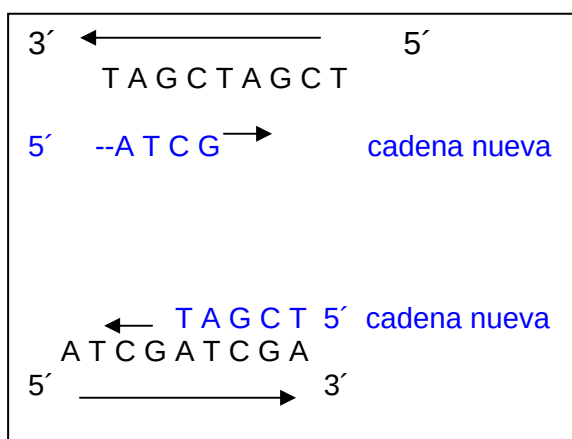


Figura 4. Formación de una cadena nueva de ADN

La replicación de un ADN se puede inducir mediante calor o una alta concentración de sales y la presencia de Magnesio (Mg). La realineación del ADN se induce disminuyendo el calor y disminuyendo la concentración de sales, obteniendo así dos copias del ADN que se está estudiando. Todo este proceso va acompañado por enzimas específicas. La enzima que adiciona y corrige nucleótidos se llama ADN polimerasa, y la que promueve la unión de los fragmentos nuevos se llama ADN ligasa.

El conocimiento de la replicación del ADN ha permitido abrir una puerta hacia las aplicaciones de la genética molecular, las cuales son:

- Etiquetado de sondas de ADN (marcado).
- Secuenciación de ADN (conocer las secuencias de las bases).
- Reacción en cadena de la polimerasa (permite aumentar millones de veces el ADN que se desea replicar a partir de una cantidad pequeña).

Estas aplicaciones buscan conocer la estructura del ADN de los organismos, estudiarlo, identificar y localizar genes de interés, insertar ciertos genes en el ADN de otros organismos para evaluar su expresión; todo ello enmarcado en programas de investigación y fitomejoramiento avanzado.

3.3 Etiquetado de sondas de ADN

Cuando no se conoce la estructura del ADN, se puede hacer un etiquetado o marcado por un método conocido como “cebado al azar”. Este método consiste en aislar el ADN del organismo que se va a estudiar, para lo cual existen numerosas técnicas fáciles y altamente eficientes (Astorga & Quirós, 2004); y añadir a la mezcla de ADN y nucleótidos libres (A, T, C, G), una cadena de ADN conocida por el investigador que se unirá al azar en los sitios donde encuentren bases que coincidan.

El primer paso es abrir o desnaturalizar la cadena de ADN mediante calor (94° C), posteriormente el cebador o *primer* de secuencia conocida se une en los sitios donde encuentre una secuencia homóloga, luego se irán adicionando algunos nucleótidos que han sido marcados con radioactividad que permitirán ser visualizados en una etapa posterior.

Este proceso se muestra en la Figura 5.

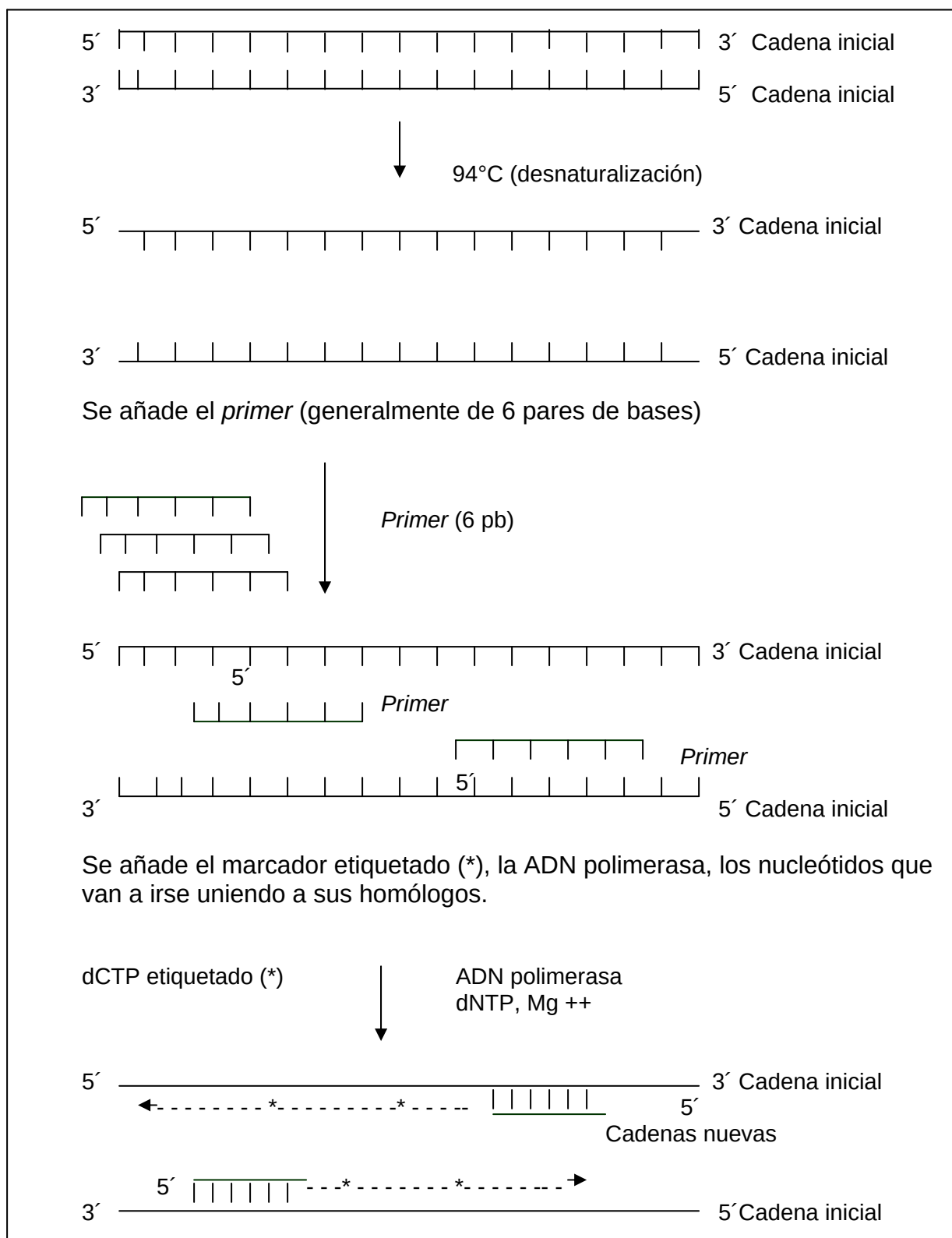


Figura 5. Etiquetado o marcado por el método de “cebado al azar”

Posteriormente, todos los fragmentos de ADN que se obtienen se deben visualizar, para lo cual se hace una electroforesis en gel de agarosa, que se muestra en la Figura 6 y cuya metodología se describe más adelante.

