

Capítulo 36

Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal

H. Ramírez*

A. Calderón*

W. M. Roca*

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

Introducción

El mejoramiento de plantas ha contribuido sin duda a la producción de nuevas variedades, que rinden más y mejor, de los cultivos tradicionales. Adelantos sin precedentes se han obtenido en la tolerancia a la sequía y a los suelos ácidos, en la habilidad simbiótica para la fijación del nitrógeno, en la arquitectura de la planta, y en otras características. Sin embargo, hay limitaciones en la velocidad y precisión con que muchas de las características útiles pueden ser identificadas, seleccionadas y utilizadas en los programas de mejoramiento. Por otro lado, en las colecciones mundiales de germoplasma hay bajas frecuencias de variabilidad genética para la mayoría de las características agronómicas de interés. Por tanto, el mejoramiento genético se beneficiaría mucho de la existencia de información disponible sobre la herencia de características importantes, sobre su localización precisa en los cromosomas, y sobre su distribución dentro de los bancos de germoplasma.

Los rápidos avances de los últimos años en biología molecular proveen las herramientas necesarias para el estudio del mejoramiento genético de las plantas. Algunas de estas técnicas son útiles en la caracterización de germoplasma y en la identificación —y ubicación física en los cromosomas— de características importantes. Estas nuevas técnicas hacen un análisis a nivel genómico, y pueden tomar diferentes rutas: una indirecta, haciendo un análisis de proteínas o de enzimas, y otra directa, analizando el ADN por medio del polimorfismo longitudinal de los fragmentos de restricción (RFLPs). Con estos análisis se identifican marcadores moleculares asociados con características morfológicas, los cuales servirían para: a) determinar la variabilidad genética en los bancos de germoplasma; b) desarrollar mapas de ligamiento genético; y c) identificar genes específicos con el fin de rastrear su flujo en los programas de mejoramiento.

Los marcadores moleculares tienen dos características muy útiles en el mejoramiento genético: primera, ocurren naturalmente y por tanto no necesitan ser inducidos, y segunda, su expresión (como en las proteínas e izoenzimas) o su presencia (en los RFLPs) no está influenciada por efectos epistáticos.

En este capítulo se señalan algunos aspectos importantes del uso de los marcadores moleculares en la caracterización del germoplasma y en los programas de mejoramiento.

Conceptos Fundamentales

Poteínas, enzimas e isoenzimas

Las proteínas son biomoléculas constituidas por aminoácidos y organizadas en unidades estructurales. Dentro de un organismo, las proteínas pueden encontrarse formando parte de estructuras (la actina, p.ej., en los microfilamentos que conforman el huso acromático), pueden ser reservorios nutritivos (la faseolina), o pueden realizar una función catalítica (las enzimas). Las enzimas, por tanto, son proteínas que ejercen una función catalítica específica, es decir, aceleran las reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula. Las enzimas pueden ser desde monómeros (una sola cadena polipeptídica) hasta complejos multiméricos (más de una cadena polipeptídica asociada por medio de enlaces no covalentes) que desarrollan reacciones catalíticas muy complejas, como la replicación del ADN.

Las diferentes formas moleculares de una misma enzima que tienen afinidad por el mismo sustrato se denominan isoenzimas (Market y Moller, 1959). Varias son las causas de la variabilidad en las enzimas: a) causas primarias o genéticas, cuando el organismo porta varios genes que codifican, cada uno, un tipo diferente de subunidad; y b) causas secundarias o postraduccionales, cuando las subunidades homogéneas son modificadas diferencialmente obteniéndose así 'diferentes' subunidades, todas provenientes de un mismo gen. Por otro lado, existen dos tipos de diversidad genética en las enzimas: los alelos múltiples en un solo locus genético, y varios loci genéticos. En el Cuadro 36.1 se muestra un diagrama de la genealogía de la multiplicidad enzimática.

Electroforesis de las proteínas

Algunos de los aminoácidos que constituyen las proteínas pueden estar ionizados, es decir, tendrían carga positiva o negativa. Por tanto, la proteína que ellos constituyan puede ser catiónica (positivamente cargada) o aniónica (negativamente cargada), según el signo de la suma de las diferentes cargas parciales de los aminoácidos presentes en ella. Si una de estas proteínas cargadas se coloca en un campo eléctrico, se moverá hacia el electrodo de carga opuesta a la suya. Hay tres factores fundamentales que afectan la movilidad de una proteína bajo condiciones de electroforesis:

1. La carga de la proteína, que determina en ésta la dirección de la migración y que influye directamente en su velocidad de movilidad.

Las proteínas son electrolitos débiles y su ionización está muy afectada por el pH del medio que las rodea. La carga de una proteína en solución se puede controlar usando diferentes sistemas 'bófer'.

