

MARCADORES MOLECULARES *

Alejandro Calderón **

I. INTRODUCCION

Los marcadores genéticos descritos hasta el momento (morfológicos e isoenzimáticos) tienen la desventaja de ser regulados a través del desarrollo, es decir, que sólo serían expresados fenotípicamente en estados específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos. Además los caracteres morfológicos pueden tener efectos pleiotrópicos en características agronómicas de interés.

Recientemente ha sido descrita una nueva clase de polimorfismo genético llamado polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción RFLPs o Restricción Fragment Length Polymorphisms por sus siglas en Inglés. Algunas de las ventajas que presentan estos marcadores incluyen ausencia de dominancia, alelos múltiples y efectos pleiotrópicos sobre otras características. Además el análisis del polimorfismo se hace directamente sobre el ADN. (Figura 1).

II. ANALISIS A NIVEL DEL ADN

La metodología para producir los RFLPs se basa en el uso de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas de ADN y cortan el ADN en estos sitios o en sitios adyacentes. Entre más frecuente el sitio de reconocimiento de la enzima, el ADN será cortado con más frecuencia. Los fragmentos de ADN producidos de esta manera pueden ser separados por medio de la electroforésis ya que los fragmentos más pequeños se moverán más rápidamente a través del gel. Los diferentes fragmentos de ADN pueden ser visualizados utilizando un sistema fotográfico conectado a un transiluminador de UV (Figura 2).

Cuando el ADN de un organismo superior es digerido con una enzima de restricción se producen muchos fragmentos de diferentes longitudes que se distribuirán a lo largo del gel a manera de una mancha continua. Por lo tanto un fragmento específico sólo puede ser detectado utilizando una sonda apropiada que consiste de un fragmento de ADN que ha sido clonado, el cual es homólogo al fragmento que queremos visualizar. Los diferentes fragmentos en el gel se deben transferir a un soporte

* Contribución Unidad de Biotecnología. Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT

** Biólogo M.Sc. Unidad de Biotecnología -CIAT. A.A. 6713 Cali, Colombia.

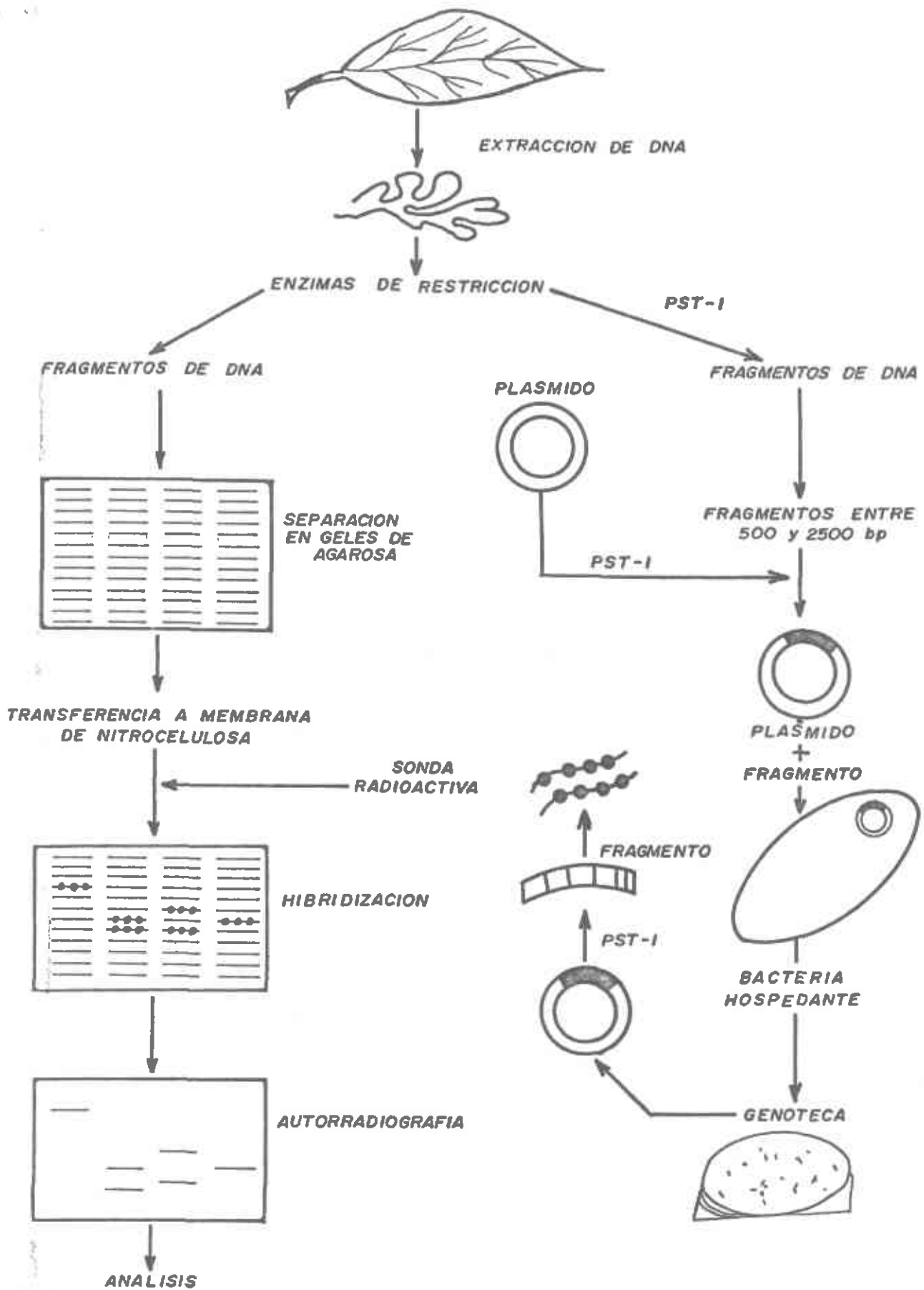


Fig. 1.- Descripción de la técnica de RFLPS

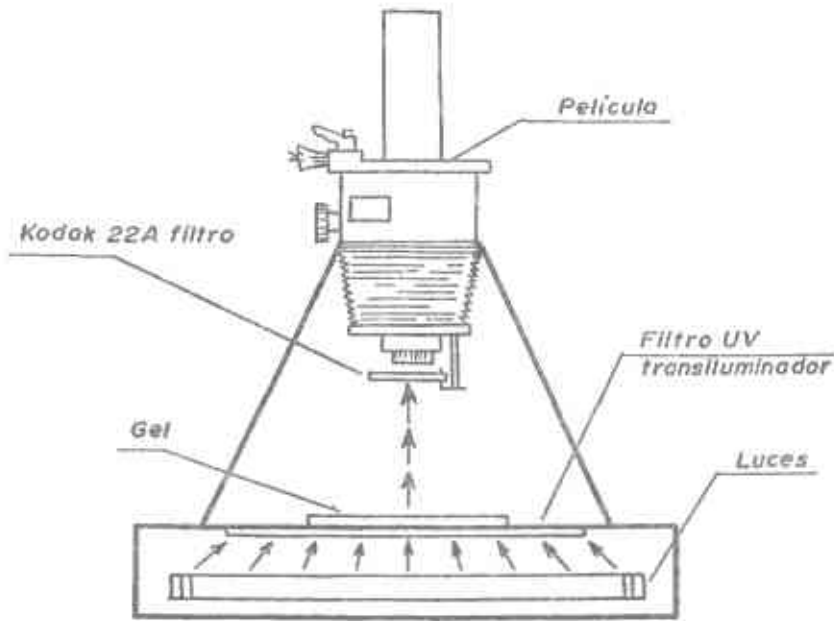


Fig.2 - Método fotográfico para detectar la presencia del DNA digerido con enzimas de restricción

sólido, para ser expuestos a una sonda marcada radioactivamente en condiciones que favorecen la hibridación ADN-ADN. El soporte es entonces utilizado para exponer una película fotográfica que después de ser revelada hará visible el fragmento de ADN que se hibridizó con la sonda. Utilizando este tipo de sonda de ADN único, puede ser detectado un fragmento de rara ocurrencia (uno en un millón o menos). Las sondas de ADN utilizadas para los RFLPs no necesitan ser homólogos con genes conocidos. Cualquier secuencia de ADN puede servir para los RFLPs siempre y cuando pueda hibridizarse con algunos de los fragmentos producidos después del proceso de restricción.

Cualquier cambio ocasionado por mutaciones puntuales puede alterar la secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción en particular eliminando o creando nuevos sitios de reconocimiento. De manera similar delecciones o transposiciones de grandes fragmentos de ADN pueden originar cambios simultáneos en los patrones de restricción de diferentes enzimas. Como resultado, una enzima de restricción en particular no cortará en ADN de dos individuos por el mismo lugar. Por lo tanto se formarán fragmentos de diferente longitud cuando el ADN de los dos individuos es cortado con la misma enzima. Debido a su diferencia en longitud los fragmentos se localizarán en posiciones diferentes después de la electroforesis, hibridación y autoradiografía.

