

Estandarización de la técnica de SSCP en palma de aceite

Pedro Jesús Rocha Salavarieta¹, Dennys Marcela Gómez²



Notas del Director de Biotecnología

Una de las principales estrategias de la investigación en mejoramiento de palma de aceite de Cenipalma es la introducción de nuevas metodologías que apoyen al programa de mejoramiento, en particular la fase de selección.

Desde hace varios años, el Laboratorio de Caracterización Molecular (LCM) y, recientemente, la División de Biotecnología han introducido herramientas moleculares que permiten, entre otros aspectos, realizar caracterizaciones de diversidad y generar información de utilidad para la definición de cruces de materiales.

Aunque la estrategia ha sido parcialmente exitosa, es necesario introducir otras técnicas que incrementen la sensibilidad de algunos análisis y, de esta manera, apoyar al programa de fitomejoramiento.

En el presente artículo se reportan los detalles de la estandarización de la técnica conocida como Análisis de polimorfismos en la conformación del ADN de hebra sencilla (SSCP, por su sigla en inglés) en palma de aceite.

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

Introducción

El cultivo de la palma de aceite, *Elaeis guineensis* Jacq., se encuentra adaptado y consolidado en Asia, específicamente en Malasia e Indonesia, mientras que en América Latina, en particular en Colombia, el cultivo de esta especie se encuentra en plena expansión. Sin embargo, las diferentes condiciones medioambientales de cada una de las zonas palmeras colombianas y la presencia de problemas asociados con plagas y enfermedades hacen que el desarrollo del cultivo tenga que basarse en la generación de nuevos materiales (Rocha et al. 2007).

Las características genéticas, la distribución heterogénea de las regiones en donde se siembra la palma y los diferentes manejos agronómicos realizados al cultivo, pueden ocasionar variaciones en el rendimiento de un mismo material genético. Por tanto, es necesario generar materiales adaptados a las diversas condiciones en las regiones palmeras colombianas (Rey et al., 2004; Rocha et al. 2006). Para ello, es fundamental realizar una caracterización minuciosa del material genético disponible, que incluya los ámbitos morfoagronómico, bioquímico y molecular, con el objeto de conocer caracteres de interés que puedan ser aprovechados mediante la generación de variedades mejoradas.

Siguiendo esta estrategia, Cenipalma inició prospecciones y colectas de material genético de *E. guineensis* (Rey et al. 2004), con el fin de mantener buena parte de la variabilidad genética, para ser utilizada en el programa de fitomejoramiento. Adicionalmente, fortaleció la investigación en marcadores moleculares (Rocha, 2003) e introdujo nuevas metodologías (Rocha, 2008). Toda la estrategia enfocada, en últimas, a mejorar la competitividad del sector palmicultor colombiano.

Estudios previos se han enfocado en determinar la variabilidad genética de algunos de los materiales comerciales disponibles actualmente en Colombia mediante el empleo de marcadores moleculares tipo microsatélite (SSR; Rocha, 2003). En el 2006, 40 materiales comerciales fueron evaluados, mediante SSR, con diez combinaciones de cebadores, encontrándose una alta similitud entre materiales provenientes de las diferentes casas comerciales, de tal manera que no se observó una clara diferenciación entre los individuos analizados (Rocha y Suárez, 2006). Por esta razón, fue necesario explorar y adaptar otras metodologías utilizadas en estudios de diversidad genética que permitieran caracterizar este tipo de materiales, que si bien son distribuidos por diferentes casas comerciales, debieran presentar regiones muy conservadas dentro de sus genomas como producto del mejoramiento recurrente realizado con ejemplares que presentan la misma base genética.

¹ Biólogo, Ph.D., Investigador Titular, Director División de Biotecnología, Cenipalma.

² Bióloga, Investigadora Auxiliar, División de Biotecnología, Cenipalma.

Revisión de la técnica

El ADN está constituido por una doble hélice (*double strand DNA*, dsDNA) que puede ser desnaturada mediante métodos físicos o químicos en dos cadenas (hebras) individuales (conocidas como *single strand DNA*, ssDNA). La doble hélice en conjunto y sus cadenas individualizadas tienen comportamientos fisicoquímicos distintos. En consecuencia, es posible generar metodologías que permitan detectar tales diferencias y comparar individuos con base en las mismas.