2. La fuerza del campo eléctrico, que afecta directamente la movilidad.
3. Las fuerzas de fricción, las cuales se oponen a la migración.

Cuadro 36.1. Genealogía de la multiplicidad enzimática.

Causas	Condición genética			
			Gen 1	Gen 2
A. Genéticas	Muchos loci genéticos	ADN		
		mARN	1	2
		Subunidades de la enzima activa	1	2
		DNA paterno		Alelo 1
	DNA materno		Alelo 2	
	Alelos múltiples	A ₁	A ₂	
B. Postraduccionales	Modificaciones covalentes			
	A ————— A'			

FUENTE: Rider y Taylor, 1980.

La matriz o soporte en el que se realiza la electroforesis es generalmente un gel de poliacrilamida. El soporte tridimensional de los geles de poliacrilamida consta de polímeros de acrilamida entrecruzados a manera de red por un segundo agente, generalmente el denominado 'bis' (N,N'-metilén-bisacrilamida). El tamaño de los poros está determinado por el porcentaje de gel, y éste a su vez depende de la cantidad de acrilamida y de la proporción entre acrilamida y bis. Así, por ejemplo, los poros en un gel de 20% serán más pequeños que en un gel de 15%.

La electroforesis en geles de poliacrilamida y empleando SDS (dodecil sulfato de sodio) es la más usada cuando se analizan proteínas, puesto que da información sobre la cantidad y el tipo de las proteínas de una mezcla, su abundancia relativa, y la medida de su peso molecular. El SDS es un

detergente aniónico que reacciona con las proteínas antes de la electroforesis; después de esa reacción, la proteína adopta una carga negativa uniforme y una estructura alargada. El complejo SDS-proteína es soluble, y bajo condiciones de electroforesis viajará a través del gel de poliacrilamida hacia el ánodo.

Hay dos sistemas de coloración ampliamente utilizados para visualizar las proteínas en los geles de poliacrilamida: la tinción con el azul de Coomassie y el método de unión de iones de plata con las proteínas. Sin embargo, cuando se trata de enzimas o isoenzimas, la coloración se obtiene gracias a la actividad específica de la enzima.

Electroforesis del ADN

A pH neutro o alcalino, los grupos fosfato de la molécula de ADN confieren a ésta carga uniforme negativa por unidad de longitud. Por lo tanto, en un campo eléctrico el ADN viajará hacia el ánodo atraído por una fuerza constante que es independiente de la composición de bases del ácido, de modo que las moléculas grandes se moverán más lentamente que las moléculas pequeñas.

Los geles de poliacrilamida utilizados en la electroforesis de enzimas o de proteínas forman poros muy pequeños que no permiten el paso de grandes moléculas de ADN. Por tanto, en la electroforesis del ADN se emplean con más frecuencia geles de agarosa. Estos geles mantienen su fuerza física estructural con poros de tamaño mucho más grande que los de los geles de poliacrilamida, y por este motivo se utilizan para fraccionar moléculas de ADN que tengan más de 200 pares de bases.

La Biología Molecular en la Evaluación y Caracterización de Germoplasma

Análisis de proteínas y polipéptidos

Mediante la técnica de la electroforesis, las proteínas presentes en los extractos crudos de los tejidos vegetales pueden ser separadas y visualizadas para que sirvan a los bancos de germoplasma en la caracterización de éste. A continuación se describen ejemplos prácticos de la utilización de esta técnica en cultivos como el frijol, la yuca y algunos pastos tropicales.

La variabilidad en los patrones electroforéticos de la proteína de la semilla de frijol, la faseolina, ha sido una herramienta muy útil para los estudios de domesticación y distribución del germoplasma de frijol común (Gepts y Bliss, 1985).

El extracto crudo de proteína de la semilla de frijol está constituido principalmente por albúminas y globulinas, que representan el 40% y el 60%, respectivamente, de la proteína total. Hasta el momento¹ se han descrito 22 patrones electroforéticos de faseolina, algunos de los cuales están estrechamente relacionados con las zonas geográficas de origen del frijol (Gepts et al., 1986). De los tipos de faseolina descritos vale mencionar el tipo S (Sanilac) proveniente de la región mesoamericana, el tipo T (Tendergreen) proveniente de los Andes del sur, y el tipo C (Contender) proveniente de una zona intermedia entre meso-América y los Andes del sur.

El estudio electroforético de la faseolina en una colección de frijol del Este de Africa demostró que en la mayor parte de esos materiales predominaba el tipo T; este resultado indica que dichos materiales fueron introducidos originalmente de los Andes del sur (Triana, 1988).

Empleando electroforesis en geles de dos dimensiones se pueden analizar simultáneamente muchas cadenas polipeptídicas. Esta técnica se basa en la separación inicial de los polipéptidos en una dimensión, según el punto isoeléctrico, y en su separación posterior en una segunda dimensión, mediante la electroforesis normal.

