Caracterización molecular de materiales Dura

Molecular characterization of Dura materials

Victoria E. Villegas [1]; Carlos Duran [2]; Sthephen Beebe [3]

RESUME

Todo programa de mejoramiento genético tiene como objetivo principal aumentar la producción y mejorar la calidad, seleccionando genotipos sobresalientes que se adapten a nuevas zonas ecológicas, resistentes a condiciones adversas y que posean genes favorables según las necesidades del cultivo. Para lograr estas mejoras es esencial conocer la variabilidad genética de los materiales disponibles. Por tal razón y con el fin de planificar cruzamientos, se están utilizando marcadores moleculares tipo RAPD (Polimorfismo en el ADN Aleatoriamente Amplificado) y AFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) como una herramienta adicional al registro individual de producción y de medidas vegetativas de 126 palmas Dura de la plantación Promociones Agropecuarias Monterrey, seleccionadas por sus características fenotípicas sobresalientes en cuanto a componentes de rendimiento, tolerancia a plagas y porte bajo, comparadas con otras del mismo lote. La eficacia de estos marcadores consiste en que se relacionan con el genotipo de la planta y ofrecen nuevas posibilidades como una mejor caracterización de los materiales, la selección de una colección principal y la identificación de duplicados o materiales genéticamente muy parecidos. Para escoger los cebadores que generarán marcadores tipo RAPD se trabajó con dos materiales de cada lote y se evaluaron con 137 cebadores identificados como polimórficos en estudios anteriores. Finalmente se escogieron 12 cebadores que generaban las mejores bandas y se amplificaron con toda la población. Como resultado se obtuvo un dendograma, a partir de RAPD, en el cual se puede apreciar la distribución de los materiales con base en sus coeficientes de similaridad genética, esto para determinar cuáles son los más relacionados entre sí y después compararlos con sus datos agromorfológicos. El trabajo realizado con AFLP sólo cuenta con información parcial, de ahí que no se entreguen aún resultados concluyentes.

SUMMARY

The main objective of every genetic breeding program is to increase production and enhance quality. by selecting outstanding genotypes that will adapt to new ecological zones, resistant to adverse conditions and that possess favorable genes, according to the crop's necessities. In order to achieve these improvements, it is essential to know the genetic variability of the materials available. This is why, in order to plan crossings, RAPD (Randomly Amplified Polymorphism in the DNA) as well as AFLP (Polymorphism in the Longitude of the Amplified Fragments) type molecular markers are being used as an additional tool to the individual production registry and of vegetative measures of 126 Dura palms from the Promociones Agropecuarias Monterrey plantation, selected due to their phenotypic characteristics, outstanding as far as yield components, tolerance to pests and low transportation charges, compared to others from the same batch. The efficiency of these markers consists in that they relate with the plant's genotype and offer new possibilities such as a better characterization of the materials, the selection of a principal collection and the identification of duplicates or materials which are genetically very similar. In order to choose the baits that will generate RAPD type markers, work was carried out with two materials from each batch and they were evaluated with 137 baits, identified as polymorphics in previous studies. Finally, 12 baits were chosen which generated the best bands and they were amplified with the entire population. As a result, a dendogram was obtained, starting from RAPD, in which the distribution of the materials can be seen, based on their genetic similarity coefficients, in order to determine which ones are more related among each other and subsequently compare them with their agromorphological data. The work done with AFLP is only valid with partial information, that is why no conclusive results are given out yet.

Palabras claves: Diversidad genética, RAPD, AFLP, Elaeis guineensis, Palma de aceite.

1 Investigador. Cenipalma. Apartado Aéreo 252171. Bogotá, D.C., Colombia.
2 Ing. Agrónomo. - Promociones Agropecuarias Monterrey.
3 CIAT. Apartado Aéreo 6713 Cali, Colombia.

INTRODUCCIÓN

Para lograr que el mejoramiento genético de un cultivo sea exitoso, es necesario explotar la variabilidad genética existente dentro de la especie o especies intercruzables, que posean individuos con características deseables , a fin de obtener la mejor adaptación con los más altos rendimientos, de ahí que sea importante el conocimiento de esta variabilidad y la fuente de genes disponible para el cultivo que se desea mejorar.

Para detectar esta variabilidad se han desarrollado técnicas moleculares que permiten el acceso al genoma, caracterizando así individuos y poblaciones (Dean y Schmidt 1995). Estos marcadores moleculares pueden ser probados en cualquier tejido de la planta y en cualquier estado de desarrollo, lo que hace que sean ideales en cualquier programa de mejoramiento (Beckman y Soller 1986; Tansley et al. 1989).