La técnica de SSCP (traducida como análisis de polimorfismos en la conformación del ADN de hebra sencilla) permite identificar rápidamente fragmentos de ADN del mismo tamaño, pero con variaciones en su secuencia, mediante la separación de la doble cadena del ADN en un gel no desnaturante. La migración de la molécula de ADN de cadena sencilla en el gel está determinada por su estructura secundaria y su peso molecular (Lopes *et al.* 2001). Así, es posible detectar variaciones tan pequeñas como una mutación puntual en amplicones (bandas) obtenidos de una variedad de secuencias de origen genómico ó de ADN complementario (ADNc) (Hayashi, 1991).

SSCP ofrece una alternativa viable para la caracterización de la variabilidad genética, al permitir la detección de mutaciones puntuales dentro de la molécula de ADN. Las mutaciones, ocasionadas por la alteración en la secuencia de nucleótidos, generan el reacomodamiento de la estructura secundaria del ADN. Las diferencias en dicha estructura se pueden medir mediante la detección de cambios en la migración electroforética a través del gel o la matriz de separación (Sambrook y Russell, 2001).

Diferentes investigadores han utilizado la técnica de SSCP para la detección de polimorfismos. Lopes *et al.* (2001) afirman que con la técnica de SSCP, que emplea la matriz MDE® (*mutation detection enhancement*), se pueden detectar fácilmente diferencias en las secuencias de un par de alelos, lo que permite considerarla como una herramienta potencial para la identificación de polimorfismos de nucleótidos individuales (conocidos como SNP, por sus siglas en inglés). Según Bertin *et al.* (2005), SSCP-SNP es un sistema de marcadores co-dominantes basados en la detección de polimorfismos en un gel, presenta el mismo potencial múltiple que los marcadores SSR y es aplicable a todos los organismos. De igual manera, Bertin *et al.* (2005) mencionaron que la técnica de SSCP permite la identificación de SNP de acuerdo con la movilidad del ADN desnaturado en el gel, donde la separación de las bandas se da en función al tamaño (pb) y conformación de la molécula. Mediante SSCP es posible identificar el tipo de polimorfismo una vez establecidos los patrones de migración diferencial, donde los fragmentos críticos se pueden secuenciar para detectar la posición y el número de polimorfismos en la secuencia. De esta manera, se puede evitar la secuenciación redundante y se puede estimar la frecuencia de SNP dentro de una secuencia de ADN específica (Lopes *et al.*, 2001).

Algunos autores han seleccionado esta metodología para la detección de mutaciones puntuales. Anderson *et al.* (2006), mediante el análisis de SSCP, estudiaron fragmentos de los genes *flaB*, *ospA*, and *ospC* de *B. burgdorferi* para evaluar la presencia de inserciones y deleciones. En su análisis, agruparon las muestras de acuerdo con la similitud presentada en el patrón de bandeo, donde cada patrón único designó un tipo de SSCP. Para identificar y confirmar los polimorfismos asociados con cada tipo de SSCP, aislaron y secuenciaron en ambas direcciones al menos dos hebras representativas de cada variante, encontrando correspondencia en los resultados obtenidos por secuenciación.

Diversos estudios han generado marcadores moleculares a partir de EST (*Expressed Sequence Tags*) para análisis de diversidad, como el caso de Mariac *et al.* (2006), quienes analizaron 25 marcadores microsatélites generados a partir de EST disponibles en la base de datos del *GenBank*, con el propósito de estudiar la diversidad genética de 46 accesiones silvestres y 421 cultivadas de *Pennisetum glaucum* [L.] R.Br. procedentes

silvestres y 421 cultivadas de *Pennisetum glaucum* [L.] R.Br. procedentes de Nigeria. Así mismo, Bertin *et al.* (2005) desarrollaron un sistema de marcadores llamado SSCP-SNP utilizando secuencias genómicas de arroz para, inicialmente, predecir los límites de intrón-exón en EST y diseñar cebadores para amplificar regiones específicas del genoma de *P. glaucum*.

