

## Validación de marcadores moleculares ligados a grosor de cuesco

Carmenza Montoya Jaramillo<sup>1</sup>  
Pedro Jesús Rocha Salavarieta<sup>2</sup>



### Notas del Director de Biotecnología

Desde hace más de 65 años se ha reconocido la presencia de materiales Dura, Ténera y Pisífera. Experimentos preliminares de mejoramiento han sugerido que se trata de una característica monogénica con herencia mendeliana simple.

En los últimos 25 años, con la ayuda de la biología molecular y el desarrollo de técnicas de marcadores moleculares, se ha realizado investigación para determinar las bases moleculares de esta característica. En términos generales, la investigación ha incluido la generación de cruces entre materiales Dura x Ténera y la posterior evaluación de las progenies resultantes mediante diversas técnicas. Se han reportado marcadores asociados a la característica y se han obtenido mapas genéticos.

Sin embargo, tales marcadores no se comportan de "manera universal" y por esta razón el marcador identificado como asociado al grosor de cuesco en un cruce no se encuentra presente en otro (aún compartiendo uno de los parentales).

En consecuencia, hasta el momento no existe marcador molecular alguno para esta característica. Por tal razón, sería conveniente considerar otras estrategias de investigación, por ejemplo, aquellas relacionadas con el análisis de la expresión de genes, proteínas o metabolitos.

Pedro Jesús Rocha Salavarieta, Ph.D.  
Director de la División de Biotecnología  
Cenipalma

### Introducción

Uno de los intereses primordiales del sector palmicultor es incrementar el contenido de aceite y por ende la productividad. Un carácter asociado al contenido de aceite en fruto es el grosor de cuesco, el cual ha permitido establecer tres tipos de fruto de palma: Dura, Pisífera y Ténera (Corley & Tinker, 2003). El fruto tipo Dura posee un cuesco grueso, entre 2 y 8 mm de grosor, y un contenido de aceite en mesocarpo que está entre 35 y 55%. El tipo Pisífera no posee cuesco y las palmas derivadas de esta clase de semilla, por lo general, son infértiles y no producen racimos. El fruto tipo Ténera, resultado del cruce de una madre tipo Dura con polen de una palma tipo Pisífera, produce materiales con cuesco de tamaño entre 0,5 y 4 mm de grosor y entre 60% y 96% de aceite en mesocarpo (Bernal, 2001).

La herencia monofactorial que determina el tipo de fruto fue establecida por Beirnaert y Vanderweyen (1941) y se atribuye al gen mayor *Sh* (por *shell*), el cual determina los tres tipos de fruto según el grosor del cuesco. De acuerdo con la expresión de este gen, se tienen plantas tipo Dura, homocigotas dominantes (*Sh+/Sh+*); Ténera, heterocigotas (*Sh+/Sh-*) y Pisífera, homocigotas recesivas (*Sh-/Sh-*). Teniendo en cuenta lo anterior, el cruce entre Duras y Pisíferas arroja un 100% de materiales tipo Ténera. Un cruce Ténera x Pisífera arroja un 50% Téneras y 50% Pisíferas. Un cruce Ténera x Duras arroja 50% Téneras y 50% Duras y en el cruce Ténera x Ténera segregan los tres tipos de frutos (25% Dura, 50% Ténera y 25% Pisífera).

La metodología de selección asistida por marcadores moleculares se centra en identificar secuencias de ADN ligadas a características deseadas y de esta forma favorecer la selección temprana de materiales, lo cual es muy ventajoso en los procesos de mejoramiento genético (Mohan *et al.*, 1997). Para el presente caso, con un marcador molecular ligado a grosor de cuesco, el programa de fitomejoramiento de la División de Variedades podría identificar, in vivo, las palmas que se requieran dentro del proceso de investigación. El potencial de la selección asistida por marcadores moleculares en palma de aceite ha sido reportado en estudios previos (Rance *et al.*, 2001; Moretzsohn *et al.*, 2000; Billotte *et al.*, 2001; Rajinder *et al.*, 2001).