La mayor ventaja de esta tecnología sobre las prácticas convencionales de mejoramiento genético es la reducción del tiempo requerido para desarrollar una variedad (Manzur y Tigey 1995). Su aplicabilidad es de particular interés en cultivos perennes, como la palma de aceite, cuya experimentación genética puede ser demorada y costosa (Cheah et al. 1999).

Los marcadores moleculares de mayor uso en la detección de variabilidad genética lo constituyen los RAPD, que es una técnica que permite el conocimiento de secuencias polimórficas utilizando cebadores sencillos con secuencias arbitrarias de oligonucleótidos. El resultado experimental es un conjunto de bandas que representan el comportamiento de la variabilidad, y que ofrecen información sobre las relaciones inter e intraespecíficas, las cuales pueden ser usadas para el mejoramiento individual de cada especie o para la obtención de híbridos exitosos. Además, estos marcadores moleculares constituyen un instrumento valioso para el especialista en selección, en la medida en que le proporcionan una herramienta que los medios tradicionales no le permiten. Sus aplicaciones potenciales abarcan, entre otras, la identificación de los genotipos, ayuda a establecer estrategias de cruzamientos y selección como también el estudio de la diversidad de las poblaciones (Baudin 1992).

En palma de aceite, los marcadores RAPD han sido útiles en la determinación de la variación genética entre diferentes accesiones del germoplasma (Shah et al. 1994).

Los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) es una tecnología más reciente e igualmente se utiliza para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en el genoma. Los AFLP combinan la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos vía PCR. Desde su desarrollo y divulgación (Zabeau 1993), esta técnica ha sido utilizada en forma creciente para diversas finalidades como "fingerprinting" y mapeo genético, principalmente en especies de plantas cultivadas que presentan una baja tasa de polimorfismos de ADN.

En un cultivo de importancia económica como la palma de aceite, el conocimiento y la preservación de la diversidad genética tienen un valor más que filosófico. Las enfermedades pueden destruir fácilmente poblaciones que carecen de suficiente diversidad genética. Este cultivo es atacado por enfermedades con efectos variables dependiendo del material sembrado, pero en conjunto causan pérdidas considerables año tras año. Dado que las características de interés agronómico se encuentran a menudo en poblaciones pequeñas e incluso en unos pocos miembros de una población (Debouck 1992), es necesario evaluar y preservar la variabilidad de los materiales de que se dispone para efectos de mejoramiento genético.

En palma de aceite, el mejoramiento genético también cuenta con la posibilidad de obtención de híbridos interespecíficos entre *Elaeis oleífera*

y *E. guineensis* (OxG), apuntando a la introgresión de genes para altos niveles de insaturación de aceite, bajo crecimiento y resistencia a plagas y enfermedades. Sin embargo, los híbridos presentan también algunas desventajas comerciales dado su bajo rendimiento y esterilidad. Por esta razón, el híbrido OxG se cruza nuevamente con *E. guineensis* para mejorar estas características (Cheah et al 1999).

Actualmente, el MOPB (Malasyan Oil Palm Board) está desarrollando técnicas moleculares para determinar la composición del genoma de las progenies, y que por lo tanto puedan ser útiles al seleccionar para mejoramiento genético, únicamente las plantas con mayor proporción de *guineensis,* reduciendo así el número de ciclos para la obtención de una variedad mejorada, producto de estas dos especies (Cheah et al. 1999).

El objetivo de este estudio es conocer la diversidad genética de algunos materiales Dura de la plantación Promociones Agropecuarias Monterrey, que por su tolerancia a plagas y buena producción, pueden ser utilizados en estrategias de cruzamiento y selección, y cuyo aporte principal lo constituye su adaptabilidad.

El programa de mejoramiento genético de Cenipalma está tratando de incorporar todas las técnicas y metodologías que puedan acelerar e introducir características de interés económico al mejoramiento genético del cultivo de palma de aceite, y la selección asistida por marcadores forma parte importante de este objetivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 126 materiales de la Plantación Promociones Agropecuarias Monterrey, seleccionados por presentar las mejores producciones para los años 1990 a 1995 (Ayala et. al 2000), pertenecientes a los lotes: 10B5 (54 palmas), 2F4 (45 palmas) y 4C4 (27 palmas) fueron evaluados.