Los fragmentos más pesados se moverán más lentamente y quedarán más cerca de su sitio original, los más pequeños y por lo tanto más livianos, migrarán más lejos, y estas diferencias darán una idea de la similitud o diferencia que pueda existir entre el ADN estudiado de dos especies diferentes. Se obtienen ADN polimórficos (es decir diferentes) que fueron amplificados al azar.

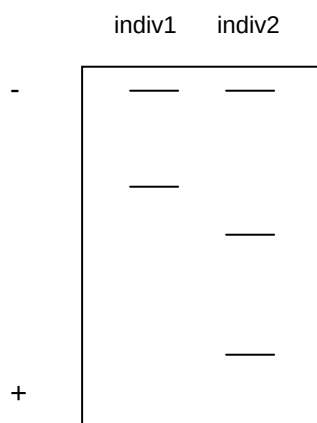


Figura 6. Electroforesis en gel

3.4 Caracterización del ADN

Cuando se desea comparar a dos o más individuos de una misma especie o a especies diferentes pero emparentadas filogenéticamente, si se planea elaborar un mapa genético de alguna especie, y/o ubicar genes dentro de los cromosomas; se puede acudir a varias técnicas que permiten detectar diferencias en el ADN de los individuos involucrados en el estudio.

Las técnicas más conocidas son: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y AFLP (*Amplified fragment-length polymorphism*) por sus siglas en inglés. Otra técnica más reciente es la conocida como microsatélites (*SSR-Simple Sequence Repeats*).

Estas técnicas sirven de base para la elaboración de mapas genéticos donde se pueden ubicar posteriormente locus relacionados con características cuantitativas (QTL -*Quantitative Trait Loci*-) y, en etapas más avanzadas, la identificación, aislamiento y manipulación de genes deseables. La determinación de estos QTL ha permitido identificar *loci* relacionados con el número de semillas por fruto, peso de semillas, área

foliar y tal vez los más interesantes son aquellos relacionados con resistencia a patógenos (Philips & Crouzillat, 1999).

3.5 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

El RFLP ha sido una técnica usada en los programas de investigación desde los años setenta. Es una técnica que permite distinguir organismos entre sí, mediante el análisis de los patrones que se derivan al romper el ADN en pequeños fragmentos. Si dos organismos son diferentes, en la distancia que exista entre dos sitios de ruptura particular, la longitud de los fragmentos generados será distinta cuando el ADN se digiera o rompa con una enzima de restricción. La similitud de los patrones generada puede ser usada entonces para diferenciar especies e inclusive razas entre sí.

En resumen, su metodología consiste en los siguientes pasos:

1. El ADN es extraído de las hojas de las plantas a examinar, o de la sangre de los individuos que se quiere comparar.
2. El ADN de la muestra es cortado en fragmentos, que resultan ser de tamaños diversos, precisamente porque estos tamaños dependen de la diversidad y variabilidad genética de la muestra. El nombre RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) deriva de la propiedad de ciertas enzimas llamadas “de restricción” para cortar regiones específicas del ADN que son muy variables (hipervariables) de individuo a individuo, lo que ayuda a detectar precisamente el polimorfismo que se está buscando.
3. Los fragmentos de ADN son colocados en una superficie gelatinosa (gel de agarosa) con el propósito de someterlos a una separación con base en su diferente tamaño.
4. Se sumerge el gel en una solución conductora y luego se aplica una corriente eléctrica a lo largo del gel. A este proceso (pasos 3 y 4) se le llama “electroforesis”.
5. Puesto que el gel de agarosa tiene poros, los fragmentos más pequeños de ADN migrarán hacia el ánodo (polo positivo) más rápidamente que los fragmentos de ADN que sean más largos.
6. Los fragmentos de ADN así separados se transfieren luego por adhesividad a una membrana de *nylon*. A este proceso se le conoce como “*Southern blotting*”.
7. La membrana de *nylon* contiene ahora covalente y los fragmentos de ADN firmemente adheridos en la misma posición en que migraron sobre el gel durante el proceso de electroforesis.
8. Esta membrana de *nylon* es expuesta a sondas marcadas de ADN, que son pequeños fragmentos sintéticos de ADN de secuencia conocida y que corresponden

a zonas selectas de hipervariabilidad del ADN humano. Las sondas suelen estar marcadas con isótopos radiactivos o con sustancias fluorescentes por tanto, emisoras de luz.

9. La membrana de *nylon* luego se coloca contra una película de rayos X (si se usaron sondas radiactivas) o fotográfica (si se usaron sondas fluorescentes), la cual es revelada posteriormente (<http://biogenomica.com>).

El proceso se repite varias veces usando la misma membrana de *nylon*, pero exponiéndola a diversas sondas. Cada sonda identifica áreas diferentes del ADN (que mapean en regiones diferentes de diferentes cromosomas).

Aunque es muy útil y ampliamente utilizado para la caracterización de germoplasma, se ha visto limitado por su alto costo, dificultad metodológica, por el uso de sondas específicas y sustancias radioactivas (Philips & Escalant, 1995). Adicionalmente, se requieren grandes cantidades de ADN (Astorga & Quirós, 2004; Jackson *et al.*, 2004).

En el caso de las pruebas de paternidad, aunque este método es usado todavía en varios laboratorios del mundo, es tecnológicamente obsoleto y hoy en día se utiliza el método de STR para este fin.

3.6 RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

El análisis RAPD fue descrito por primera vez en 1990 por dos grupos independientes de investigadores (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990). En los últimos años se ha popularizado porque carece de las desventajas de los RFLP y permite generar datos en forma eficiente y barata, aunque se ha cuestionado su reproducibilidad entre laboratorios (Philips & Escalant, 1995). Con esta técnica se han generado numerosos estudios de variabilidad genética en diferentes variedades de interés comercial con fines de mejoramiento, como es el caso de *Coffea arabica* (Anthony *et al.*, 1999), caoba (*Swietenia macrophylla* King.) (Vásquez *et al.*, 1999) y en caña de azúcar en Guatemala (León, 2001), por citar algunos ejemplos.

