

## CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS RECURSOS FITOGENETICOS

Wilbert Phillips. Jean Vincent Escalant

**Summary:** Efficient utilization of genetic resources of crop plants depends on their adequate characterization. Traditionally, this characterization has been made using phenotypic traits, which have helped to differentiate various genotypes, but not always in an accurate way because they are affected by environmental effects. DNA markers that are not subjected to these influences, provide an opportunity to examine and describe more precisely the genotypes and their relationships at a genetic level. RAPD analysis has been applied in CATIE for the characterization of coffee, cocoa, pepper, tomato, and mahogany germplasm. This information may be useful to improve organization and utilization of germplasm collections and to design future collection strategies. In cacao, genetic characterizations have been mainly used to verify cultivar, to build linkage maps, and to determine Quantitative Trait Loci (QTL) for different traits.

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, que ha hecho inclusive cuestionar su utilidad (Brown 1979, Glotieb 1977).

Los marcadores moleculares no están sujetos al ambiente, pues evalúan los materiales a nivel genético, permitiendo examinar y describir más precisamente los genotipos y las relaciones existentes entre ellos (Powell 1992). Existen dos tipos de metodologías relacionadas con los marcadores moleculares: aquellas que utilizan proteínas, en especial análisis de proteínas de la semilla y de las isoenzimas, y aquellos que utilizan ADN, como son el análisis RFLP y los procedimientos basados en la metodología PCR ("Polymerase Chain Reaction"), a saber, análisis RAPD, microsatélites, etc. (Phillips *et al.* 1995).

Las isoenzimas fueron los primeros marcadores moleculares usados en genética de plantas. Desde su descubrimiento en 1957, han jugado un papel importante en muchas áreas de la biología. A pesar de sus grandes aportes, su utilización ha estado limitada por el escaso número de colorantes enzimáticos disponibles y por la imposibilidad de contar con suficientes marcadores para cubrir todo un genoma, pues de hecho sólo representan una estrecha fracción del genoma total de la planta (Tanksley 1993).

Los marcadores de ADN permiten evaluar potencialmente todo el genoma. Las evaluaciones pueden realizarse desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo, usando toda o parte de la misma. Además de ser muy útiles para la caracterización e identificación de los genotipos, pueden ser usados para la cuantificación de la diversidad genética, para la eliminación de duplicados en las colecciones, para el diseño de estrategias de colecta de germoplasma, para la selección precoz de individuos y para estudios taxonómicos, filogenéticos y biológicos (Haines 1994).

El análisis RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphic DNA") es una técnica usada en los programas de investigación desde los años 70. Aunque muy útil y ampliamente usado para la caracterización de germoplasma, se ha visto limitado por su costo y dificultad metodológica y por el uso de sondas específicas y sustancias radioactivas (Skroch *et al.* 1994). El análisis RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") fue descrito por primera vez en 1990 por dos grupos independientes de investigadores (Williams *et al.* 1990, Welsh y 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 relativamente barata, aunque se ha cuestionado su reproducibilidad entre laboratorios.

En el CATIE, las investigaciones con marcadores moleculares se iniciaron en 1987, utilizando inicialmente RFLP. Debido a sus ventajas, pronto se adoptó el análisis RAPD como metodología de trabajo, aunque en coordinación con el laboratorio Francereco (Tours, Francia) se continuaron haciendo investigaciones con RFLP, pero específicamente en cacao. A continuación se mencionan las principales aplicaciones en el CATIE de los marcadores de ADN.

**Caracterización de germoplasma:** Este es uno de los principales usos de los marcadores a nivel mundial. La caracterización precisa del germoplasma, hace posible el empleo de otras aplicaciones utilizando los marcadores. En el CATIE se inició en 1993 un proyecto que busca caracterizar molecularmente la colección de café, que es una de las más importantes del mundo. Para esto se han calibrado los protocolos de trabajo y se han seleccionado un grupo de "primers" polimórficos, o sea, aquellos capaces de marcar diferencias entre genotipos (aprox. 15% de los evaluados). Con ellos ya se ha iniciado la evaluación de grupos específicos de genotipos. En caoba las investigaciones apenas empiezan, pero ya se han evaluado dos métodos de extracción de ADN y dos protocolos RAPD, los cuales han sido exitosos para detectar diferencias entre genotipos.