El procedimiento básico consistió en extraer ADN de los folíolos de cada palma utilizando un buffer en el que éste queda disuelto (Dellaporta et. al 1993). Posteriormente, regiones de este ADN pueden ser amplificadas con rapidez y bajo costo. El procedimiento básico es: El ADN de cada individuo (o sea de cada palma) se mezcla con cebadores o "primers" (que son secuencias sintéticas cortas y conocidas de nucleótidos, unidad estructural del ADN) con una enzima que es la encargada de "pegar" estos nucleótidos cuando los cebadores encuentren secuencias complementarias con determinado individuo.

Esta mezcla de reactivos se calienta a 95°C, temperatura a la cual el ADN de cada palma se descompone en dos cadenas. A continuación se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se enlacen con sus secuencias complementarias y es ahí donde la enzima añade los nucleótidos copiando selectivamente el ADN específico que ahora esta presente en cantidad doble de la original. Este ciclo se repite una y otra vez y en cada ocasión se duplica la cantidad de ADN específica, flanqueada por los cebadores enlazados. En unas cuantas horas se pueden generar miles de millones de copias de esta región específica (Williams et al. 1990).

Para poder establecer diferencias entre los individuos sólo basta comparar estos productos de amplificación. Una banda presente en una palma y ausente en otra indica diferencias en su material genético. Estas diferencias son las que finalmente se suman y procesan con el paquete estadístico NTsys, el cual compara todos los individuos y los agrupa acorde a su similaridad genética.

Para este trabajo se utilizaron 12 cebadores que en trabajos anteriores (Cenipalma 1997) se habían considerado como polimórficos o que servían para establecer diferencias entre materiales de *E. guineensis.* Estos 12 cebadores generaron 36 bandas polimórficas que se procesaron en una matriz de unos y ceros (uno para las presencias y cero para las ausencias). El paquete estadístico utilizado se llama NTsys (Rohlf 1994) y utiliza el índice de Jacard, cuyos datos posteriormente generan un dendograma (diagrama que representa la relación entre individuos según el número de presencia y ausencia de bandas) que muestra la distribución

de los materiales acorde con su similitud genética.

Los cebadores utilizados y los polimorfismos de cada uno fueron:

Cebador	No. de bandas polimórficas
AE 03	3
Z 11	4
Z 03	3
V 15	4
B12 03	3
AJ 10	5
R 17	1
I 08	5
I 05	2
A 12	1
Y 10	3
S 1	2

Para comparar los materiales se busca una medida de semejanza que relacione el número de bandas (unos o ceros) que simultáneamente compartan dos materiales y posteriormente se calculan los coeficientes de similitud entre todos los individuos.

RESULTADOS

A partir de 36 bandas polimórficas y 117 individuos se generó un dendograma Inicialmente hubo 126 materiales, pero los que presentaron algún dato faltante se dejaron para ser incluidos en un análisis posterior.

El propósito fundamental de este análisis es colocar conjuntos de individuos en grupos mutuamente excluyentes, de tal forma que se puedan hacer inferencias estadísticas a partir de semejanzas entre los grupos provistos por el análisis. Los grupos establecidos forman particiones y subdivisiones en conjuntos menores, y reagrupaciones mayores, las cuales varían dependiendo del número de bandas compartidas.

La Figura 1 muestra los patrones generados por la amplificación de cinco individuos pertenecientes a los tres lotes con el cebador B 12. Las flechas indican los polimorfismos o bandas que diferenciaban los materiales y que fueron tenidas en cuenta para caracterizar esta población.

Las dos primeras letras en el dendograma (Fig. 2), identifican los códigos y las cifras siguientes identifican el número del material. Los números iniciales para los lotes no fueron aceptados por el programa estadístico, por tal razón se omitieron, de tal forma que el primer individuo que aparece en el dendograma es B51, lo que quiere decir que es el material número uno del lote 10B5, y el último es el material o individuo número 16 del lote 4C4 (C416).

El eje de las x (la axial) muestra los coeficientes de similaridad genética, siendo 1 el valor para individuos idénticos y 0 para los más distantes. La distancia se toma como el valor de 1-S (similaridad).

Los materiales más productivos se encuentran distribuidos en todos los grupos, lo cual es de