Los niveles de expresión de los polipéptidos están influidos por el ambiente y, en consecuencia, su análisis permite asociar cadenas polipeptídicas específicas con la expresión genética de algunas características.

La arcelina es un buen ejemplo de un marcador proteico ligado a una característica de interés que, en este caso, es la resistencia al ataque de los brúquidos. Estos marcadores ligados a características de interés pueden ser proteicos, isoenzimáticos o fragmentos de DNA.

En plantas de *Phaseolus vulgaris* silvestres se han encontrado altos niveles de resistencia a dos gorgojos (*Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*) que causan grandes pérdidas al grano de frijol almacenado (CIAT, 1988b). En estos materiales resistentes se identificó y se aisló una proteína denominada arcelina que es responsable de la resistencia a *Z. subfasciatus* (Osborn et al., 1988; CIAT, 1988a).

1. Debouck, D. Comunicación personal.

Hasta el momento se han identificado cuatro patrones electroforéticos de arcelina, y han sido denominados con este nombre y con los números 1, 2, 3 o 4. Los estudios electroforéticos de la arcelina hechos por los entomólogos de frijol del CIAT permiten discriminar rápidamente variedades resistentes y susceptibles de *P. vulgaris* silvestres.

Análisis de isoenzimas

Muchas de las proteínas obtenidas de los extractos crudos de semillas o de tejidos son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas específicas. Una vez separadas estas enzimas por medio de la electroforesis, se puede localizar una enzima específica colocando el gel en una bandeja que contenga el sustrato, junto con cofactores y colorantes adecuados. Los productos de esa reacción enzimática reaccionan a su vez con la solución de tinción formando complejos coloreados; éstos dan lugar a una banda visible en el sitio donde se hallan dentro del gel. El conjunto de bandas generadas en la tinción se denomina zimograma.

Se dice que una proteína, una isoenzima o un fragmento de restricción de ADN es un 'marcador de clasificación' cuando presenta variaciones electroforéticas (polimorfismo) en los materiales de la especie analizada. Para seleccionar las isoenzimas que podrían usarse como marcadores de clasificación, se hará primero un 'rastreo' de todas las isoenzimas que se puedan teñir en todos los tejidos posibles; luego se seleccionan los marcadores que muestren mayor polimorfismo y el tejido donde mejor se presenten. Cuando se utiliza un marcador isoenzimático para caracterizar materiales dentro de una colección, no es necesario el conocimiento genético de la misma; cuando se trata, en cambio, de estudios de ligamiento de marcadores isoenzimáticos o de ADN con ciertas características de interés agronómico, se requiere conocer muy bien la genética de los marcadores.

Un ejemplo de la aplicación de los marcadores isoenzimáticos al germoplasma de frijol es la caracterización de líneas nativas y mejoradas de *P. vulgaris* provenientes de América del Norte, América Central y América del Sur, África y el Medio Oriente. Mediante la variabilidad que presentan en los patrones electroforéticos de las isoenzimas fosfatasa ácida (AcP), diaforasa (NADH-Dia), esterasa (EST), Rubisco, y shikímico-deshidrogenasa (SkDh), se analizó la base genética para la formación de subgrupos o de acervos genéticos (Vargas, 1988).

El estudio electroforético de ocho marcadores isoenzimáticos permitió definir dos grandes grupos de variabilidad genética que correspondían a

los dos principales centros de domesticación del frijol; las regiones mesoamericana y de los Andes; cada grupo fue subdividido en cinco grupos con características morfológicas y bioquímicas diferentes. En ese estudio se sugiere la búsqueda de nuevos marcadores evolutivos, como la faseolina, para definir la procedencia real de los materiales ubicados en algunos subgrupos (Vargas, 1988).

Estudios isoenzimáticos con materiales de frijol de Cajamarca, Perú, mostraron que en esos materiales hay gran variabilidad y que ésta puede aprovecharse en programas de mejoramiento para la ampliación de la base genética del frijol (Vargas, 1988).

Otro ejemplo de la aplicación de la electroforesis a las isoenzimas es el estudio del hongo *Thanatephorus cucumeris* Frank (Donk) (amorfo: *Rhizoctonia solani* Kuhn), agente causal de la mustia hilachosa del frijol, una enfermedad ampliamente distribuida, p. ej., en la zona cafetera de Colombia. En este estudio se utiliza la electroforesis de proteínas e isoenzimas como el método más eficiente para caracterizar los marcadores bioquímicos y correlacionarlos con las características patogénicas de los aislamientos de este hongo.²

Base genética de las isoenzimas

La combinación de tripletas de nucleótidos conforma el código genético, en el que cada aminoácido está codificado por una, al menos, de esas tripletas, a saber: dGTP, dCTP, dATP, y dTTP.