Las reacciones de RAPDs son básicamente reacciones de amplificación usando una técnica llamada PCR (*polymerase chain reaction*), o reacción en cadena de la polimerasa, en la cual a partir de una pequeña cantidad de ADN se generan múltiples copias del mismo. Los requerimientos para trabajar con RAPDs son: un *primer* de aproximadamente 10 bases de nucleótidos conocido por el investigador; una enzima termoestable es decir, que soporta altas temperaturas sin dañarse, llamada Taq polimerasa; Mg; los nucleótidos (dNTPs): A, T, C, G; un buffer y el ADN. Todo esto se une para llevar a cabo su amplificación mediante la técnica de PCR. Dado que se usa un sólo oligonucleótido, se amplificarán las regiones del ADN que tienen el motivo repetido en la dirección opuesta, pero homóloga con el *primer*. Las diferencias que se presentan entre individuos pueden ser visualizadas en un gel de agarosa que es teñido con bromuro de etidio, y que permite comparar a varios individuos simultáneamente.

En Guatemala se han hecho estudios relacionados con el control y mitigación de la enfermedad de chagas, utilizando las técnicas microscópicas y últimamente la PCR como un método que ha resultado más eficiente para la detección de *Trypanosoma cruzi* en sus principales vectores como son *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolinus* (Dorn *et al*, 1999, 2001).

3.7 PCR Estándar (*Polymerase Chain Reaction*)

En el PCR clásico, los científicos eligen la secuencia que se desea amplificar, entonces diseñan los *primers* o iniciadores que van a flanquear la secuencia del interés. Así, el PCR conduce a la amplificación de un segmento particular de la DNA. La PCR consiste en llevar a cabo 3 ciclos diferentes, que son:

1. **Desnaturalización del ADN:** separación de las dos hélices de ADN a una temperatura de 92° C.
2. **Alineamiento:** donde el *primer* conocido se alinea a los sitios del ADN que tengan secuencia complementaria. Esto se logra disminuyendo la temperatura a 55° C. Si la secuencia del *primer* es más larga, se usa una temperatura un poco más alta, si es más corta, la temperatura más recomendable es un poco menor. Los *primers* más cortos hacen uniones más fuertes que los *primers* muy largos. En todo caso, aquellas uniones inestables no se mantienen unidas y el *primer* continuará buscando su secuencia homóloga.
3. **Extensión:** en este paso, la temperatura de 72° C es la ideal para que la Taq polimerasa trabaje sobre las uniones estables que se han formado entre el *primer* y las distintas zonas del ADN. Aquí los nucleótidos que están libres en el medio, se van uniendo gracias a la acción de la Taq polimerasa y se van formando los fragmentos definitivos.

Toda esta reacción se repite unos 30 ciclos completos de tal forma que al final hay miles de copias de aquellos fragmentos de ADN que son complementarios al *primer* inicial. El último paso es la visualización del resultado mediante una electroforesis para detectar polimorfismos (diferencias) entre organismos.

3.8 Polimorfismos con RAPDs

En el análisis RAPD, la secuencia de interés es aún desconocida. El investigador diseña secuencias de pares de bases de no más de 10 nucleótidos, lo cual también se puede hacer usando programas de computación, luego sintetiza su *primer* o iniciador que es esta misma secuencia. En la reacción de PCR se unirá el ADN de interés con este *primer* y se hará una electroforesis en agarosa para visualizar si el ADN amplifica (Figura 7).

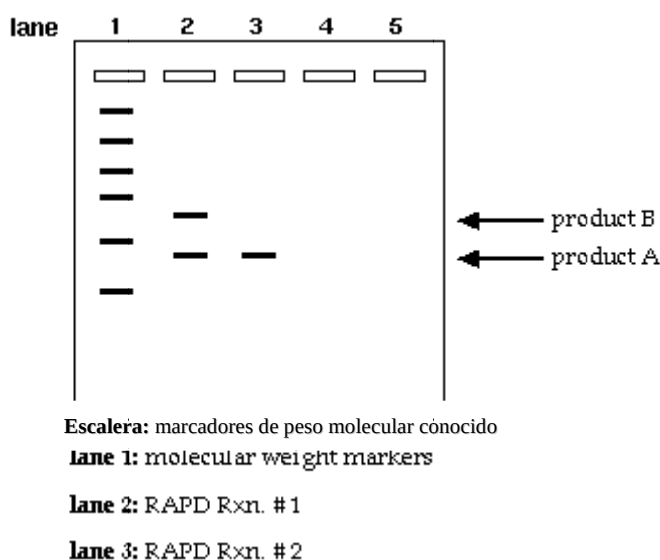


Figura 7. Electroforesis utilizada en la técnica de RAPDs

La principal desventaja que presenta el método de RAPDs es la falta de reproducibilidad de los resultados de un laboratorio a otro, lo cual pone en duda si se trata de un polimorfismo real entre dos organismos o si es un error en el manejo de la técnica. Además, si se trata de especies altamente emparentadas, no es fácil detectar diferencias mediante este método ya que se requiere de un ADN polimórfico.

En Guatemala, es de resaltar el conjunto de estudios que se han hecho utilizando marcadores moleculares como RFLPs (Becerra *et al*, 1993) y RAPDs (Azurdia, 1994), que permitieron reconfirmar la existencia de dos centros de origen para *Phaseolus vulgaris* y establecer que *P. polyanthus* es la quinta especie cultivada en Guatemala, con lo cual se confirma a Guatemala como su centro de variabilidad genética y posible centro de origen y domesticación (Azurdia, 1999).

Igualmente, se reportan trabajos en el establecimiento de diversidad genética y relaciones filogenéticas de cacao (*Theobroma cacao*), papaya (*Carica papaya*) y aguacate (*Persea sp.*), en donde se establecieron las relaciones filogenéticas entre las distintas especies de interés, todo esto enmarcado dentro de un programa de mejoramiento (Azurdia, 1999).

3.9 AFLP (Amplified Fragment-Length Polymorphism)

La técnica de AFLP surge como un intento de combinar las ventajas de los RAPDs y los RFLPs. Es una reacción de PCR que involucra por su parte, la restricción de ADN genómico, seguido de la unión con adaptadores complementarios. El procedimiento consiste en digerir o romper el ADN con dos enzimas de restricción simultáneamente

llamadas *EcoRI* y *MseI*. *EcoRI* tiene un sitio de reconocimiento de seis pares de bases, y *MseI* tiene un sitio de reconocimiento de cuatro pares de bases. Cuando se utilizan juntas, estas enzimas generan fragmentos pequeños de ADN que amplifican bien y se encuentran en un rango óptimo de tamaño (<1 kb) para la separación en geles denaturantes de poliacrilamida. Debido al diseño de los *primers* y a la estrategia de amplificación, éstos fragmentos (*EcoRI-MseI*) son preferentemente amplificados (en lugar de los fragmentos *EcoRI-EcoRI* o *MseI-MseI*) (Figura 8).