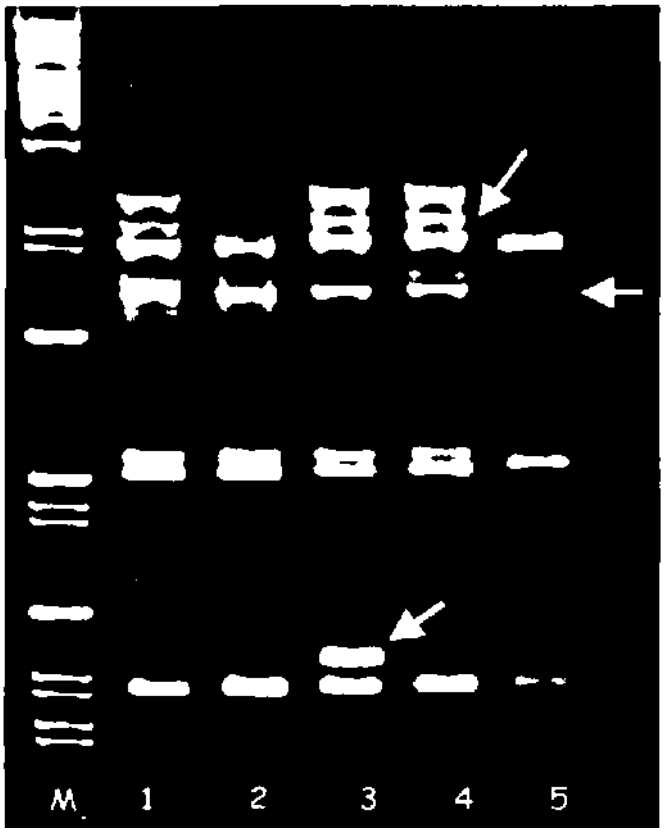

Fig. 1 Producto de amplificación generado por el cebador B12 con cinco diferentes materiales. Las flechas muestran los tres polimorfismos escogidos para este estudio.

esperarse si se considera que la productividad es una característica cuantitativa controlada por muchos genes. Para planear los cruzamientos es de interés cruzar aquellos que son muy productivos y con las mayores distancias genéticas, con el fin de superar su propia producción. Un ejemplo de este trabajo se muestra con dos de las palma más productivas, 2F4 45 y 2F4 6 que según sus distancias genéticas se ubican en los dos extremos de la Figura 2, señaladas con flechas. Materiales genéticamente similares y que al mismo tiempo son muy productivos no se consideraran para cruzar, ya que posiblemente sus componentes de rendimiento comparten los mismos genes, como por ejemplo los materiales 10B5 22 y 2F4 6 señalados con flechas en la Figura 2 y como se puede observar pertenecen a un mismo grupo genéticamente muy cercano.

Para afinar más este dendograma es necesario aumentar el número de marcadores, bien sean tipo RAPD u otros, lo que permitiría discriminar mejor entre los individuos evaluados.

Como conclusión de este tipo de análisis se puede decir que ofrece nuevas posibilidades en la caracterización de poblaciones, integrando la información fenotípica y genotípica. Permite, además, la selección de progenitores de una colección principal representativa y la identificación de duplicados.