Mediante los procesos de transcripción y de traducción, fragmentos específicos de DNA (genes) se traducen en cadenas lineales de secuencias definidas de aminoácidos, llamadas polipéptidos. La mayor parte de estos polipéptidos formarán enzimas, las cuales catalizan las reacciones bioquímicas específicas en las diferentes vías metabólicas de los organismos. Algunas de esas enzimas están formadas por una sola copia de la cadena polipeptídica o producto génico, mientras que otras contienen más de una copia del producto génico que conforma la estructura cuaternaria de la enzima activa formando, p. ej., dímeros, trímeros, tetrámeros, etc.

En las enzimas multiméricas, los polipéptidos codificados en un locus simple (formado por dos alelos) se combinan al azar para formar la enzima activa. En un individuo que sea heterocigoto para un determinado locus,

2. Claros, J. L. Comunicación personal.

los segmentos de ADN que conforman los alelos (A y a) se diferencian en uno o más nucleótidos, y codifican para polipéptidos que diferirán en uno o más aminoácidos; ahora bien, no sólo difieren los polipéptidos en el tipo de aminoácido sino también en la conformación espacial y en la carga neta, lo que influirá en su movilidad dentro del gel cuando sean separados por medio de electroforesis.

Cuando el producto de los alelos de un individuo heterocigótico que codifica para una enzima monomérica es separado por electroforesis, aparecen dos bandas simples denominadas banda rápida (fast band), o sea, la que se aleja más del origen catódico, y banda lenta (slow band), la que migra poco y se halla más cerca de ese origen.

Los productos génicos de los alelos (A y a) de un individuo heterocigótico que codifican para una enzima dimérica se combinan al azar, y producen tres formas moleculares de la enzima que están representadas por los genotipos AA, Aa, y aa. Estas tres formas moleculares se hallarán en la proporción 1:2:1, donde la forma híbrida o heteromérica Aa tendrá el doble de copias que las formas AA y aa. Por tanto, al ser separadas las tres por electroforesis, se observará un patrón de tres bandas: la banda más liviana (aa) estará más alejada del origen, la banda más pesada (AA) estará más cerca del origen, y la banda híbrida (Aa) quedará en un punto intermedio y presentará el doble de intensidad de tinción que las bandas AA y aa.

La Figura 36.1 muestra los posibles patrones de bandas para enzimas monoméricas, diméricas, triméricas y tetraméricas codificadas por un locus simple de un individuo heterocigótico. En esta figura se observa que para un enzima trimérica se producen cuatro formas moleculares (AAA, AAa, Aaa y aaa) en una proporción 1:3:3:1, y que para una enzima tetramérica se producen cinco formas moleculares (AAAA, AAAa, AAaa, Aaaa, y aaaa) en una proporción 1:4:6:4:1.

Debido a que estas combinaciones ocurren al azar, ellas y sus proporciones se pueden representar por el teorema del binomio $(A + a)^n$ en donde A y a representan los productos alélicos y n el número de subunidades que conforman la enzima activa.

En ciertos casos, el producto de uno o ambos alelos de un locus determinado produce polipéptidos sin actividad catalítica, cuyo fenotipo se caracteriza por la ausencia de bandas en el gel después de su tinción. Este tipo de alelos se denomina 'alelos nulos'. La Figura 36.2 muestra los posibles patrones de bandas de una enzima dimérica procedente tanto de dos padres homocigotos —uno de ellos con alelos nulos que producen polipéptidos sin actividad enzimática— como también del híbrido producto de su cruce.