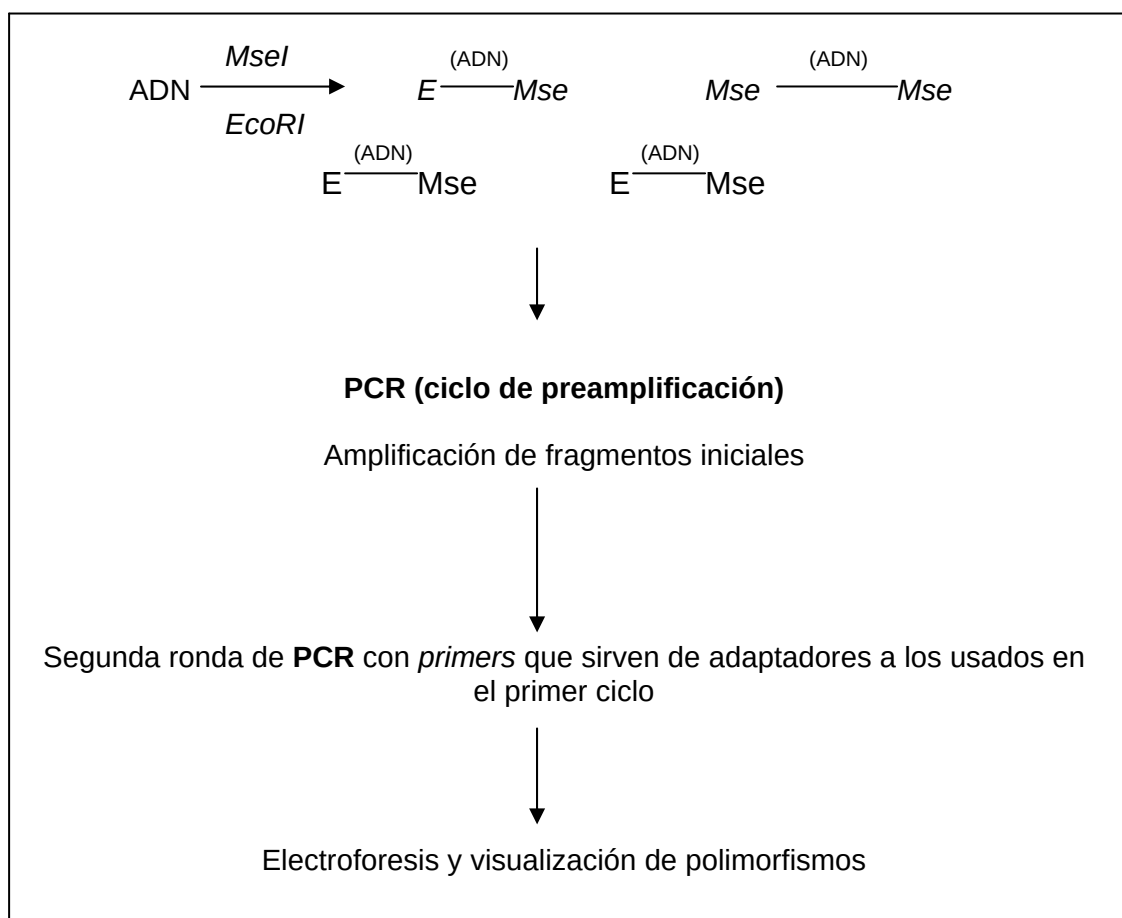


Figura 8. Proceso de AFLP

El éxito de la técnica del AFLP depende, en gran parte, de la completa digestión del ADN con las enzimas de restricción; por lo tanto, se debe tener mucho cuidado al aislar el ADN genómico, el cual debe ser de alta calidad, intacto, sin endonucleasas contaminantes o inhibidores. Para este paso, existen protocolos que permiten purificar el ADN y dejarlo listo para la reacción. La disponibilidad de múltiples y diferentes enzimas de restricción y las combinaciones con los *primers* correspondientes permiten una gran flexibilidad de trabajo, permitiendo una gran aplicabilidad para los AFLPs en la búsqueda de polimorfismo, análisis de QTL y mapeo genético.

Comparando con las técnicas de RAPD, RFLP y microsatélites, los AFLP tienen igual o mejor reproducibilidad, resolución y una mayor eficiencia en términos de tiempo. Probablemente la mayor ventaja radica en que es capaz de detectar un mayor grado de polimorfismo a nivel general del genoma, lo cual lo ha posicionado como una excelente alternativa para estudios de sistemática y genética de poblaciones.

Algunos trabajos han permitido la identificación de genes asociados a la resistencia de hongos patógenos en tomate (Thomas *et al*, 1995), elaborar mapas de ligamiento genético en distintos ecotipos de *Arabidopsis* (Alonso-Blanco *et al.*, 1998) y detectar posibles introgresiones genéticas entre distintas especies (maíz y trigo) para la producción de haploides (Brazauskas *et al*, 2004).

En la Universidad San Carlos de Guatemala, se llevaron a cabo estudios sobre la diversidad genética del frijol silvestre (*P. vulgaris*), en donde se pudo establecer características asociadas a su región ecofisiográfica de origen (Azurdia, 1999).

El Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), Guatemala; utilizó esta técnica para evaluar 64 combinaciones de partidores EcoRI – MseI en las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): ICTA Altense e ICTA Hunapú; determinándose las combinaciones E+ACA / M+CAC, E+ACC / M+CAG, E+AGC / M+CTC y E+ACA / M+CAT como las variedades que tienen los niveles más altos de polimorfismo. Utilizando estas combinaciones se caracterizó un grupo de veinte líneas mejoradas de frijol provenientes de las dos variedades antes mencionadas, cuya característica principal y común es la precocidad que poseen debido a mutaciones inducidas. En este estudio se logró generar una huella dactilar genética con polimorfismos capaces de identificar cada una de las líneas. Además, se calculó la distancia genética dentro de los materiales utilizando el coeficiente de Nei-Li y se generó un dendrograma utilizando el método UPGMA, estableciendo que la variabilidad existente dentro del grupo de líneas provenientes de ICTA Altense es mayor que la del grupo proveniente de ICTA Hunapú. Las bandas polimórficas de estos grupos con las variedades originales, pueden estar ligadas a la característica mutante de precocidad. En la siguiente fase de este estudio se pretenden identificar estas bandas mediante el análisis de una población segregante F2 (Ávalos & Molina, 2003, en proceso de publicación).