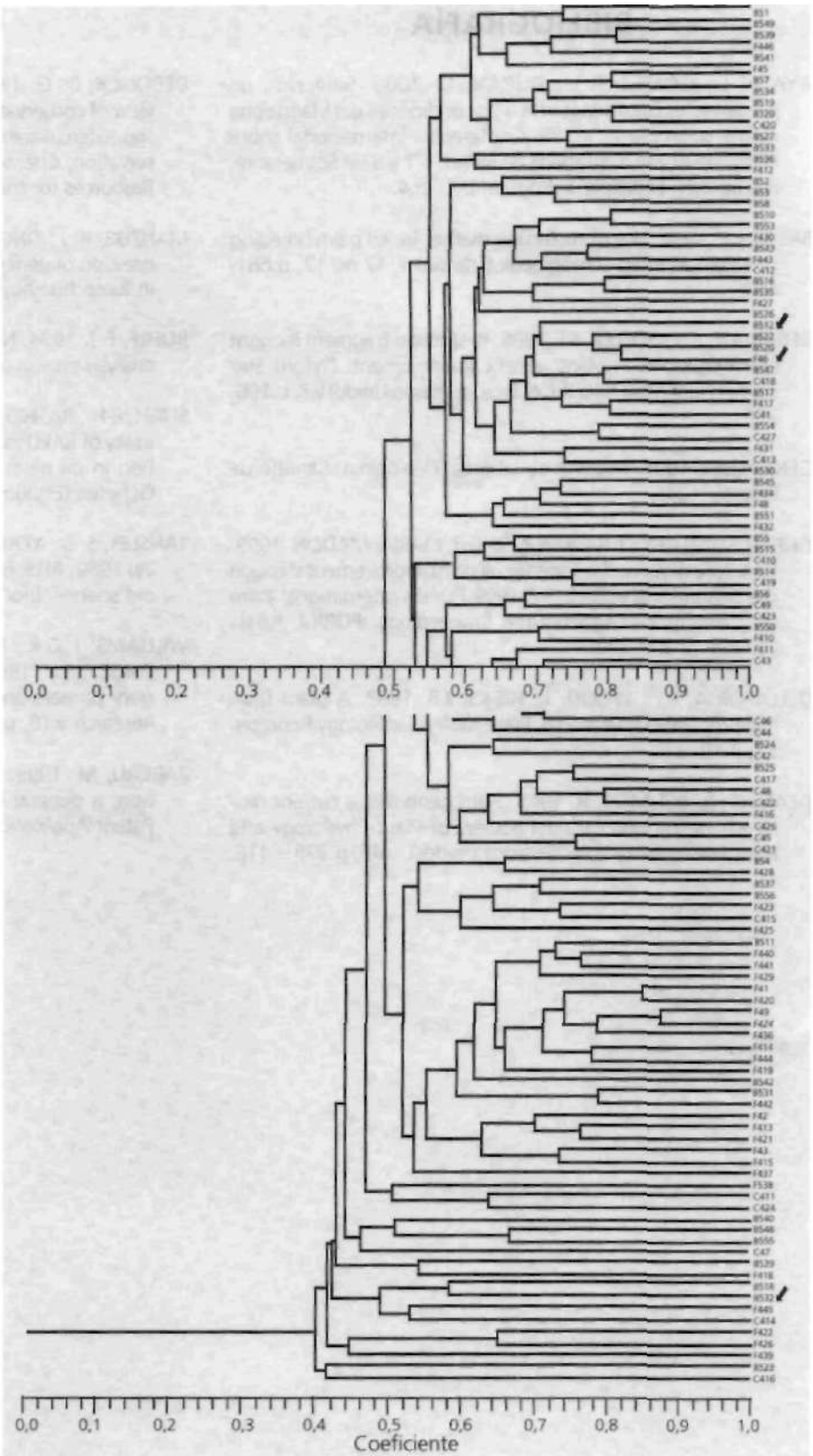

Figura 2. Dendograma de las relativas distancias genéticas entre genotipos de materiales Dura de Monterrey. Las flechas indican los individuos escogidos como ejemplos dentro de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

AYALA, L; GÓMEZ, P. L; DURAN, C. 2000. Selección de progenitores Dura adaptados a las condiciones del Magdalena medio colombiano. *In:* XIII Conferencia Internacional sobre Palma de Aceite. Cartagena de Indias. 6,7 y 8 de Septiembre. Resúmenes. Fedepalma, Bogotá, D.C. p.4.

BAUDIN, L. 1992. Use of molecular marker for oil palm breeding I. Protein Markers. Oléagineux (Francia) v. 47 no. 12, p.681-691.

BECKMAN, J. S.; SOLLER, M. 1986. Restriction fragment lengght polymorphisms in plant genetic improvement. Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology (Reino Unido) v.3, p. 196-250.

CENIPALMA. 1997. Informe de labores. Cenipalma, Santafé de Bogotá. 124p.

CHEAH, SUAN CHOO; RAJINDER, SINGH; MARÍA, MADON. 1999. Generating molecular Tools for oil palm improvement through the genomics approach. *In:* 1999 PORIM International Palm Oil Conference (Agriculture). Proceedings. PORIM, Kuala Lumpur, p. 297-320

DELLAPORTA, S.L; WOOD, J.; HICKS, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter. v.1, p.19-21.

DEAN, C; R. SCHMIDT, R. 1995. Plant genomes: a current molecular description. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (Estados Unidos), v.46, p.395 - 418.

DEBOUCK, D. G. 1992. Biodiversity of forest species and overview of conservation needs for cocoa germplasm *(Theobroma* spp., Sterculiaceae). *In:* 1992 International Workshop on Conservation, Characterization and Utilization of Cocoa Genetic Resources for the 21st Century. CRU, Trinidad.

MANZUR, B. J.; TINGEY, S. V. 1995. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. Current Opinion in Biotechnology. v.6, p.175-182.

ROHLF, F. J. 1994. NTSYS - pc Numerical taxonomy multivariate analysis system (version 1.8). State University of New York.

SHAH, F. H., RASHID, O.; SIMONS, A. J.; DUNSDON A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm *(Elaeis guineensis).* Theorical and Applied Genetics (Estados Unidos) v.89, p.713- 718.

TANSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H.; Bonierbale, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio/Technology v.7, p.257- 264.

WILLIAMS, J. G.K.; RUBELIK, A. R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research v.18, p.6531-6535.

ZABEAU, M. 1993. Selective restriction fragment a, amplification; a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application No 0534858 A1