Por lo anterior, se consideró pertinente implementar la técnica de SSCP como apoyo al Programa de Fitomejoramiento de Cenipalma. Así, en este Ceniavances se presentan los detalles metodológicos de la optimización de la metodología de SSCP con la que se caracterizaron parcialmente 40 materiales comerciales de *E. guineensis*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se colectaron dos folíolos de 36 palmas *Elaeis guineensis*, correspondientes a 13 casas comerciales, así como 13 materiales *Elaeis oleifera* y 4 híbridos interespecíficos OxG, utilizados como control. En total, 53 individuos fueron analizados. Cada material colectado fue empacado en bolsas de papel previamente rotuladas y transportado desde el Campo Experimental Palmar de La Vizcaína (Barrancabermeja) hasta el Laboratorio de Caracterización Molecular (LCM, Bogotá). Los folíolos se conservaron en el ultracongelador (-70°C) hasta su procesamiento. Cada material se identificó con un código de acuerdo con el consecutivo de la base de datos del LCM.

Para la obtención del ADN y la amplificación de fragmentos específicos (grupos de EST), se procedió a la pulverización del material vegetal con nitrógeno líquido (-196°C) y la posterior extracción de ADN de acuerdo con el protocolo reportado por Arias y Rocha (2004). Adicionalmente, se utilizó el kit "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen).

Detección de polimorfismos mediante SSCP

Se diseñaron cinco pares de cebadores (Tabla 1) con base en secuencias específicas de EST, seleccionados del artículo publicado por Ho *et al.* (2007) que señala la obtención de 14.537 EST a partir de seis librerías de ADNc construidas de múltiples tejidos de palma de aceite. Cada cebador se diseñó con el programa *Primer3Plus* (Untergasser *et al.*, 2007) y se rotuló de acuerdo con el código de la secuencia utilizada.

El ADN se cuantificó por comparación visual de las muestras con patrones de concentración conocida (ADN del bacteriófago lambda a 50 y 100 ng), en geles de agarosa al 0,7% teñidos con bromuro de etidio. Las muestras fueron diluidas a razón de 20ng/μl para homogeneizar las concentraciones y realizar la amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su sigla en inglés). La PCR se realizó en un volumen de 15 μl, con 50 ng de ADN genómico, 0,2 μM de cada cebador, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl; 1,5 a 2,0 mM de MgCl₂, 20 mM de dNTP y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen). Las reacciones se efectuaron en el termociclador *My Cycler* (Biorad) siguiendo el siguiente programa; desnaturación inicial: 94°C durante 1 min 30 s; seguido por 35 ciclos de 94°C durante 30 s; 60°C (variable) durante 40 s; 72°C durante 2 min; y una extensión final a 72°C durante 5 min. Las condiciones para cada par de cebadores fueron estandarizadas (modificando temperatura de alineamiento, número de ciclos de repetición, concentración de MgCl₂ y de *Taq* polimerasa) hasta obtener un producto de amplificación (banda) único.

Para detectar la presencia de SNP mediante la técnica de SSCP, se evaluaron 36 materiales comerciales de *E. guineensis* (MG1015-MG1054), 4 híbridos OxG (MG1019, MG1020, MG1033 y MG1034) y 13 muestras de *E. oleifera* (MG1002-MG1014) utilizadas como control. Para ello, se amplificó cada muestra con los cebadores diseñados y se verificó la calidad del producto de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

A los productos de PCR que presentaron bandas únicas en el gel de agarosa, se les adicionó 10 μl de solución de carga (10% formamida, 0,4% azul bromofenol y 0,25% w/v xylene cyanol). La mezcla se desnaturó a 94°C durante 5 min, antes de cargarla en los pozos del

gel. Se sembraron 5 µl de cada muestra desnaturalizada en geles MDE® no desnaturalizantes y se realizó la electroforesis (TBE 0,6X), en cámaras para electroforesis vertical Sequi-Gen® GT (Biorad), durante 8-10 horas a 8W de voltaje. El proceso de tinción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de tinción con plata del LCM, y se realizó la lectura de los geles en el transiluminador.