Utilizando la misma metodología del trabajo, se analizó un grupo de 12 variedades mejoradas de frijol: IAN 5091, San Martín, Compuesto Chimalteco-2, Parramos, Quinack-Che, DORICTA, ICTA Altense, ICTA Hunapú, ICTA Ligero, ICTA Ostúa, ICTA Santa Gertrudis e ICTA Texel. Se logró generar un patrón genético molecular para cada variedad, se calculó la distancia genética entre ellas y se elaboró un dendrograma de sus relaciones; lo cual permitió calcular las distancias o similitudes genéticas entre variedades, que permitirán perfeccionar los programas de mejoramiento que se están llevando a cabo y asegurar un mayor éxito en las cruas genéticas (Sagastume *et al.*, 2003).

Con esta misma técnica se está caracterizando el ajo cultivado en Guatemala. Se recolectaron muestras de ajo en los municipios de Aguacatán y Chiantla, del

departamento de Huehuetenango y en los municipios de Cunén y Sacapulas del departamento del Quiché, principales zonas de este cultivo. Esta caracterización molecular va acompañada de una caracterización agromorfológica. Con la información que se obtenga sobre el nivel de variabilidad y sus características, se pretenden sentar las bases para el establecimiento de un programa de mejoramiento genético de ajo.

3.10 Microsatélites o Repetición de Secuencias Simples (SSR)

Los microsatélites son secuencias de un máximo de 6 pares de bases repetidas muchas veces, por ejemplo: AC (40) veces, AAT (8) veces, AAT (17) veces, que van seguidas de otras secuencias distintas dentro del genoma en organismos procariotes y eucariotes. Están presentes en regiones codificadoras y no codificadoras de genes, las cuales se caracterizan por tener un alto grado de polimorfismo (Zane *et al.*, 2002).

Se sabe que estas secuencias están distribuidas más o menos al azar dentro del genoma en una frecuencia relativamente alta (10 al 50% del genoma de algunos organismos). Su cantidad depende de la longitud del ADN. Se han encontrado en genes funcionales y factores de transcripción en los genomas humanos, de ratones y de *Drosophila*. Permiten mostrar altos niveles de polimorfismo y pueden presentar interrupciones por secuencias no-repetitivas. Se cree que surgieron por medio de dos mecanismos: superposición (*slippage*) durante la replicación de una de las hebras de ADN, o por un entrecruzamiento inusual entre cromosomas homólogos durante la meiosis.

Los microsatélites sirven como un código funcional y regulatorio en el genoma eucariótico, se encuentran en regiones promotoras de los genes que ayudan a aumentar la expresión del gen. Se ha visto que pueden ser conservados evolutivamente junto con el gen, y también tienen la habilidad para enlazar proteínas, lo cual depende del número de repeticiones que tenga el microsatélite. Cuando se van a traducir estas secuencias en proteínas, el número de repeticiones influirá en el grado de expresión de la proteína y en su actividad (Jackson *et al*, 2004).

3.10.1 Funciones de los microsatélites en el genoma

- Podrían ser una fuente de variación en la genética cuantitativa, ya que afectan la expresión de los genes. Un ejemplo de esto es que al aumentar el número de nucleótidos repetidos (motifs) en el SSR del exón del factor de transcripción GAL4, disminuye la tasa de mRNA que será transcrito.
- Podrían estar facilitando la adaptación evolutiva sirviendo como mecanismos a través de los cuales las mutaciones frecuentes, específicas, no-deletéreas y reversibles afectan. Esto minimiza los efectos de la deriva genética o la selección.

Con base en estas suposiciones, se utilizan microsatélites (SSR) como marcadores mendelianos para estudios en genética de poblaciones, relaciones evolutivas y mapeo genético.

3.10.2 Ventajas y aplicaciones de los SSR

En los últimos años, los SSR se han convertido en los marcadores moleculares más populares usados en diferentes campos. Su alto polimorfismo y su facilidad de marcado o etiquetado los han privilegiado para hacer varios estudios genéticos, como son:

- Genética de poblaciones,
- Mapeo genético,
- Estudios forenses,
- Manejo y conservación de recursos biológicos, y
- Estudios de paternidad.

El único inconveniente de los SSR es que estos deben ser aislados cada vez que las especies van a ser examinadas por primera vez. Se ha comprobado que la estrategia de diseñar *primers* universales es más problemática para los SSR. Se dan algunas excepciones con SSR altamente conservados de ballenas, tortugas y peces que permitieron amplificación cruzada de especies que divergieron hace 470 millones de años. Existen numerosos protocolos para el aislamiento e identificación de microsatélites, a la fecha hay varios artículos que proponen métodos que permiten mejorar la eficiencia en detección de SSR en aquellas especies como aves y plantas donde el número de SSR es relativamente bajo (Zane *et al*, 2002). Se ha visto que la secuencia que se repite en un SSR varía de una especie a otra, por lo cual los distintos métodos de detección de estas secuencias generalmente funcionan en otros organismos.

En síntesis, los microsatélites se han convertido en una técnica casi obligatoria en los estudios genéticos, pero algunos aspectos como su aislamiento siguen abiertos a la investigación. Los protocolos de trabajo siguen actualizándose constantemente, se pueden encontrar en el *internet* y en las instituciones que realizan modificaciones según sus condiciones de trabajo. Particularmente, el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) ha mejorado y rediseñado una serie de protocolos de amplificación de ADN para las técnicas moleculares RAPDs, SSR y AFLP que han optimizado los resultados obtenidos en el laboratorio de biología molecular (Astorga & Quirós, 2004).

Entre 1995 y 2000 se han encontrado alrededor de 8,000 registros en la base de datos de los “*Current contents*” que tienen la palabra “microsatélites” (Zane, 2002). En

Guatemala se reportan trabajos usando SSR, como es el caso de un estudio sobre variabilidad genética de la población de *Anopheles albimanus* a través de esta técnica (Mills, 2001). El ICTA, en colaboración con el Centro de Investigaciones de la Caña - CENGICAÑA, también realizó una caracterización de 48 variedades de caña de azúcar. La información generada en este trabajo sirve de base para la toma de decisiones en el programa de mejoramiento genético. Un ejemplo de ello es que fue utilizada en la selección de progenitores utilizados en las cruzas del año 2003 (Quemé, J.; Molina, L. y Melgar, M., en proceso de publicación).