Específicamente sobre el carácter grosor de cuesco, Moretzsohn *et al.* (2000) reportaron dos marcadores tipo RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) ligados a esta característica. El RAPD R11-1282 con un amplicón (banda) de 1282 pb (pares de base) a una distancia de 17,5 cM del locus *Sh* y el RAPD T19-1046, con un amplicón de 1046 pb a una distancia 23,9 cM del locus *Sh*, en una población F<sub>1</sub> de un cruce entre Ténera y Pisífera. En la descendencia de este cruce, los RAPD amplificaron en materiales Ténera y estaban ausentes en materiales Pisífera.

En otro estudio, Billotte *et al.* (2001) identificaron un marcador tipo AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ligado al grosor de cuesco. La combinación E-AGG/M-CAA arrojó un amplicón de 132 pb a una distancia de 12,6 cM del locus *Sh* que se aprecia como marcador dominante en Duras, codominante en Téneras y ausente en Pisíferas.

Posteriormente, Billotte *et al.*, (2005) en un mapa de ligamiento del cruce entre un Ténera de la población La Mé (LM2T) y un Dura de la población Deli (DA10D) ubicaron el AFLP E-AGG/M-CAA132 a una distancia de 4,7 cM del locus *Sh*.

<sup>1</sup> Bióloga, M.Sc., Investigador Asistente.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Investigador Titular, Director División de Biotecnología. Cenipalma.

El presente Ceniavances reporta experimentos orientados a validar los estudios de marcadores moleculares ligados a grosor de cuesco de Moretzsohn et al. (2000) y Billotte et al. (2001), en un cruce de materiales Ténera x Ténera. Esta propuesta de investigación surge como una actividad de la División de Variedades con apoyo metodológico de la División de Biotecnología. Así, se muestra una vez más la importancia de la interacción de las dos Divisiones.

## Metodología

### Material a evaluar

Muestras de tejido foliar de 30 materiales provenientes de la F<sub>1</sub> de un cruce TxT de *E. guineensis* fueron macerados con nitrógeno líquido y conservados a -70°C hasta su uso. La F<sub>1</sub> del cruzamiento TxT segregó en un 25% Duras, un 50% Téneras y un 25% Pisíferas. De esta forma, la División de Variedades garantizó los tres tipos de frutos para realizar la identificación a nivel molecular.

### Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit *DNeasy® Plant Mini Kit* (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se visualizó en gel de agarosa al 0,7% teñido con bromuro de etidio y se cuantificó con el espectrofotómetro 6405UV/Vis (Jenway)

Para calcular la concentración de ADN se utilizó la siguiente ecuación:

$$[\text{ADN ng}/\mu\text{l}] = (\text{Abs } 260\text{nm})(\text{Factor dilución})(50 \text{ ng}/\mu\text{l})$$

Se utilizó un factor de dilución de 20, ya que se tomaron 3  $\mu\text{l}$  de ADN más 57  $\mu\text{l}$  de agua, así  $60/3=20$ .

### Amplificación de marcadores RAPD y AFLP

La reacción de amplificación de los RAPD R11 y T19 se llevó a cabo según Moretzsohn et al. (2000) en un volumen final de 13,0  $\mu\text{l}$ . La reacción incluyó  $\text{MgCl}_2$  2mM, dNTP 0,2 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 10%, cebador 0,4  $\mu\text{M}$  y 20ng de ADN por cada reacción. La amplificación se realizó con un programa de 2 min a 94°C, 45 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 36°C y 2 min a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C.

La amplificación del AFLP E-AGG/M-CAA se realizó con el *Kit / AFLP® Core Reagent Kit / AFLP® Analysis System* (Invitrogen) con el protocolo de amplificación de AFLP (según modificación de Laboratorio de Caracterización Molecular - LCM). Para la verificación del producto amplificado se realizó una electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 6% y 5M de urea durante dos horas a 100 vatios constantes. Posteriormente, se realizó la tinción con nitrato de plata conforme al protocolo de marcadores moleculares de Cenipalma (Rocha, 2008).