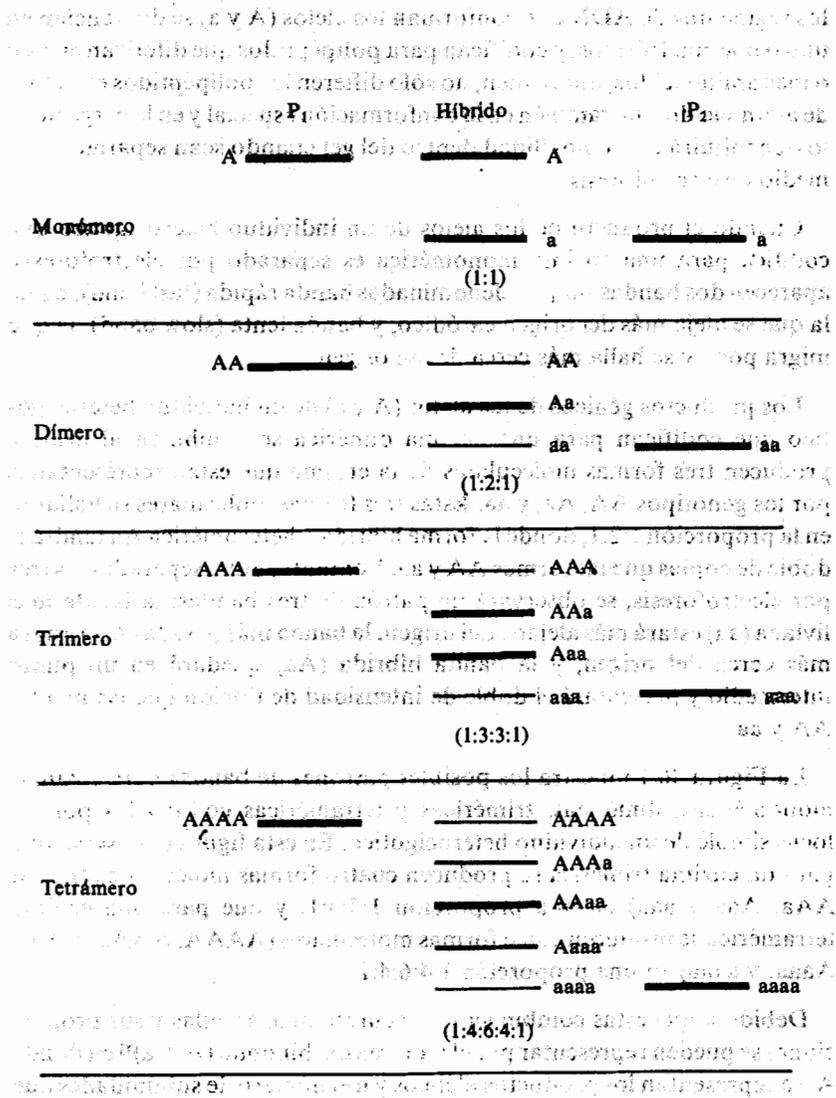


Figura 36.1. Patrón de bandas de un locus con dos alelos (A y a) que codifican para enzimas monoméricas, dimeras, triméricas y tetraméricas. Las proporciones entre paréntesis indican la relación de intensidad de las bandas.