Se está brindando apoyo al programa de mejoramiento genético de maíz, mediante selección asistida con marcadores (MAS por sus siglas en inglés para *Marker Assisted Selection*). El trabajo consiste en seleccionar de una población segregante, los individuos que posean el alelo homocigótico recesivo del gen Opaco-2. Esta condición confiere alta calidad de proteína a las plantas que la poseen y la base de la selección consiste en amplificar un microsatélite que se encuentra localizado dentro del gen. Esta técnica, por ser codominante, permite la identificación de individuos homocigóticos y heterocigóticos. Mediante este trabajo se incrementa la eficiencia de selección y se ahorra tiempo y recursos en el desarrollo de nuevas variedades de maíz con alto contenido de proteína. Durante el año 2004 se iniciará la caracterización mediante microsatélites de 670 variedades de maíz que constituyen la colección nacional. Con este trabajo se pretende establecer la colección núcleo, comparar la información con la caracterización agromorfológica existente, obtener la huella dactilar genética de cada variedad, establecer las relaciones filogenéticas y elaborar el catálogo de variedades de maíz de Guatemala.

4 Análisis estadístico de los datos generados con marcadores moleculares

Las técnicas anteriormente descritas, utilizadas en forma individual o en conjunto, han permitido la elaboración de mapas genéticos de algunas especies.

Las metodologías para el análisis estadístico de los datos generados a partir de marcadores moleculares son variadas y permiten hacer múltiples análisis. Uno de los más comunes es el análisis de ligamiento para relacionar la presencia de un marcador con una característica que está siendo buscada. El programa MAPMAKER 2.0 (Lander *et al*, 1987) o MAPMAKER/EXP (versión 3.0) permite generar esta información. Otros programas estadísticos permiten transformar datos de fracciones de recombinación genética en distancias de mapa (Kosambi, 1944).

Para agrupar individuos de acuerdo con la presencia o ausencia de marcadores moleculares se utilizan análisis de conglomerados. En el *internet* está disponible el programa *Infostat* (www.infostat.com.arg) o su versión (www.infogen.com), que es muy didáctico y permite un gran número de análisis a partir de la matriz de datos generada por el investigador.

5 Transformación genética

Uno de los propósitos de hacer estudios sobre ADN para detectar genes ligados a características deseables es incorporarlos a plantas que, a pesar de su buen rendimiento agronómico, presentan susceptibilidad a enfermedades y plagas; o bien, que se desean mejorar puntualmente sin alterar otras características que se encuentran en el genoma. El mejoramiento convencional presenta en este aspecto, limitaciones a nivel de causar una alta esterilidad en las plantas hijas. En otros casos, existen distintos niveles de ploidía (número de cromosomas) entre los cultivares comerciales, lo cual imposibilita cruces exitosos.

El mejoramiento no-convencional permite subsanar estas limitaciones y hacer un mejoramiento puntual de una especie. Adicionalmente, la ventaja económica que representa este mejoramiento es bastante apreciable, ya que las pérdidas por enfermedades y plagas pueden dañar hasta el 50% de un cultivo (sigatoka negra). A esto se suma el costo anual en fungicidas, que ronda entre U\$ 600 – 800 dólares por hectárea, así como la resistencia que generan las plantas a estos productos y que encarecen por tanto el control del problema.

Existen varios institutos que trabajan en mejoramiento de especies. En el caso de banano y plátano (*Musa* sp.) está la Katholieke Universiteit (KU) Leuven en Alemania; Queensland University of Technology (QUT) en Brisbane, Australia; el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAN), México y el CATIE en Costa Rica.

En el CATIE, se han llevado a cabo trabajos de transformación buscando resistencia a la sigatoka negra, usando la técnica de bombardeo de partículas donde se han transformado células que se encuentran en suspensión (en medio líquido). Se utiliza una pistola de ADN que lo dispara sobre las células a cierta distancia y presión. Se logran hasta 4,000 transformaciones por disparo. Dado que es una técnica donde el resultado es prácticamente al azar, hay que regenerar las células nuevas en medios de cultivo para plantas y observar los resultados. En el CATIE se cuenta actualmente con varios ejemplares que han sido transformados con esta técnica y están pendientes de su prueba en campo para verificar el éxito de la transformación, por motivos de bioseguridad (Jackson et al, 2004).

Existen tres procedimientos mediante los cuales, una vez se ha aislado e identificado el gen de interés, es posible introducirlo en el ADN blanco que se desea transformar.

5.1 Bombardeo de partículas

En este procedimiento, el ADN es introducido a las células por medio de partículas microscópicas aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la

membrana celular sin causar, por lo general, efectos letales. Lo más recomendable es utilizar células blanco que se encuentren en suspensiones celulares, es decir, que sean células a las que se les ha eliminado su pared celular, lo cual facilita la entrada del ADN que se desea incorporar. Por su parte, el ADN que se desea introducir puede venir en forma de plásmido o en *cassettes* de mínima expresión. Los plásmidos son ADN circular que tienen las bacterias, adicional a su ADN genómico. Estos plásmidos se han utilizado como vectores para transportar el ADN al nuevo huésped tanto en este método de bombardeo de partículas, como en transformación usando otros microorganismos. Los *cassettes* de mínima expresión son construcciones de genes pequeños que se incorporan al ADN blanco.

Para el caso del bombardeo de partículas, se usan microproyectiles de forma aproximadamente esférica (de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro), hechos con materiales densos como tungsteno u oro, y que se recubren con el ADN que se desea transferir a las plantas. Para acelerar los microproyectiles, y que adquieran un *momentum* (masa x velocidad) suficiente para penetrar a las células blanco, se utilizan "macroproyectiles" que son impulsados a grandes velocidades por un choque de gas (los microproyectiles son colocados sobre su superficie), que puede derivarse de una explosión química, de la explosión eléctrica de una gota de agua o de una descarga de un gas inerte. Las células o tejidos que constituyen el blanco de los proyectiles se disponen de tal forma que presentan la máxima superficie para el bombardeo, en un área de cerca de 5 cm de diámetro. Para lograrlo, se sugiere guardar una relación celular de 0.2 ml de células por ml de medio, colocarlas luego en un papel filtro *Whatman #1* (para el caso de banano) y aplicar un vacío que asegure una mayor homogeneidad celular. El proceso de bombardeo se muestra en la Figura 9.