### Secuenciación de amplicones polimórficos ligados a grosor de cuesco

Una vez se observó la amplificación de polimorfismos de interés en el gel, se cortó la banda y se resuspendió en 20  $\mu\text{l}$  de TE. Para eluir la banda, se calentó la mezcla a 65°C durante 10 minutos. El ADN resultante se utilizó como molde para una segunda amplificación y obtener así mayor cantidad del producto específico. Posteriormente, se limpió el producto de PCR con el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) para proceder a la secuenciación.

Una vez se cortaron las bandas polimórficas, producto de AFLP del gel de poliacrilamida, se amplificaron y se conformaron mezclas de ADN según el tipo muestra, quedando así tres productos para secuenciar correspondientes a Dura, Ténera y Pisífera. El servicio de secuenciación fue contratado a la empresa BioMol (Bogotá).

Para la lectura y corrección manual de las secuencias se utilizó el programa de libre distribución *ChromasLITE V2.01* ([www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)). Las secuencias de ADN obtenidas se alinearon con el programa BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para determinar el porcentaje de identidad entre éstas.

### Diseño de cebadores específicos y amplificación de SCAR

Con la secuencia obtenida del amplificado de aproximadamente 200 pb, presente en materiales Ténera, se diseñaron cebadores específicos con

el programa *Primer3* (v. 0.4.0) (<http://primer3.sourceforge.net/>). Se sintetizaron cinco cebadores tipo SCAR (*Sequence characterized amplified región*) con la empresa Invitrogen. Una vez se obtuvieron los cebadores se procedió a la estandarización de la amplificación en materiales del cruce TxT. Para la reacción de PCR se utilizó una muestra de ADN de tipo Dura, Ténera y Pisífera. En el primer ensayo se realizó una curva de concentraciones finales de  $\text{MgCl}_2$  a 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 mM para determinar la influencia de este reactivo en las amplificaciones. En el programa de amplificación se ensayaron varias temperaturas de alineamiento: 66,4°C; 62°C; 55,5°C y 52°C. Se realizaron ensayos con reactivos de las casas comerciales Invitrogen, Fermentas y Promega.

### Similitud genética en la progenie F<sub>1</sub> cruce TxT

Los resultados obtenidos se utilizaron para generar un patrón de similaridad genética y a través de un análisis de agrupamiento determinar si los diferentes tipos de frutos exhibían agrupamiento. Con la información obtenida a partir de los marcadores dominantes RAPD y AFLP se generó una matriz de ausencia (0) y presencia (1). La matriz binaria de datos fue convertida en una matriz de similitud de acuerdo con Nei y Li (1979). El dendrograma se construyó a partir de la matriz de similitud, con el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic Average*) utilizando el software NTSYS pc 2.11.

## Resultados

### Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de buena calidad según la evaluación en gel de agarosa. Los resultados de la cuantificación mediante espectrofotometría despliegan un rango de ADN obtenido entre 1,7 y 13,1  $\mu\text{g}$ . La relación *Abs260nm/Abs280nm* tiende a estar por debajo de 1,8 lo cual indica presencia de proteínas en el ADN extraído.

### Amplificación de marcadores RAPDs

Siguiendo el protocolo reportado por Moretzsohn et al. (2000) se realizaron ensayos para la amplificación del RAPD T19 (Tabla 1), para el cual no se obtuvo amplificación. Al parecer la secuencia de este cebador no encuentra homología en el ADN del cruce TxT y por tal razón no amplifica. De igual forma, se realizaron ensayos para la amplificación del RAPD R11 (Tabla 2). El trabajo de Moretzsohn et al. (2000) reporta una banda de 1282 pb para el RAPD R11 presente en materiales Ténera y ausentes en materiales Pisífera. Según los resultados observados, en el cruce TxT, generado por la División de Variedades de Cenipalma, no se encuentran estos marcadores moleculares (figuras 1 y 2).

### Amplificación del AFLP E-AGG/M-CAA e identificación de polimorfismos

No se observaron las diferencias reportadas por Billotte et al. (2001) entre materiales Dura o Pisífera en el rango de 130–140 pb. Sin embargo, se encontraron polimorfismos que marcaron diferencias entre los materiales de estudio, ubicados en el rango de 140–150 pb y aproximadamente 200 pb.