Resultados y Discusión

Para evaluar la presencia de polimorfismos en los 40 materiales comerciales de *E. guineensis* por la técnica de SSCP fue necesario estandarizar cada uno de los cinco cebadores diseñados para este propósito (C962, C1185, C1214, C1595 y C2050) (Tabla 2). Como resultado se obtuvo la amplificación de una banda específica de aproximadamente 600 pb para la mayoría de los cebadores (Figura 1), excepto para el C1214, el cual exhibió dos bandas en el gel de agarosa al 2%, por este motivo, dicho cebador fue excluido de las pruebas.

Los productos de amplificación obtenidos con los cuatro cebadores específicos fueron observados posteriormente mediante electroforesis en MDE® no desnaturalizante, donde los patrones de migración de cada cebador, permitieron la detección de tres marcadores que revelaron polimorfismos (C962, C1595 y C2050) (Figura 2) y un marcador que resultó monomórfico para *E. guineensis* (C1185), este último permitió la identificación de cuatro bandas para cada híbrido interespecífico (OxG) (Figura 3), con lo cual se generó un marcador que permite la clara diferenciación de este tipo de materiales. Los controles utilizados para cada cebador, que incluyeron 13 materiales de *E. oleifera*, presentaron un mismo patrón de migración para todas las muestras, lo cual permitió realizar la comparación contrastante con los materiales de *E. guineensis* analizados. No obstante, se detectó la ausencia de producto amplificado con los cebadores C962 y C1595 para las muestras de *E. oleifera*, identificando la presencia de alelos nulos para esta especie con dos de los marcadores obtenidos.

La electroforesis en MDE® efectuada con el cebador C1595, reveló la presencia de cuatro bandas para cuatro individuos heterocigotos (Figura 2) correspondientes a los materiales MG1023, MG1024, MG1051 y MG1052.

La presencia de cuatro bandas para individuos heterocigotos (figuras 2 y 3) se explica teniendo en cuenta que cuando el ADN ha sido amplificado de un individuo heterocigoto, una parte de las hebras complementarias desnaturalizadas puede realinearse con otra antes que el ADN sea cargado en el gel. Una proporción de estas moléculas constituye entonces el *heteroduplex* formado por el alineamiento de hebras normales y mutantes (Sambrook y Russell, 2001).

Con base en la información reportada y a los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible destacar la practicidad de la técnica de SSCP y la mejor resolución de polimorfismos con respecto a otras metodologías. Esto permite la detección de pequeñas diferencias en el genoma de individuos estrechamente relacionados.

En conclusión, la técnica de SSCP permitió la clara diferenciación de individuos heterocigotos correspondientes a materiales híbridos OxG, generando el aporte de un nuevo marcador que puede ser utilizado en la caracterización de estos materiales.

Comentarios finales

La especificidad de la técnica de SSCP permite considerarla como una herramienta de importancia para el descubrimiento de SNP, convirtiéndola en una alternativa viable para la detección de la variación alélica, llegando a sustituir algunos métodos de costo elevado y de difícil manejo. Esta técnica puede ser utilizada para efectuar análisis de diversidad genética de las poblaciones y para encontrar divergencias genéticas entre individuos, pero requiere de la evaluación de un número representativo de marcadores (superior a 20) que puedan aportar mayor información para establecer relaciones de similitud o diferenciación entre individuos y hacer inferencia sobre la cercanía genética de los organismos evaluados. Así, esta técnica se puede utilizar en programas de mejoramiento como una alternativa a los microsatélites, debido a que no eleva los costos significativamente, pues requiere del mismo equipo y técnicas de laboratorio, donde la única diferencia radica en la matriz de MDE® requerida para SSCP, en lugar de los geles de poliacrilamida desnaturalizantes utilizados para encontrar microsatélites.

Para finalizar, la estandarización de la técnica de SSCP es una evidencia más de la estrategia de la División de Biotecnología de introducir nuevas metodologías de aplicación para diversos propósitos, en principio para apoyar la selección y evaluar la diversidad de materiales del programa de fitomejoramiento, aunque también pueden ser utilizadas en experimentos de fitopatología, fisiología, etc.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los miembros del Comité de Publicaciones de Cenipalma por la valiosa crítica de este manuscrito. Esta investigación ha sido financiada en su totalidad por Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero.