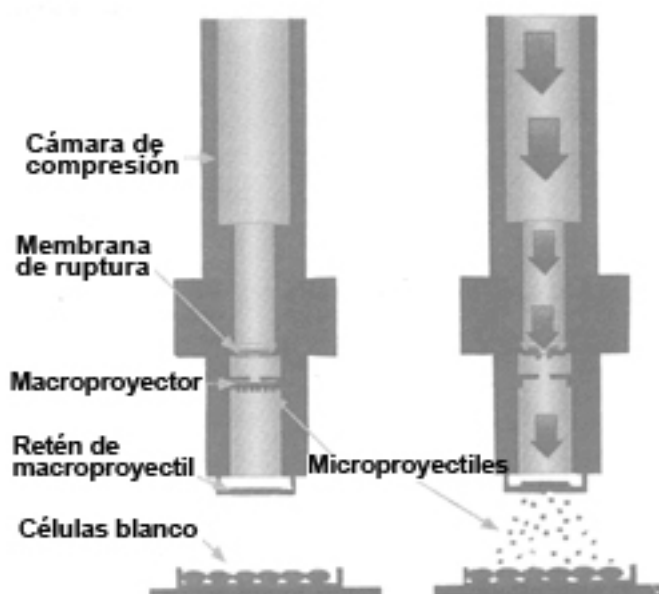


Figura 9. Bombardeo con micropartículas. El macroproyector es propulsado por una descarga de helio a alta presión sobre las células blanco previamente preparadas.

Fuente: Herrera *et al*, 1997

Una transformación exitosa depende del equilibrio que se consiga entre la distancia a la que se hará el disparo de ADN y la intensidad del mismo. Se pueden alcanzar en el caso de banano, hasta 4,000 transformaciones celulares por disparo. Para verificar si las células han sido modificadas se agrega al ADN nuevo, un gen de expresión transitoria conocido como GUS (β – glucuronidasa), que le da un color distinto a las células transformadas. Estas células se subcultivan nuevamente y luego se utilizan métodos de regeneración de plantas por cultivo de tejidos (organogénesis o embriogénesis somática) para obtener plantas completas que puedan ser sometidas a ensayos en invernadero y campo, y verificar el grado de transformación conseguida.

El método biolístico podría considerarse lo más cercano a un mecanismo "universal" de transferencia de genes, ya que por su naturaleza totalmente física, es independiente del tipo de célula blanco y ha sido utilizado no sólo para introducir ADN exógeno a células vegetales; sino a células de una gran variedad de organismos tales como bacterias, algas, hongos, células animales, y aún animales y plantas intactas. Adicionalmente, el proceso biolístico parece ser al presente, el único medio de transformar de modo reproducible organelos celulares, como mitocondrias y cloroplastos (Herrera *et al*, 1997; Jackson, 2004).

5.2 *Agrobacterium tumefaciens*

El *Agrobacterium* es una bacteria gram negativa que causa una enfermedad conocida como “corona de gallo”, caracterizada por la aparición de tumores en las raíces de numerosas plantas, especialmente dicotiledóneas. La particularidad radica en que esta bacteria introduce parte de su ADN en la planta y lo integra al ADN vegetal, causando la enfermedad y alteraciones en el metabolismo. Esta bacteria tiene la particularidad de disminuir la disponibilidad de nutrientes de las plantas y tiene una alta capacidad de infección.

A. tumefaciens tiene sus genes funcionales en un cromosoma y los genes que causan los tumores en su plásmido conocido como **Ti**. Cuando la bacteria infecta una planta, transmite la información del plásmido **Ti** a la planta, causando la enfermedad, y guarda la información genética funcional en su cromosoma. Lo increíble de este mecanismo es la capacidad que tienen las bacterias de separar sus genes funcionales de los genes de patogenicidad; de tal manera que si la bacteria pierde su plásmido, puede sobrevivir como otra bacteria no-patógena. Por otra parte, existen bacterias que poseen características benéficas contenidas en su plásmido, como es el caso de *Rhizobium*. De tal forma que si se reemplaza el plásmido **Ti** por un plásmido que confiera una característica ventajosa (fijación de nitrógeno, resistencia a insectos, entre otras), se puede utilizar al *Agrobacterium* como vector del nuevo gen.

El método consiste en aislar la bacteria y reemplazar el gen causante de la enfermedad por el gen que se desea introducir (gen de resistencia) para luego “infectar” la nueva planta con el ADN nuevo. A este proceso sigue la regeneración de las plantas usando

técnicas de cultivo *in vitro* y ensayos en campo para verificar la fijación del gen de interés. Este método ha acortado los programas de mejoramiento y ha permitido introducir genes particulares con gran éxito, como es el caso del mejoramiento genético de plantas que portan genes que le confieren resistencia a insectos (*Bacillus thuringiensis*) o genes que le dan resistencia a herbicidas.

5.3 Electroporación

Este método consiste en transformar células a las cuales se les ha removido la pared celular (protoplastos) para facilitar la entrada del ADN nuevo. Una vez se tienen los protoplastos en una suspensión líquida, se añade el ADN que se desea introducir. Este ADN debe tener un gen reportero, es decir, un gen marcado que se pueda medir fácilmente, el más común es el gen CAT.

Toda la solución se introduce en un *capacitor* que se carga eléctricamente. Cuando se añade un pulso eléctrico, las membranas celulares se abren temporalmente permitiendo la unión del ADN nuevo con el ADN de la planta. Este proceso se lleva a cabo muchas veces según lo indique el gen reportero CAT.

Posteriormente, las células se siembran, se estabilizan y se visualizan en cultivo para constatar si el ADN se ha incorporado a la célula huésped. Las colonias que muestren el ADN incorporado deben ser subcultivadas y someterlas a procesos de regeneración para obtener plantas transformadas que puedan ser evaluadas posteriormente.

6 Consideraciones finales

La biología molecular es considerada como una herramienta indispensable en los programas de mejoramiento genético. En este sentido, y en apego al espíritu de las entidades académicas, es fundamental procurar su máxima utilización en apoyo a los programas de investigación, docencia y proyección social.

Por ejemplo, las fuertes discusiones sobre el tema de alimentos transgénicos deben basarse en el estudio caso por caso de las transformaciones que se están llevando a cabo en los centros de investigación, principalmente en los Estados Unidos y la Unión Europea, para poder adoptar posiciones más técnicas sobre el tema. Estas herramientas han surgido como una ayuda para optimizar las condiciones de vida de los humanos mejorando la calidad de los cultivos nativos, adicionando genes resistentes a enfermedades y, por lo tanto, disminuyendo el uso y abuso de los plaguicidas e insecticidas que han demostrado tener fuertes y negativas influencias en la salud de los pobladores.

En América Latina, los laboratorios de biología molecular han incrementado su importancia, entre otros aspectos, por el incremento de las motivaciones de los países de la región para mejorar el nivel de conocimiento acerca de la riqueza y diversidad biológica existente, con la finalidad de contribuir tanto a su conservación efectiva como a su uso bajo esquemas que garanticen su perpetua renovación.

En Guatemala se impulsan varios proyectos de investigación enmarcados dentro de programas nacionales y con alianzas internacionales que sin duda ofrecen nuevas alternativas a la investigación y optimizan los recursos que son generalmente escasos para estos fines.