En conjunto con la Universidad de Wisconsin se evaluaron 96 genotipos de tomate de la colección del CATIE usando 39 "primers" y 103 bandas polimórficas. Los resultados permitieron una caracterización precisa de los genotipos, pero también la estimación de las distancias genéticas entre introducciones y el estudio de la composición genética de la población. La determinación de las distancias genéticas es una información valiosa que permite organizar con una base sólida los recursos genéticos disponibles (Dos Santos *et al.* 1994). En este momento se está realizando un estudio similar con 96 genotipos de *Capsicum*, también de la colección de germoplasma del CATIE.

**Verificación de cultivares:** Por mucho tiempo se creyó que los 120 árboles del Experimento Central de cacao pertenecían al cruce Catongo x Pound-12, pero los análisis RFLP llevados a cabo por el Laboratorio Francereco demostraron que sólo 55 árboles son híbridos verdaderos. Usando la misma metodología se encontró que cinco árboles del retrocruce Catongo x (Catongo x Pound-12) tampoco correspondían al material original. Esto ejemplariza la utilidad de los marcadores de ADN para detectar mezclas, lo cual tiene una gran importancia en especies perennes y en producción de semillas.

**Construcción de mapas de ligamiento genético:** Un mapa de ligamiento genético es una representación gráfica que muestra las posiciones relativas de los genes y/o marcadores en los grupos de ligamiento (cromosomas). En cacao se han construido dos mapas de este tipo utilizando dos poblaciones segregantes, a saber: el retrocruce Catongo x (Catongo x Pound-12) y la población Catongo x Pound-12. En el primer caso se evaluaron 1.200 "primers" y se seleccionaron 100 polimórficos. Además, se incluyeron en el mapa 12 marcadores RFLP y dos marcadores fenotípicos. La existencia de este tipo de mapas abre la posibilidad de determinar los locus relacionados con características cuantitativas o QTL, y en etapas más avanzadas, la identificación, aislamiento y manipulación de genes deseables.

**Determinación de los QTL:** La determinación de los QTL es útil en el mejoramiento genético de las plantas, porque ellos pueden servir como marcadores para la selección de plantas en estados tempranos de desarrollo (semillas, plántulas, etc.) y porque actualmente es posible no sólo encontrar el locus que está ligado con una característica, sino que también identificar el gen asociado con ese locus. En cacao, para cada árbol del retrocruce se obtuvieron tanto datos fenotípicos como datos generados con los marcadores de ADN. Ya que los datos de los marcadores fueron integrados dentro de un mapa de ligamiento genético, las comparaciones entre los patrones de herencia de estos marcadores con los datos fenotípicos permitieron detectar áreas en el cromosoma que están relacionadas con las características, o sea, los QTL. Estos han sido detectados para muchas características poligénicas del cacao, entre otras: semillas por fruto, peso de las semillas, área foliar, contenido de cafeína y teobromina, diámetro del tronco, etc. Ha sido también posible identificar de 3 a 5 loci relacionados con la resistencia al hongo *Phytophthora palmivora*, lo que abre nuevas posibilidades para la interpretación de la herencia de la resistencia y para la manipulación de la misma a nivel genético.

Se concluye entonces que los marcadores de ADN tienen un gran potencial para la caracterización de germoplasma, lo cual abre un amplio grupo de otras posibles utilidades. El CATIE ya ha empezado a utilizar estas tecnologías y a obtener resultados concretos de su aplicación.

## Literatura citada

- BROWN, A.H.D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theoretical Population Biology* 15:1-42.
- DOS SANTOS, J.B.; NIENHUIS, J.; SKROCH, P.; TIVANG, J.; SLOCUM, M.K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor.App.Genet.* 87:909-915.
- GLOTIEB, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals Missouri Botanical Gardens* 64:161-180.
- HAINES, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement with special reference to developing countries. Rome, FAO. pp.41-67.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SKROCH, P. 1994. Analysis of genetic relationships among genotypes based on molecular marker data. *In Applications of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, Minnesota.* pp.8-14.
- PHILLIPS-MORA, W.; RODRÍGUEZ, H. Y FRITZ, P.J. 1995 Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de Trabajo. Con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). CATIE, Turrialba, Costa Rica. Serie Técnica-Informe Técnico no.252. 183 p.
- POWELL, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. *In Moss, J.P., ed. Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.* pp.297-322.
- SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. 1994. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *In Applications of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis, Minnesota.* pp.26-30.
- TANKSLEY, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27:205-233.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nuclei Acids Res.* 18:7213-7218.
- WILLIAMS, J.G.K. *et al.* 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuclei Acids Res.* 18:6531-6535.