La banda de ADN polimórfica, detectada entre los 140–150 pb, se encontró en cinco de diez plantas Dura, dos de diez plantas Ténera y tres de diez plantas Pisífera. La banda de ADN polimórfica de 200 pb se encontró solamente en tres plantas Ténera (Figura 3).

### Secuenciación de amplicados AFLP polimórficos

Los resultados de alineación muestran que entre los amplicones específicos de Dura y Ténera hay una identidad del 93%, entre Dura y Pisífera del 87% y entre Pisífera y Ténera del 94%. Con estos porcentajes de identidad se concluye que las bandas de ADN polimórficas, observadas en el rango de los 140–150 pb, no ofrecen suficientes diferencias internas que permitan diseñar un cebador específico que logre distinguir entre tipos de fruto a nivel molecular.

### Diseño de cebadores específicos y amplificación de SCAR

Con el programa *Primer3* se obtuvieron las secuencias de los cebadores tipo SCAR (Tabla 3). La amplificación de los cinco SCAR fue monomórfica con un amplificado entre 100 y 200 pb para el ADN de los tres tipos de fruto, a pesar de los cambios en concentraciones de  $\text{MgCl}_2$ , temperaturas de

alineamiento y diferentes marcas de reactivos. En particular, el SCAR T1 se evaluó en los 30 materiales del cruce y fue monomórfico (Figura 4). Según se observa en estos resultados, los SCAR diseñados a partir de la banda polimórfica del AFLP E-AGG/M-CAA, que sólo amplificó en materiales Ténera, no están ligados al grosor de cuesco y por lo tanto no marcan diferencias entre los tipos de frutos. La banda polimórfica observada en materiales Ténera con el AFLP E-AGG/M-CAA, pudiera estar presente en todos los tipos de fruto y no se observó por el bajo número de muestras analizadas. Es de mencionar que del cruce TxT tan sólo se analizaron 10 muestras de cada tipo de fruto y esto pudo haber sesgado los resultados.

**Similitud genética en la progenie F<sub>1</sub> cruce TxT**

En la lectura de las bandas amplificadas con el RAPD R11 se obtuvieron siete bandas con pesos entre los 600 y 3000 pb. Para el AFLP E-AGG/M-CAA se contabilizaron 51 bandas con pesos entre 92 y 280 pb. Con la matriz de presencia/ausencia y un total de 58 bandas analizadas se generó la matriz de similitud (Nei y Li, 1979) y finalmente un dendrograma (Figura 5).

**Consideraciones finales**

En este trabajo de validación no se obtuvieron los resultados reportados por otros autores. Esto podría deberse a que los marcadores moleculares pueden “cambiar” o no amplificar una vez se ensayan en otros cruces (Mohan, 1997). Además, es probable que las distancias genéticas de las bandas reportadas por Moretzsohn y Billotte sean diferentes en los materiales probados en el presente ensayo. Otro punto determinante sería que los marcadores RAPD reportados por Moretzsohn et al. (2000) se encuentran bastante distanciados del locus *Sh* (17,5 cM y 23,9 cM), lo cual facilita la segregación independiente entre el marcador y el locus *Sh*. De igual forma, sucede con el marcador AFLP reportado por Billotte et al. (2001), el cual se detectó a una distancia de 12,6 cM del locus *Sh*. Así, queda claro que, hasta el momento, no existe un marcador molecular que permita hacer la distinción entre materiales Dura, Ténera y Pisífera provenientes de distintos cruces.

En el análisis de similitud genética de la F<sub>1</sub> del cruce TxT (Figura 5) se evidencia que los materiales son similares entre sí y que la información suministrada por estos marcadores (RAPD y AFLP) no permite diferenciarlos según el tipo de fruto.

A futuro, se podría realizar una búsqueda de marcadores ligados a grosor de cuesco, empleando cruces con más individuos contrastantes y un número mayor de marcadores moleculares. Otra alternativa es definir una nueva estrategia, posiblemente relacionada con la genética de expresión de la característica.

**Agradecimientos**

Los autores expresan sus agradecimientos a los investigadores Iván Ayala, Diana Arias y Leonardo Rey por su valiosa colaboración al facilitar el acceso al material de estudio y así cumplir con el propósito de este proyecto generado desde la División de Variedades. La investigación de Cenipalma es apoyada por el Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero (FFP).