En muchas universidades de América Latina se imparten cursos para estudiantes de pregrado donde se analizan y practican este tipo de técnicas, que son una herramienta más para enfrentar el futuro laboral, lo cual debe ser considerado como un ejemplo para implementar estas áreas de conocimiento en las carreras agrícolas y afines. En Guatemala, resaltan la Facultad de Agronomía de la Universidad San Carlos de Guatemala, la Universidad del Valle de Guatemala y la Universidad Rafael Landívar, en donde se imparten cursos de biotecnología, así como el desarrollo de trabajos de investigación sobre biología molecular que involucran a estudiantes próximos a optar el título de licenciatura en el ámbito de la agronomía, la forestería o las ciencias ambientales en general.

En el ámbito de las ciencias forenses y las pruebas de paternidad, también son estas técnicas las que están ayudando a resolver conflictos de identidad y haciendo más seguros los trámites de adopción y reconocimiento de hijos. Asimismo, a través de esta técnica ya que es posible hacer escrutinios sobre el ADN de personas desaparecidas, cuya identificación es requerida hoy en día por sus familiares.

7 Bibliografía

1. Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Koornneef, M., Lister, C., Dean, C., van den Bosch, N., Pot J. & Kuiper, M.T. (1998). Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant Journal*, 14 (2), 259-71.
2. Anthony, F., Quirós, O., Etienne, H., Lashermes, P. & Bertrand, B. (1999). Estructuración de la diversidad genética en la especie *Coffea arabica* L., por los marcadores moleculares RAPD. En CATIE, *Actas de la 4ª. Semana Científica: Logros de la Investigación para el Nuevo Milenio, Programa de Investigación*, 6 – 9 de abril (pp. 22-25), Turrialba, Costa Rica.
3. Anthony, F., Quirós, O., Philips, W. & Bertrand, B. (1997). Uso de los marcadores moleculares para la evaluación, la conservación y el uso de la diversidad genética. En CATIE, *Actas de la 3ª. Semana Científica, Programa de Investigación*, 3-5 de febrero (p. 267), Turrialba, Costa Rica.
4. Astorga, C. & Quirós, O. (2004). *Protocolos para amplificación de ADN de café para las técnicas moleculares RAPD's, SSR (microsatélites) y AFLP*. Grupo Temático: Manejo y Uso sostenible de Recursos Fitogenéticos. Laboratorio de Biología Molecular del CATIE. Turrialba, Costa Rica: CATIE.
5. Ayala, F. & Kiger, J. (1984). *Genética moderna*. Fondo Educativo Interamericano, S. A.
6. Azurdia, C. (1999). Usando los recursos genéticos: Un acercamiento al acceso y tecnología. En *Estrategia Nacional para la Conservación y Uso Sostenible de la Biodiversidad –Guatemala-*. Guatemala: CONAMA, GEF, PNUD.
7. Brazauskas, G., Pasakinskien & Jahoor, A. (2004). AFLP analysis indicates no introgression of maize DNA in wheat x maize crosses. *Plant Breeding*, Volume 123, Issue 2, April, 117.
8. Deacon, J. (sf) *The Microbial World: Biology and control of crown gall (Agrobacterium tumefaciens)*. Extraído de helios.bto.ed.ac.uk.
9. Dorn, P. L., Engelke, D., Rodas, A., Rosales, R., Melgar, S., Brahney, B., Flores, J. & Monroy, C. (1999). Utility of the Polymerase Chain Reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60 (5), 740-745.
10. Dorn, P. L., Flores, J., Brahney, B., Gutiérrez, A., Rosales, R., Rodas, A. & Monroy, C. (2001). Comparison of Polymerase Chain Reaction on Fresh Tissue Samples and Fecal Drops on Filter paper for Detection of *Trypanosoma cruzi* in

Rhodnius prolixus. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 96(4), May 2001, 503-505. Rio de Janeiro.

11. Herrera, L., Jofre y Garfias, A., Arguello, G. & Simpson, J. (1997). *Transformación genética de plantas*. Extraído de: www.hemerodigital.unam.mx.
12. Jackson, S., Romero-Severson, J., Johnson, L., Stuart, J., Astorga, C., Quirós, O. & Ortiz, J. L. (2004). *Curso sobre Aplicaciones de herramientas moleculares en las ciencias agrícolas y forestales*, 17 – 21 de mayo de 2004. Apuntes y textos, manuscrito no publicado, CATIE.
13. León, L. (2001). *Utilización de marcadores de ADN polimórficos amplificados al azar (RAPD) para la detección de variación genética en 39 genotipos de caña de azúcar (Saccharum spp)*. Tesis para la obtención del título de ingeniero agrónomo, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
14. Philips, W. (2001). Caracterización. En CATIE, *Memorias de la 5ª. Semana Científica, 22–24 agosto* (pp. 1-18), Turrialba, Costa Rica.
15. Philips, W. & Crouzillat, D. (1999). Análisis de la resistencia a *Phytophthora palmivora* (Bult.) Bult en cacao usando QTL. En CATIE, *Actas de la 4ª. Semana Científica: Logros de la Investigación para el Nuevo Milenio, Programa de Investigación, 6 – 9 de abril* (pp. 36-39), Turrialba, Costa Rica.
16. Philips, W. & Escalant, J. V. (1995). Caracterización molecular de los recursos fitogenéticos. En CATIE, *Resúmenes de la 2ª. Semana Científica, 4-7 de diciembre* (pp- 4-6), Turrialba, Costa Rica.
17. Sagastume, H., Molina, L. & Ávalos, A. (2003). *Caracterización molecular, mediante AFLP, de la colección de variedades de frijol (Phaseolus vulgaris L.) liberadas por el ICTA*, Proyecto FODECYT No.15-01. Guatemala: ICTA & SENACYT.
18. Thomas, C. M., Vos, P., Zabeau, M., Jones, D. A., Norcott, K. A., Chadwick, B. P. & Jones, J. D. G. (1995). Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Claosporium fulvum*. *Plant Journal* 8, 785-794.
19. Vásquez, S., Phillips, W., Navarro, C. & Cornelius, J. (1999). En CATIE, *Actas de la 4ª. Semana Científica: Logros de la Investigación para el Nuevo Milenio, Programa de Investigación, 6 – 9 de abril* (pp. 40-43), Turrialba, Costa Rica.
20. Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res* 18, 7213-7218.

21. Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski, J. & Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res* 18, 6531-6535.
22. Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies of microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

Referencias electrónicas:

1. www.arrakis.es/~lluengo/adn.html
2. <http://biogenomica.com>