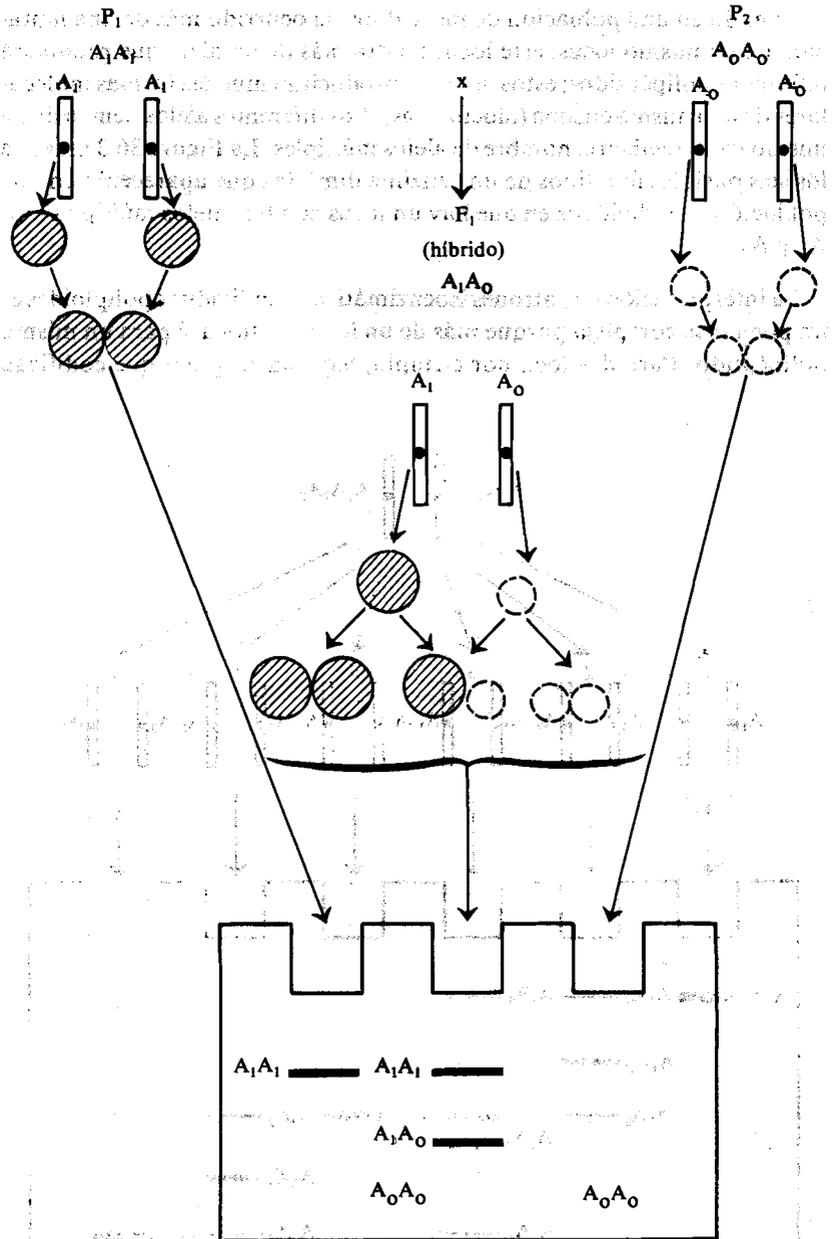


Figura 36.2. Patrón de bandas de un locus con dos alelos que codifican para una enzima dimérica, de dos padres (uno de ellos con alelos nulos), y de un híbrido producto del cruzamiento de éstos.

Cuando en una población de individuos ha ocurrido más de una mutación en un mismo locus, este locus tendrá más de un alelo que producirá diferentes polipéptidos; éstos, a su vez producirán muchas formas moleculares de una misma enzima (aloenzimas). Los diferentes alelos dentro de un mismo locus reciben el nombre de alelos múltiples. La Figura 36.3 muestra los seis posibles fenotipos de una enzima dimérica que aparecerán en una población de individuos en que hay un locus con tres alelos múltiples (A_1 , A_2 y A_3).

La interpretación de patrones isoenzimático en individuos poliploides es un poco más compleja porque más de un locus codificará para un mismo polipéptido. Para dos loci, por ejemplo, hay cuatro genes que codifican

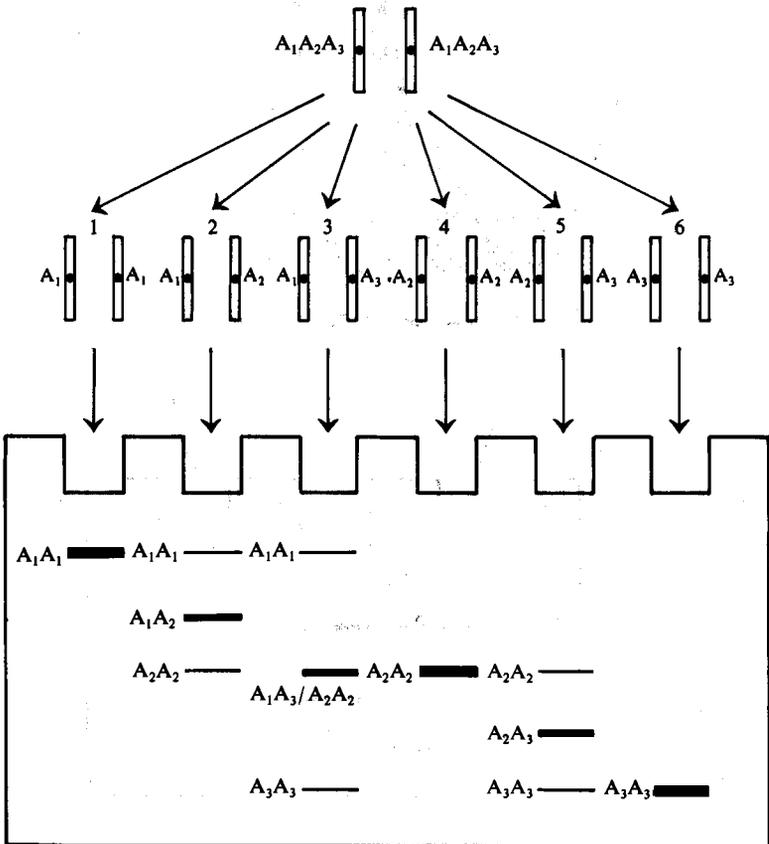


Figura 36.3. Patrón de bandas para una enzima dimérica codificada por tres alelos múltiples en un locus simple.

para el mismo polipéptido, y para tres loci, seis genes codifican para el mismo polipéptido. Este hecho puede causar complicaciones en la interpretación de los patrones de bandas después de la electroforesis. Las Figuras 36.4 y 36.5 muestran ejemplos de estos casos; en la primera, posibles patrones de bandas de dos loci comparten los alelos A y a (ambos segregantes) que darán enzimas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica; en la segunda aparecen los posibles patrones de bandas de una enzima dimérica codificada por dos loci: uno de ellos tiene fijo el alelo A, mientras que en el otro ambos alelos segregan.