Tabla 1. Cebadores diseñados con el programa Primer3Plus con sus respectivas secuencias.

Cebadores para SSCP		
Nombre	Secuencia	Longitud (en bases)
C962F	GTGTTTCTCCCCTCTTC	20
C962R	CACTACCCCATTTCTCCA	20
C1185F	CCGAAGAACAAGGGGAAGG	19
C1185R	TCGTCACCAGAAACGCTGA	19
C1595F	GAGGAAAAGAGCACCACCAC	20
C1595R	ACCGCAGAGAACAGGGATAG	20
C1214F	AGGCTTTGCCGACTCTTC	19
C1214R	GGAGATGGGCTTGGTGTCT	19
C2050F	CCCAGGAAAAAGAGATGATG	20
C2050R	ACACGGAATACACCAAACC	20

Tabla 2. Condiciones de amplificación de los cebadores diseñados.

Nombre	[MgCl ₂]	[Taq]	[cebadores]	T° alineamiento	T° extension	# ciclos
C962	2mM	1,5 U	0,2µM	65 °C	72 °C	40
C1185	1,5mM	1 U	0,2µM	60 °C	72 °C	35
C1214	1,5mM	1,5 U	0,15µM	66 °C	72 °C	40
C1595	1,5mM	1 U	0,15µM	66 °C	72 °C	40
C2050	1,5mM	1 U	0,2µM	62 °C	72 °C	35

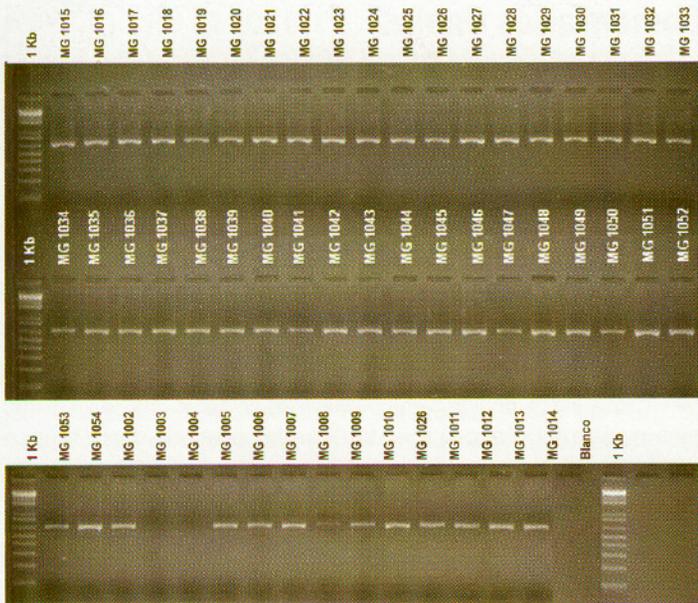


Figura 1. Fotografía de gel de agarosa al 2% mostrando los productos de amplificación obtenidos con el cebador C1185 para la totalidad de las muestras. El marcador de peso utilizado fue 1Kb (Invitrogen).

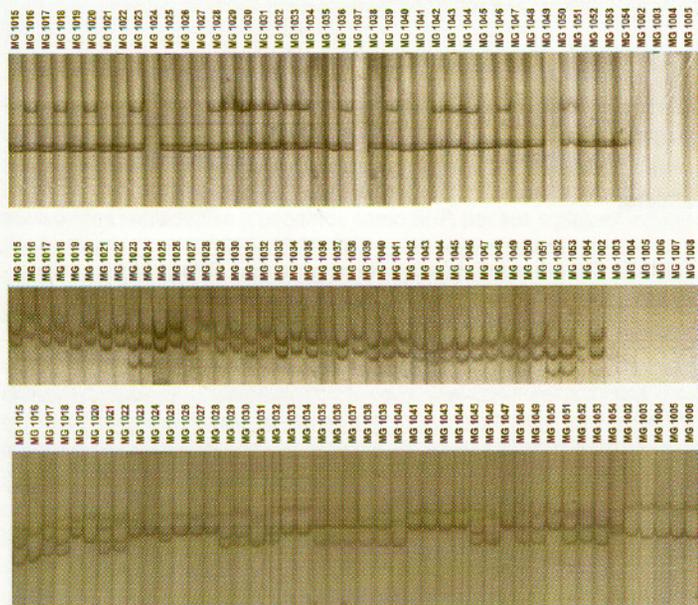


Figura 2. Imágenes obtenidas por electroforesis en gel de MDE® no desnaturante para los tres marcadores polimórficos. En su orden C962, C1595 y C2050.