III. APLICACIONES DE LOS RFLPs

Dentro de las aplicaciones de los RFLPs se encuentran:

- a. Caracterización de variedades
- b. Identificación (mapeo) de los loci genéticos que afectan las características multigénicas o cuantitativas.
- c. Programas de mejoramiento genético a través de evaluación de germoplasma, marcadores para introgresión de locis mayores, producción de híbridos comerciales y selección dentro de poblaciones.
- d. Análisis de variación somaclonal

Análisis de características multigénicas. Aunque muchas de las características en las especies cultivables, incluyendo resistencia a enfermedades, están determinadas por loci que tienen un efecto drástico sobre el fenotipo, la mayoría de las características de importancia económica tales como producción y resistencia horizontal al estrés, son de naturaleza cuantitativa. Es decir, que la variación fenotípica en las características cuantitativas está caracterizada por diferencias cuantitativas continuas entre individuos y una distribución normal de los valores fenotípicos en una población en particular. Las diferencias genéticas que afectan las características cuantitativas, ya sea dentro o entre poblaciones, están determinadas por un número relativamente grande de loci, cada uno de los cuales aporta una pequeña contribución cuantitativa, ya sea positiva o negativa, para obtener el valor fenotípico final de la característica. Esta clase de loci se denomina "loci para característica cuantitativa" y se abrevia como "QTL" (del inglés, Quantitative Trait Loci).

Utilizando técnicas de genética cuantitativa como diseños experimentales especiales y análisis de datos, ha sido posible comprender un poco la arquitectura genética de las características cuantitativas y utilizar este conocimiento como guía para los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, la importancia para distinguir y manejar loci individuales que afectan una característica de importancia económica en los programas de mejoramiento, imponen un serio limitante a la efectividad de la genética clásica en los procedimientos de mejoramiento. De igual manera, la identificación de los genes que afectan una característica cuantitativa es un limitante para su clonamiento y posterior uso en ingeniería genética. Por lo tanto, los dos métodos disponibles para el mejoramiento genético están más o menos limitados en sus posibilidades para manejar las características cuantitativas.

Recientemente se ha demostrado que los RFLPs proporcionan un método confiable para transformar los QTL en entidades mendelianas o cuasimendelianas que pueden ser fácilmente manipuladas en programas de mejoramiento genético y que en un futuro podrían ser utilizadas para clonamiento con el propósito de ser usados en ingeniería genética. Utilizando los RFLPs, existen básicamente 3 vías para identificar y manipular los QTL:

1. Determinación de ligamiento entre RFLP y QTL para posteriormente hacer el mapa y la evaluación de los efectos del QTL.
2. Identificación directa de la variación alélica en un QTL y
3. Identificación y clonamiento de QTL por métodos de mutagénesis por inserción.

Paterson et al, 1988, describieron un nuevo método para el análisis de QTL. Se utilizó un mapa genético detallado con base en los RFLPs para evidenciar los factores genéticos que afectaban varias características en la fruta del tomate (peso de la fruta, concentración de sólidos, solubles y pH). El método empleó el mapeo a intervalos utilizando el método estadístico de máxima probabilidad. Este mapeo a intervalos da cuenta de los efectos de cada segmento genómico localizado entre dos loci marcadores en lugar de los efectos asociados con loci individuales. Esto reduce las posibles confusiones que se pueden presentar por los efectos de recombinación entre loci marcadores y los QTL.

Mapeo génico. Se entiende por mapeo génico la ubicación espacial de un gen en una región específica del cromosoma. En el caso de los marcadores moleculares como los RFLPs, es necesario mapearlos una vez se han identificado. Esto se puede hacer de manera simple cuando se posee material genético especial. Por ejemplo en maíz se desarrolló un mapa con 130 loci (RFLPs) que cubría los 10 cromosomas del maíz y 50% del mapa genético total de esta especie, utilizando líneas monosómicas y análisis de segregantes. También se pueden hacer mapas genéticos utilizando series de aneuploides como es el caso del trigo. En otras técnicas de mapeo simple se utilizan líneas celulares de híbridos somáticos interespecíficos. Técnicas de hibridación in situ y genotecas de cromosomas particulares. Lógicamente que las técnicas mencionadas anteriormente son de gran utilidad en los cultivos donde se dispone de estas facilidades genéticas. Sin embargo, cuando no existe ningún material especial para hacer el mapa genético, éste se puede construir por análisis de segregantes.

IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Por lo expuesto hasta aquí se vé que la biología molecular se está convirtiendo en una herramienta poderosa en los programas de mejoramiento. Se están acumulando una serie de metodologías para determinar la presencia de marcadores que son fácilmente detectados y rastreados en los programas de mejoramiento. Estas nuevas tecnologías son complementarias a los métodos tradicionales. En el futuro, serán los programas coordinados de métodos tradicionales con biotecnológicos, los que produzcan las nuevas variedades mejoradas.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Lander, E.S. and D. Botstein, 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps.
2. Paterson et al, 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of Restriction Fragment Length Polymorphisms. Nature, 335-721.
3. White, R. y J.M. Lalouel 1988. Cartografía cromosómica con marcadores de ADN. Investigación y Ciencia 139:12-20.