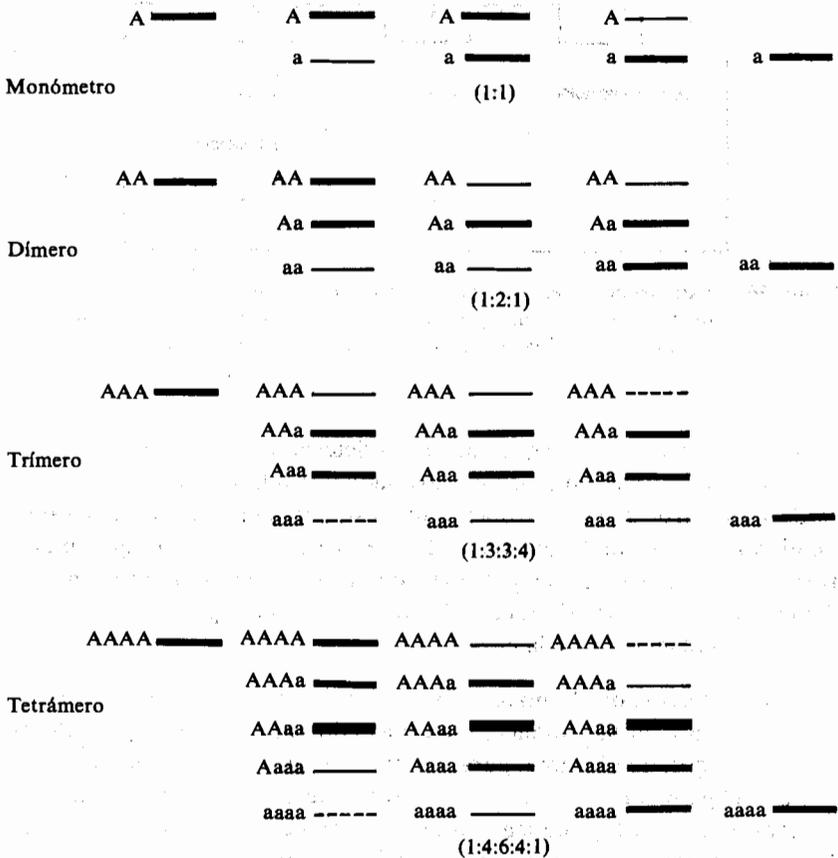


Figura 36.4. Patrones de bandas de dos loci que comparten los alelos A y a; ambos alelos están segregando, y codifican para enzimas monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica.

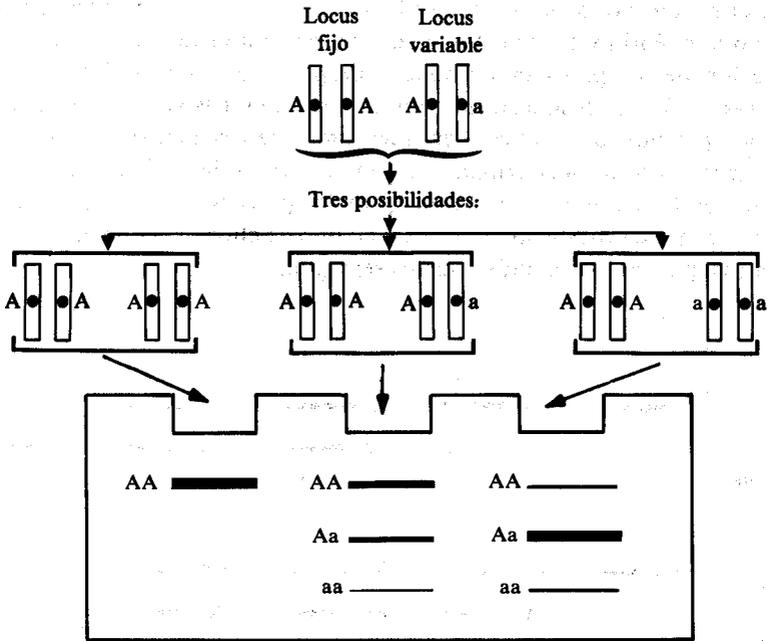


Figura 36.5. Patrones de una enzima dimérica codificada por dos loci; en uno de ellos está fijado el alelo A, mientras que en el otro ambos alelos segregan. Las proporciones y cifras entre paréntesis indican la intensidad de las bandas.

Aunque la metodología general para la detección de patrones electroforéticos de isoenzimas está bien desarrollada y es relativamente sencilla, la interpretación de dichos patrones requiere de conocimientos básicos tanto de bioquímica como de genética y de la especie o cultivo con que se está trabajando; en efecto, esos patrones, como se mencionó anteriormente, dependen del número de loci, del número de alelos por locus, y de la estructura cuaternaria de la enzima.

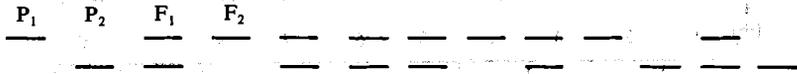
La caracterización de materiales dentro de una colección de germoplasma se basa en la presencia o ausencia de bandas de los marcadores isoenzimáticos; no obstante, para estudiar la segregación de un marcador —o de su ligamiento— que tenga características de interés agronómico, es necesario conocer la genética y la bioquímica de dichos marcadores. La Figura 36.6 muestra algunas interpretaciones genéticas de las variaciones electroforéticas de patrones isoenzimáticos, y la Figura 36.7 presenta un ejemplo hipotético que ilustra la utilidad de las isoenzimas para discriminar materiales dentro de una colección.