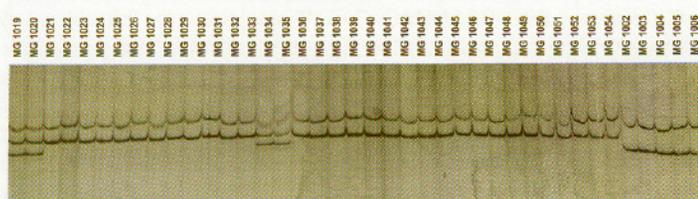


Figura 3. Imagen de gel de MDE® no desnaturante señalando algunas muestras amplificadas con el cebador C1185, las muestras con los códigos MG1019-MG1053 corresponden a materiales de *E. guineensis*. Las que presentan cuatro bandas (MG1019, MG1020, MG1033 y MG1034), corresponden a los híbridos interespecíficos (OxG), y las rotuladas como MG1002-MG1006 contienen materiales de *E. oleifera*.

Bibliografía

Anderson, J.; Norris, D. 2006. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in *Peromyscus leucopus*, the primary reservoir of Lyme disease in a region of endemicity in southern Maryland. Applied and environmental microbiology 72(8): 5331-5341.

Arias, D.; Rocha, P. 2004. Análisis de diversidad genética en materiales tolerantes y susceptibles a la pudrición de cogollo en palma de aceite mediante marcadores moleculares. Palmas 25(3): 11-27.

Bertin, I; Zhu, JH; Gale, MD. 2005. SSCP-SNP in pearl millet –a new marker system for comparative genetics. Theoretical and Applied Genetics 110(143): 1467-1472.

Billotte et al. 2001. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. Genome 44(3): 413-425.

Lopes et al. 2001. Detection of single nucleotide mutations in wheat using single strand conformation polymorphism gels. Plant molecular biology reporter 19: 159-162.

Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods and Applications 1:34-38.

Ho et al. 2007. Analysis and functional annotation of expressed sequence tags (ESTs) from multiple tissues of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). BMC Genomics 8: 381.

Mariac et al. 2006. Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) in Niger assessed by microsatellite markers. Theor. Appl. Genet (2006) 114: 49-58.

Rey et al. 2004. Colecciones genéticas de palma de aceite *Elaeis guineensis* (Jacq.) y *Elaeis oleifera* (H.B.K.) de Cenipalma: Características de importancia para el sector palmicultor. Palmas 25 (especial-II): 39-48.

Rocha, PJ. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección de palma de aceite. Palmas 24 (2): 11-25.

Rocha, PJ; Suárez, S. 2006. Caracterización molecular preliminar de materiales comerciales de palma de aceite presentes en Colombia. Ceniavances 141:1-4.

Rocha, PJ; Meléndez, E ; Rey, L. 2007. Ampliación del análisis de diversidad genética de palma de aceite proveniente de Angola. Respuestas. 12 (1): 20-28.

Rocha, PJ. 2008. División de Biotecnología de Cenipalma: Generadora de herramientas tecnológicas para el sector palmicultor colombiano. Ceniavances 157: 1-4.

Untergasser, A; Nijveen, H; Rao, X; Bisseling, T; Geurts, R; Leunissen, JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. Nucleic Acids Research 35: W71-W74; doi:10.1093/nar/gkm306 [cited in 2007]. Available in: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.



Director: José Ignacio Sanz Scovino, Ph.D.
 Revisión de textos: Comité de Publicaciones de Cenipalma
 Coordinación editorial: Donaldo Donado - Jefe de Publicaciones
 Diseño y diagramación: Carlos Sandoval
 Impresión: Molher Ltda. Impresores
 Esta publicación contó con el apoyo de Fedepalma - Fondo de Fomento Palmero