**Bibliografía**

Beirnaert, A; Vanderweyden, R. 1941. Contribution à l'étude génétique et biométrique des variétés d' *Elaeis guineensis* Jacq. Publications de l'Institut national pour l'étude agronomique du Congo Belge, série scientifique, 27.

Bernal, NF. 2001. El cultivo de la palma de aceite y su beneficio. Fedepalma.

Billotte, N; Frances, L; Amblard, P; Durand-Gasselien, T; Noyer, JL; Courtois, B. 2001. Search for AFLP and microsatellite molecular markers of the *Sh* gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by bulk segregant analysis (BSA) and genetic mapping. Proceedings of the 2001 PIPOC International Palm Oil Congress, Kuala Lumpur, Malaysia, pp 442-445.

Billotte, N; Marseillac, N; Risterucci, AM; Adon, B; Brottier, P; Baurens, FC; Singh, R; Herrán, A; Asmady, H; Billot, C; Amblard, P; Durand-Gasselien, T; Courtois, B; Asmono, D; Cheah, SC; Rohde, W; Ritter, E; Charrier, A. 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theoretical and Applied Genetics 110(4):754-765.

Corley, RHV; Tinker, PB. 2003. The oil palm. Fourth edition. Blackwell Science Ltd. Berlin. Germany.

Mohan, M; Nair, S; Bhagwat, A; Krishna, TG; Yano, M; Bhatia, CR; Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding 3: 87-103.

Moretzsohn, MC; Nunes, CDM; Ferreira, ME; Grattapaglia, D. 2000. RAPD linkage mapping of the shell thickness locus in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Theoretical and Applied Genetics 100: 63-70.

Nei, M; Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science 76: 5269-5273.

Rajinder, S; Cheah, SC; Madon, M; Ooi, LCL; Rahimah, AR. 2001. Genomic strategies for enhancing the value of the oil palm. Proceedings of the 2001 PIPOC International Palm Oil Congress, Kuala Lumpur, Malaysia, pp 3-17.

Rance, KA; Mayes, S; Price, Z; Jack, PL; Corley, RHV. 2001. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). Theoretical and Applied Genetics 103: 1302-1310.

Rocha, P. 2008. Manual del laboratorio de caracterización molecular. Cenipalma.

**Tabla 1.** Condiciones y resultados de PCR para la amplificación del RAPD T19.

Reactivos y condiciones finales de la PCR							
Tampón	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	Cebador	BSA	ADN	Vol. Final	Resultado
* 1X	2mM	0,2mM	0,4µM	10µg	Aprox. 20ng	13 µl	No se observó amplificación
1X	3mM	0,4mM	1,0µM	10µg	Aprox. 20ng	13 µl	No se observó amplificación
1X	2mM	0,4mM	0,4µM	NO BSA	Aprox. 50ng	13 µl	Dos muestras amplificaron
1X	3mM	0,2mM	0,4µM	NO BSA	Aprox. 20ng	13 µl	No se observó amplificación
Green Master mix Promega	Green Master mix Promega	Green Master mix Promega	0,4µM	NO BSA	Aprox. 20ng	25 µl	No se observó amplificación

\* La primera fila corresponde a las condiciones de Moretzsohn et al., (2000) y las siguientes son las variantes que se realizaron para lograr la amplificación.

**Tabla 2.** Condiciones y resultados de PCR para la amplificación del RAPD R11.

Reactivos y condiciones finales de la PCR							
Tampón	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	Cebador	BSA	ADN	Vol. Final	Resultado
* 1X	2mM	0,2mM	0,4µM	10µg	Aprox. 20ng	13 µl	Se observó amplificación
1X	2mM	0,2mM	0,4µM	NO BSA	Aprox. 20ng	13 µl	Se observó amplificación
Green Master mix Promega	Green Master mix Promega	Green Master mix Promega	0,4µM	NO BSA	Aprox. 20ng	25 µl	Se observó amplificación

\* La primera fila corresponde a las condiciones de Moretzsohn et al., (2000) y las siguientes son los ensayos simultáneos que se realizaron para lograr la amplificación.