El fundamento genético del comportamiento de las isoenzimas da una visión más clara de la aplicabilidad de esta metodología, no sólo como herramienta para caracterizar y evaluar materiales —complementando así las evaluaciones morfológicas y agronómicas— sino también en estudios bioquímicos, fisiológicos, genéticos y evolutivos.

1. Fijación nuclear o citoplasmática (o ambas)



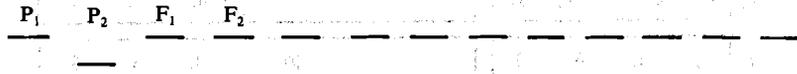
2. Locus dimórfico; enzima monomérica



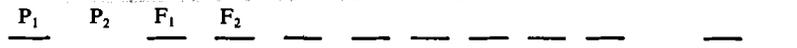
3. Igual al anterior, con productos de desintegración catabólica (breakdown)



4. Herencia citoplasmática



5. Locus dimórfico con alelos nulos



6. Locus dimórfico; enzima dimérica

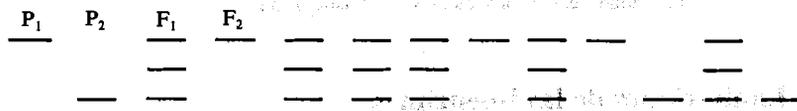


Figura 36.6. Interpretaciones genéticas de variaciones electroforéticas.

FUENTE: Tanksley y Orton, 1983.

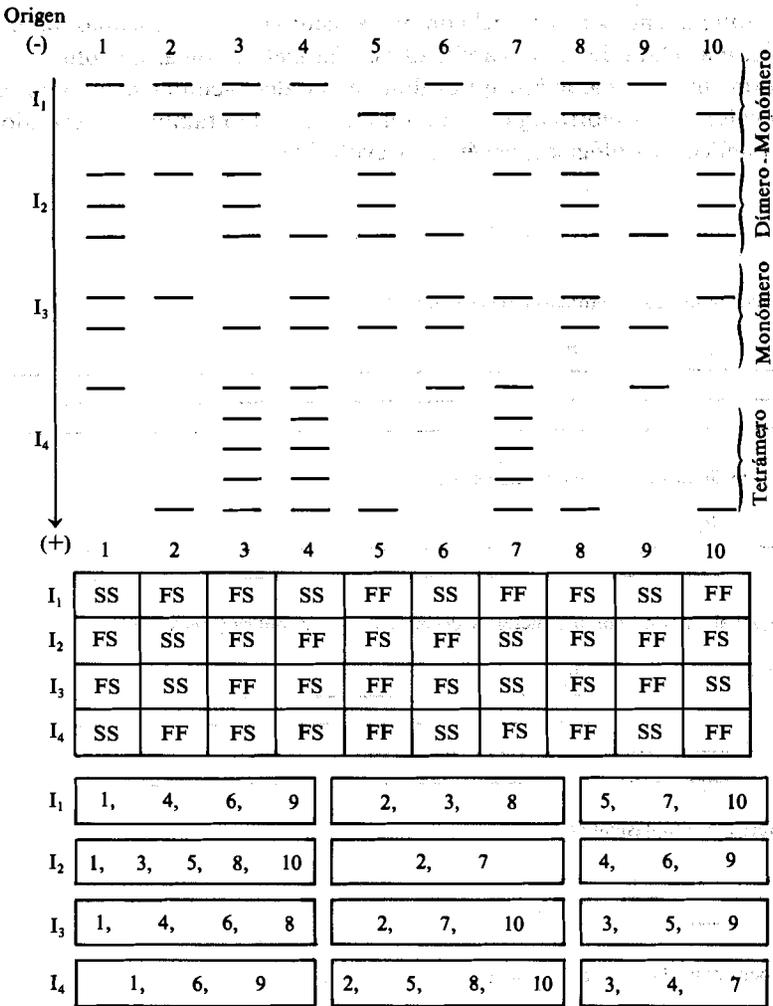


Figura 36.7. Ejemplo hipotético que ilustra la discriminación de 10 materiales cuando se utilizan cuatro marcadores isoenzimáticos. Para simplificar, no se indica la intensidad real de las bandas. I = isoenzima.

Limitaciones de las isoenzimas

Las isoenzimas, no obstante sus aplicaciones biológicas, tienen limitaciones cuando se evalúan materiales muy cercanos genéticamente. Las principales causas de estas limitaciones son: