

Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite

Molecular Markers, an Useful Tool for Genetic Selection in Oil Palm

Pedro J. Rocha S.¹

Resumen

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN, que se han constituido en herramientas valiosas para la detección y el uso de la diversidad genética, con su consecuente aplicación en programas de selección genética de plantas, animales y microorganismos. Los polimorfismos (o variantes) a nivel de ADN pueden ser detectados mediante técnicas moleculares, algunas de las cuales han sido empleadas en palma de aceite. En esta revisión se explican y clarifican algunas de tales técnicas y se presentan ejemplos representativos de su aplicación en el cultivo de la palma de aceite.

Summary

Molecular markers are DNA sequences converted in valuable tools for detecting and using genetic diversity and applied in genetic selection programmes of plants, animals and microorganisms. Polymorphisms at DNA level can be detected through molecular techniques, some of which have been used in oil palm and are explained in this review.

Palabras Claves

Palma de aceite, Marcadores Moleculares, ADN, Mejoramiento genético, Selección, Diversidad genética, KFLP, POR, AFLP, RAPD, SSR, Glosario, Biotecnología.

1 . Biólogo. Ph. D. Investigador Titular, Laboratorio de Marcadores Moleculares, Area de Fisiología y Mejoramiento, Cenipalma, Calle 21 No. 42C-47, Bogotá, Colombia. E-mail: pedro.rocha@cenipalma.org

Recibido: 2 de mayo de 2003. Aprobado: 20 de mayo de 2003

Introducción

Un marcador molecular es un fragmento (secuencia) de ADN que por sí solo, o combinado en alineación con otros, puede ser físicamente localizado dentro del genoma de un organismo. Tales fragmentos pueden encontrarse cerca a un gen que codifica una carac-

terística de interés o en regiones que, sin ser codificantes, contienen características estructurales particulares (Fig. 1). Una de las características de los marcadores moleculares es que son específicos para cada individuo, grupo de individuos, especies o aún de grupos sistemáticos mayores, lo cual los convierte en herramientas

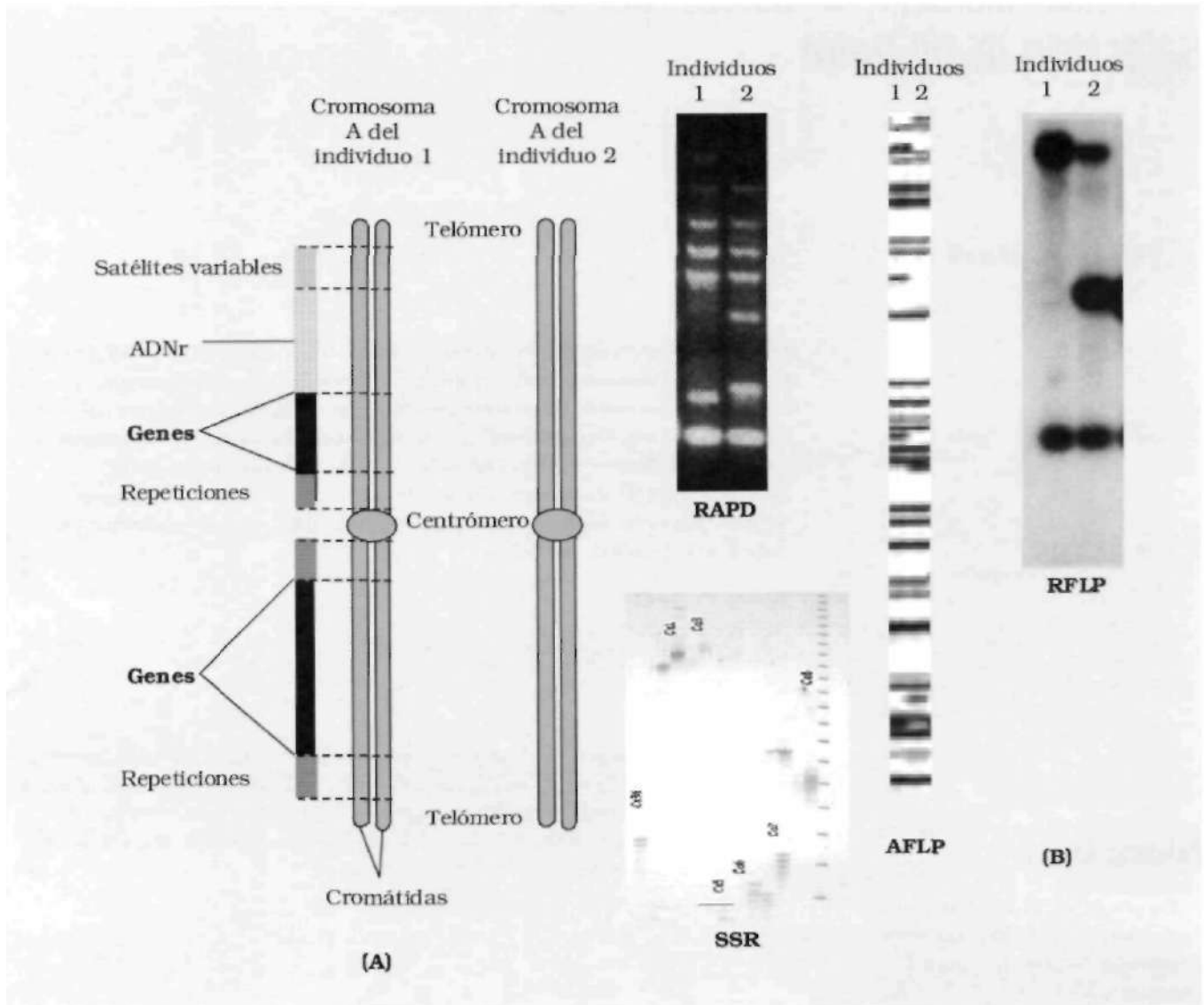


Figura 1 Representación esquemática de la estructura de un cromosoma vegetal (Basado en Flavell y Twell, 1996). (A) Un cromosoma está compuesto por dos cromátidas (una proveniente de la madre y otra del padre del individuo). A los extremos de las cromátidas se les denominan telómeros. A la región de unión de las dos cromátidas se le llama centrómero. A la izquierda se aprecia un modelo de la distribución de las distintas regiones dentro del cromosoma. Al comparar el ADN de dos individuos con diferentes técnicas de marcadores moleculares se obtienen resultados como los mostrados en (B). ADNr= regiones que codifican para ADN ribosomal.

útiles para el análisis tanto de individuos como de poblaciones (Karp y Edwards 1997).

El ADN tiene una estructura fisicoquímica especial que le confiere propiedades únicas para el almacenamiento y la transferencia de información de generación en generación (Rocha 2002). Los marcadores moleculares exhiben las características fisicoquímicas del ADN y su herencia se explica con las mismas leyes establecidas por la genética. Como consecuencia, los marcadores moleculares se han constituido en una inmensa caja de herramientas extremadamente útiles para la detección de polimorfismos (ver glosario) en animales, plantas superiores, patógenos y plagas (virus, hongos, insectos, nematodos, etc.). La detección y el análisis de los polimorfismos en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) y noli (*E. oleífera* [H.B.K.] Cortés) han hecho que los marcadores moleculares sean empleados, entre otros, en análisis de variabilidad genética y establecimiento de relaciones filogenéticas (Rey et al. 2003; Barcelos et al. 2002; Billotte et al. 2001a; Maizura et al. 2001; Purba et al. 2000; Barcelos, 1998; Mayes et al, 1996; Sha et al. 1994); desarrollo de mapas genéticos (Billotte et al. 2001b; Chua et al. 2001; Mayes et al. 1997); y señalización y seguimiento de caracteres (genes) de interés. Por ejemplo, resistencia a la Pudrición de Cogollo (Ochoa et al. 1997). el gen *Sh* determinante de los tres tipos de frutos: dura (*Sh*⁺/*Sh*⁺), ténera (*Sh*⁺/*Sh*⁻) y pisífera (*Sh*⁻/*Sh*⁻) (Rival et al. 2001; Billotte et al. 2001b) y marcadores de variantes somaclonales (Rival et al. 2001). Adicionalmente, experimentos con marcadores derivados del ácido ribonucleico (ARN) han permitido determinar genes involucrados en el desarrollo floral (Singh y Cheah 2000) y genes que codifican para enzimas de la síntesis de ácidos grasos (Shah y Cha 2000).

En la actualidad, mediante el empleo de marcadores de ADN, se busca hacer más eficiente la selección de plantas y de variedades para ser empleadas en programas de mejoramiento genético (metodología conocida como selección asistida por marcadores). Este tipo de selección hace posible la predicción de los genotipos a obtener en un cruzamiento con base en la información de los parentales empleados. Además, los marcadores moleculares pueden ser usados para identificar plantas individuales que contienen características (alelos) de interés particular (Mohan et al. 1997; Ribaut y Hoistong 1998). Como consecuencia, la selección de las plantas con características de interés puede ser hecha en plántulas de vivero o previvero (Villegas 2000; Villegas et al. 2000). lo cual ayuda a reducir significativamente los costos de manejo de un programa de mejoramiento (Dreher et al. 2003; Morris et al. 2003). Adicionalmente, en otros sistemas vegetales, los marcadores moleculares se están utilizando para el aislamiento, caracterización y seguimiento de genes específicos empleados en transgenia (Kuiper et al. 2001; Dra. Anne Bridges, Presidente Comité Técnico Métodos de Biotecnología - *American Association of Cereal Chemist*, Estados Unidos, Comunicación personal).

Para determinar la localización de un fragmento de ADN y su cercanía a un gen particular dentro del genoma o para establecer las relaciones de parentesco entre individuos o poblaciones se hace necesario el apoyo del mejoramiento tradicional y de disciplinas como la genética cuantitativa y la estadística (Nei y Li 1979; Nei 1973,1978). Una de las estrategias más utilizadas para generar información de utilidad en programas de mejoramiento genético es determinar los marcadores presentes en cruces F2 y retrocruces. Básicamente, en un

experimento F2 se tratan de mezclar **los** genes de dos individuos muy contrastantes (por ejemplo, un padre resistente y una madre susceptible a una enfermedad). Luego se cruzan estos parentales y se obtiene una generación de individuos híbridos (F1) que posteriormente son cruzados entre sí, generando una segunda generación (F2). El diseño F2 es más efectivo entre más contrastantes sean las características de los progenitores. Sin embargo, este diseño se hace dispendioso en el caso de plantas perennes de crecimiento lento como la palma de aceite.

Por la información que brindan, los marcadores moleculares son equivalentes a los marcadores morfoagronómicos, aunque a otra escala. Los marcadores morfoagronómicos son, por lo general, características observables o medibles que resultan de la expresión de un número limitado de genes y son dependientes de la interacción con el medio ambiente. En contraste, los marcadores moleculares no se aprecian en el fenotipo de los individuos (es decir, no se observan a simple vista), su presencia es independiente del efecto medioambiental, son mucho más numerosos que los marcadores morfoagronómicos y no tienen función aparente. Adicionalmente, el grado de polimorfismo (variantes) obtenido con los marcadores moleculares es enorme comparado con el de otro tipo de marcadores. El análisis estadístico y genético de los miles de puntos de información generados mediante las diversas técnicas de marcadores se ha acelerado como consecuencia de la aparición de "software" especializado para tal fin, por ejemplo. NTSYS, Popgene, Mapmaker (Lincoln et al. 1993), JoinMap (Stam y Van Ooijen 1995). etc.

En la actualidad se conocen varios cientos de marcadores reportados por

todo el genoma de *E. guineensis* (Rival et al. 2001; Billotte et al. 2001a; Billotte, et al. 2001 b; Chua et al. 2001; Rajinder et al. 2001; Mayes et al. 1997) y su número crece paulatinamente. Sin embargo, la mayoría de ellos no presenta interés desde el punto de vista económico. Es fundamental, por lo tanto, identificar marcadores que estén asociados con caracteres de interés económico o industrial (genéricamente conocidos como QTL -*Quantitative Trait Loci*-), por ejemplo, marcadores asociados con la altura, con resistencia a enfermedades, con contenido de carotenos y vitamina E, con el desempeño en condiciones de estrés hídrico. con características involucradas en la productividad tales como número y tamaño de frutos, porcentaje de fibra, grosor de cuezco, **etc.** El análisis de los marcadores asociados con caracteres de interés económico se facilita enormemente si se dispone de un **mapa genético**, el cual es la secuencia ordenada de los marcadores moleculares y genes conocidos de una especie, así como las distancias que hay entre ellos.

Es posible que en los próximos años se disponga de mucha más información sobre marcadores asociados con caracteres de interés económico. Sin embargo, hay que tener en cuenta dos precauciones. Primero, un mismo gen puede afectar a varios caracteres y no necesariamente de forma beneficiosa a todos ellos. Y segundo, un mismo carácter puede verse afectado con toda probabilidad por más de un gen, por lo que identificar un gen no quiere decir que se tenga control sobre la característica (Mazur y Tingey 1995).

Si dos individuos son diferentes, sus ADN también lo son, ya que esta molécula lleva todos los genes responsables de tales diferencias (Rocha 2002). Si el objetivo es diferenciar variedades de plantas para posteriormente poder identificarlas, lo

mejor es empezar a buscar las diferencias entre ellas comparando sus ADN. Varias metodologías permiten magnificar las diferencias existentes entre organismos a escala molecular para hacerlas perceptibles por nuestros sentidos, es decir, para visualizar esos marcadores moleculares. Algunas de estas metodologías, conocidas por sus acrónimos, serán brevemente explicadas a continuación.

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Esta técnica produce fragmentos de ADN mediante el uso de **enzimas de restricción** que detectan polimorfismos en los sitios de corte, lo cual se ve reflejado como variación en la longitud de los fragmentos generados (Fig. 2). Las diferencias en longitud de los fragmentos obtenidos (polimorfismo) ocurren como resultado de inserciones, deleciones o mutaciones en una base de la secuencia del ADN (Tanksley et al. 1989). Dichos polimorfismos pueden ser visualizados y comparados entre individuos de una misma especie o de especies diferentes.

Los RFLP son marcadores moleculares codominantes, es decir, pueden detectar tanto individuos homocigotos como heterocigotos, y pueden ser usados en todos los miembros de una especie o especies relacionadas. Con RFLP es posible obtener entre uno y cinco puntos (bandas) de información por cada muestra analizada. El uso de RFLP ha sido reportado en un amplio rango de especies. En palma de aceite, esta técnica ha sido empleada para el estudio de diversidad genética (Barcelos et al. 2002; Barcelos 1998), en la construcción de mapas genéticos (Mayes et al. 1997) y en la identificación de marcadores asociados con características deseables (revisado por Rajinder et al. 2001; Villegas y Gómez 1998).

Marcadores moleculares basados en PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

El PCR es la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y se explicará aquí porque la mayoría de los marcadores moleculares empleados en la actualidad se basan en esta metodología. La técnica de PCR fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1984 (Saiki et al. 1985; Saiki et al. 1988), quien recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1993 por esta invención. Esta técnica permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN que sirve como molde gracias a la acción de la enzima *Taq* polimerasa. Esta enzima, aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*, es una proteína termoestable (que actúa a altas temperaturas), que polimeriza nucleótidos de manera fiel y permite la formación de nuevas moléculas de ADN (Fig. 3).

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Esta técnica está basada en la metodología del PCR y consiste en la amplificación de fragmentos de ADN con un sólo **cebador** de diez nucleótidos que se hibrida al ADN molde de manera aleatoria (Williams et al. 1990), a diferencia de una reacción de PCR típica que emplea dos cebadores (uno por cada cadena). La corta longitud del cebador RAPD hace que su secuencia se hibride aleatoriamente a lo largo del genoma (Fig. 4). Con RAPD se pueden generar entre tres y diez puntos de información por cada muestra analizada (revisado por Ranade et al. 2001).

En palma de aceite, marcadores tipo RAPD se han empleado en estudios de diversidad genética (Shah et al. 1994), caracterización de materiales (Villegas et al. 2000) y en la búsqueda de marcadores ligados a Pudrición de Cogollo (Ochoa et al. 1997; Cenipalma 1996).

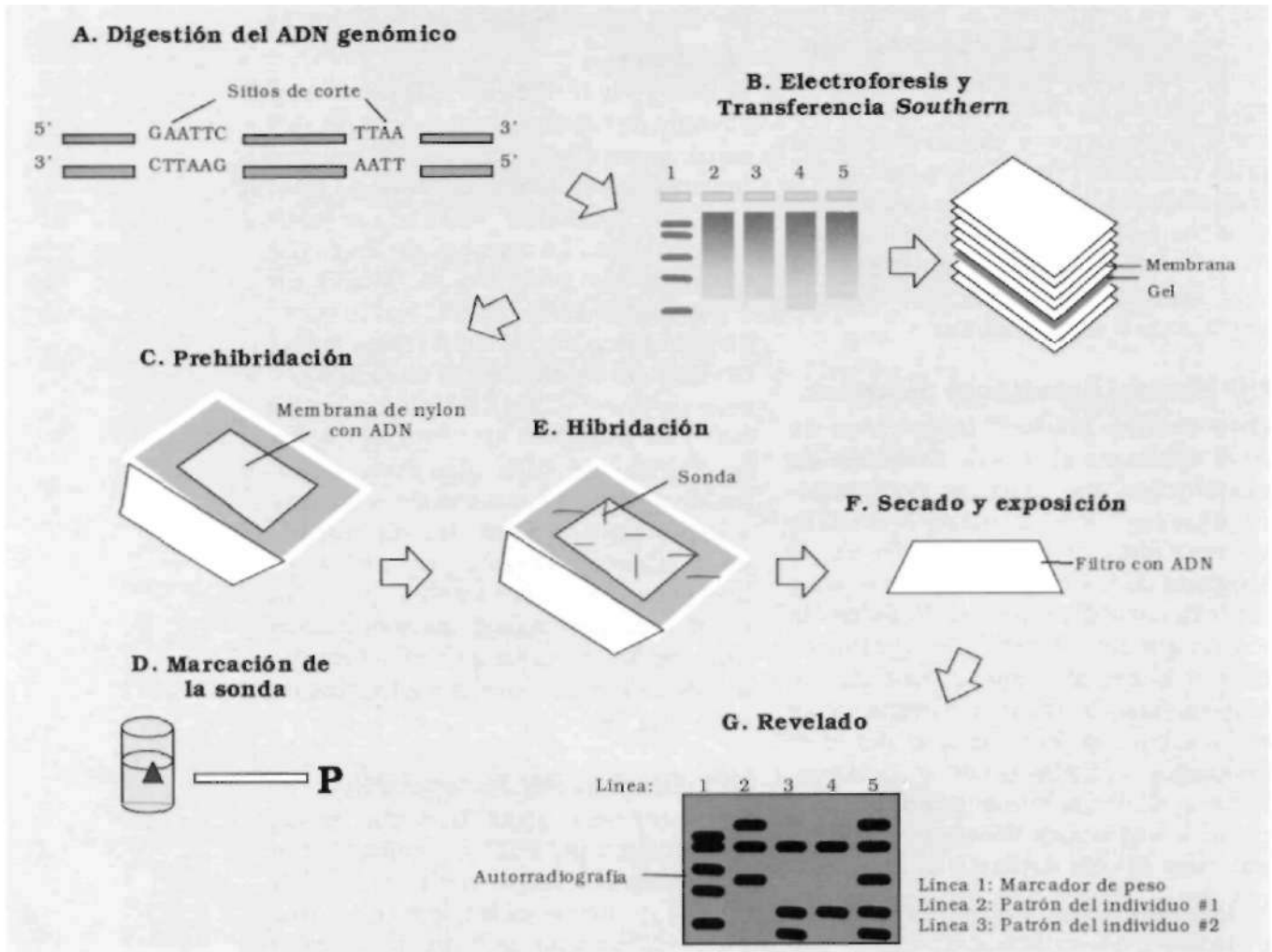


Figura 2

Metodología para generación de marcadores RFLP. Esta técnica genera polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN que han sido generados como resultado de la fragmentación del ADN mediante el uso de enzimas de restricción (A). Una vez el genoma es cortado (digerido) por una enzima de restricción particular, los fragmentos resultantes se separan mediante electroforesis en gel de agarosa (B). El ADN digerido y separado en el gel es posteriormente transferido a una membrana de nylon, técnica conocida como *Southern blot*" (Southern 1975). Esa membrana que contiene el ADN es posteriormente tratada con soluciones salinas (C) e incubada, a una temperatura determinada, con un fragmento de ADN o ARN (genéricamente conocidos como sondas). La sonda puede provenir de una bacteria, animal, otra planta, o puede haber sido diseñada y sintetizada químicamente en el laboratorio. Para que la sonda cumpla con su función, es decir, hacer posible la visualización de los fragmentos de interés, es necesario que esté marcada. La marcación de la sonda puede ser radioactiva o emplear fluorocromos, biotina, digoxigenina, etc (D). Al proceso de incubación de la sonda con la membrana que contiene el ADN digerido se le conoce como hibridación de ácidos nucleicos (E). Este proceso aprovecha la característica de complementariedad de bases del ADN y básicamente consiste en que una molécula de ADN de cadena sencilla puede reconocer y unirse (pegarse) a otra molécula de cadena sencilla (bien de ADN, bien de ARN) si las secuencias poseen cierto grado de similitud (complementariedad). Una vez la hibridación se ha llevado a cabo, las membranas conteniendo el ADN digerido y el complejo ADN digerido-sonda se lavan con soluciones salinas, a diferentes temperaturas y se ponen en contacto con películas fotográficas (F) durante algunos días antes de ser reveladas (G). El resultado es una autorradiografía en la cual se observan bandas que corresponden a fragmentos de ADN. Dichas bandas se registran como características presentes o ausentes en las muestras.

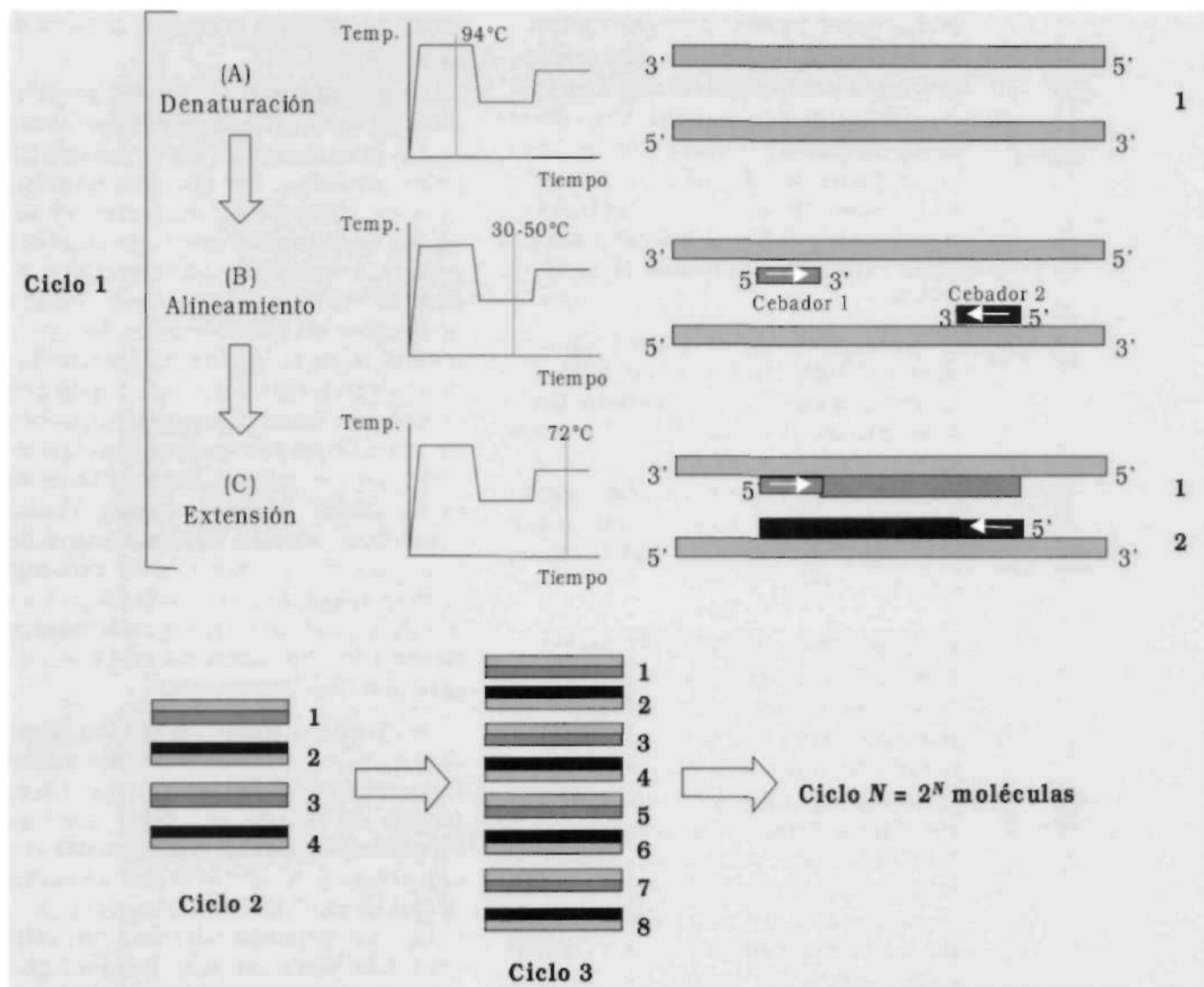


Figura 3

Representación gráfica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El primer paso en la reacción de PCR es la denaturación (A) que consiste en calentar la molécula de ADN de doble cadena a 94-95°C durante 30 segundos a 1 minuto. Este tratamiento hace que la doble cadena se separe en dos hebras simples (denaturación) y se genere ADN de cadena sencilla. El siguiente paso es denominado alineamiento (B) y consiste en la hibridación por complementariedad de un par de cebadores (pequeñas secuencias de ADN de cadena sencilla entre 10 y 25 nucleótidos) a la cadena sencilla de ADN molde. Los cebadores son los iniciadores de la polimerización de la nueva cadena de ADN. Este paso se lleva a cabo a una temperatura entre 32 y 50°C durante 30s a 1 min. El tercer paso es conocido como extensión (C) y consiste en la incorporación de nucleótidos a la cadena nascente de ADN siguiendo la complementariedad definida por la cadena molde. Este paso se lleva a una temperatura entre 68 y 72°C durante un tiempo que depende de la longitud del fragmento a amplificar (entre 1 y 5 minutos). La suma de los pasos de denaturación, alineamiento y extensión constituyen un ciclo de PCR. Si se comienza con una sola molécula de ADN, luego del primer ciclo se obtienen dos moléculas. Si se lleva a cabo otro ciclo se obtienen cuatro, después ocho y así sucesivamente. Una reacción de PCR típica consta de 35 ciclos, lo cual significa que si se parte de una molécula de ADN, luego de los 35 ciclos se obtendrán -al menos teóricamente- más de 34.000 millones de moléculas nuevas. La separación y visualización de los productos de PCR se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Esta técnica, una de las más empleadas en la actualidad debido a su calidad y cantidad de información, combina la eficiencia y precisión de los RFLP con el poder del PCR (Fig. 5). Con AFLP se pueden generar entre ochenta y doscientos puntos de información por cada muestra analizada (Vos et al. 1995).

Marcadores AFLP para palma de aceite se han utilizado en estudios de diversidad genética del género *Elaeis* (Barcelos et al. 2002; Barcelos 1998) y en la construcción de mapas de ligamiento a características como grosor del cuezco, color del fruto, etc. (Chua et al. 2001; Billotte et al. 2001b, Singh y Cheah 1999).

SSR (*Simple Sequence Repeats*) o Microsatélites

Los SSR son regiones de secuencias repetidas (conocidas también como microsatélites) que están distribuidas a todo lo largo del genoma. Dichas regiones repetidas presentan un alto nivel de polimorfismo, aunque están bordeadas por secuencias altamente conservadas a nivel de especie. Como consecuencia de esta característica, dichas secuencias pueden ser amplificadas por PCR usando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias de los microsatélites aislados de una **genoteca** genómica (Fig 6). Los marcadores de este tipo son usados para identificar polimorfismos entre genotipos, pues permiten la detección (de la presencia o ausencia) de alelos específicos (Dreher et al. 2003).

En palma de aceite, Billotte et al. (1999) desarrollaron y caracterizaron marcadores tipo microsatélites. Con estos marcadores es posible diferenciar de manera precisa *E. guineensis* de *E. oleífera* (Billotte et al. 2001b).

Empleo de marcadores moleculares en palma de aceite

La tecnología de marcadores moleculares se está utilizando exitosamente en los programas de biotecnología de palma de aceite. Por ejemplo, en estudios de diversidad. Barcelos et al. (2002) encontraron que la divergencia genética entre *E. guineensis* y *E. oleífera* era muy baja y de la misma magnitud que la encontrada entre miembros de *E. oleífera*. Estos resultados sugirieron que, en términos evolutivos, estas dos especies poseen un origen común y un genoma conservado para el género *Elaeis* (Barcelos et al. 2002; Barcelos 1998). Dicha conclusión resalta la importancia de llevar a cabo acciones para explorar la diversidad de *E. oleífera* (Rey et al. 2003) y evidencia las posibilidades reales para incorporarla en el acervo genético de *E. guineensis*.

Mediante estudios de mapeo llevados a cabo en el MPOB [*Malaysian Palm Oil Board*] se han generado tres mapas de palma de aceite. Se han identificados **loci** para el contenido de carotenos y anormalidades clonales (Rajinder et al. 2001). Adicionalmente, están en proceso algunas investigaciones para mapear los loci que afectan el contenido de tocoferoles y tocotrienoles. Por su parte, estudios llevados a cabo en el CIRAD (*Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement*, Francia), han mapeado la característica de grosor de cuezco (*Sh*) empleando AFLP y microsatélites (Billotte et al. 2001b).

El laboratorio de Marcadores Moleculares de Cenipalma ha usado marcadores tipo RAPD (Cenipalma 1996; Ochoa et al. 1997; Arias 2003) y AFLP (Cenipalma, datos sin publicar). En la actualidad se implementa la técnica de microsatélites.

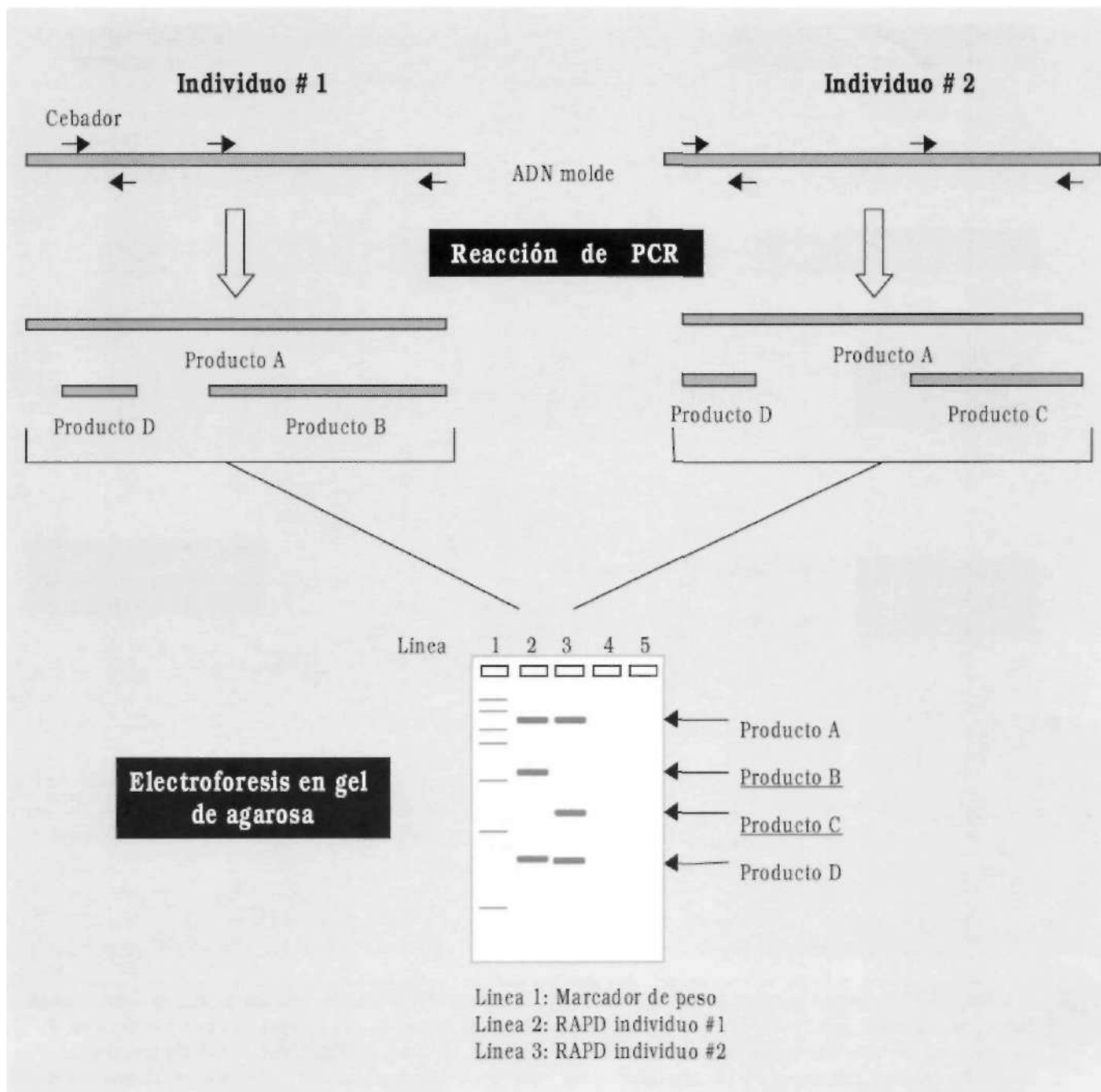


Figura 4

Metodología RAPD. Esquema de la comparación hipotética de dos individuos empleando esta técnica. El ADN de cada individuo es aislado y empleado como molde para la reacción de PCR. El ADN molde se incubó con un cebador de 10 nucleótidos, el cual reconoce de manera aleatoria, y se alinea, a los sitios complementarios de la cadena de ADN molde. Luego de la reacción de PCR se forman varios productos (amplicones) de diferentes tamaños. Estos productos son separados empleando electroforesis en gel de agarosa. Para el caso particular, los productos A y D son idénticos para los dos individuos. En contraste, los productos B y C son exclusivos, es decir son marcadores moleculares específicos, de los individuos 1 y 2, respectivamente. A estas bandas (productos B y C) se le conocen como bandas polimórficas.

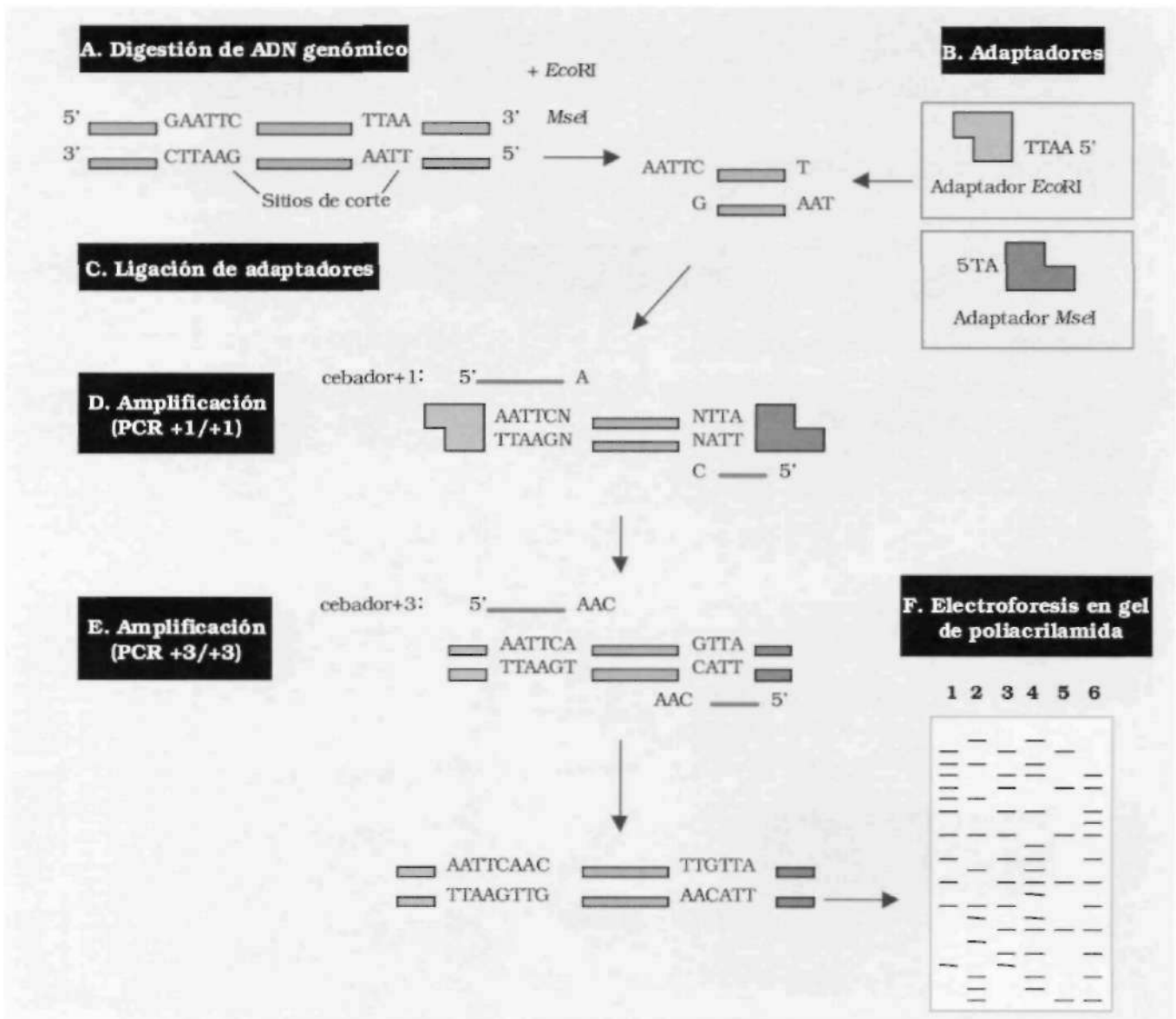


Figura 5 Metodología AFLP. Se extraen muestras de ADN de los individuos a analizar. Posteriormente, cada una de ellas se digiere con dos enzimas de restricción, *EcoRI* y *MseI* (A). Este proceso genera millones de fragmentos con extremos cohesivos que permiten el reconocimiento de secuencias complementarias a los sitios de restricción por parte de adaptadores de ADN (B) previamente sintetizados (por una casa comercial). Los adaptadores y las moléculas de ADN digeridas, todas exhibiendo complementariedad por secuencias *EcoRI* y *MseI*, son pegadas mediante la actividad de una enzima, la ligasa, razón por la cual se conoce como reacción de ligación a este proceso (C). Como resultado de esta reacción, los millones de fragmentos de ADN digeridos, en principio desconocidos, quedan con extremos de ADN conocido. Este hecho hace posible la amplificación de estos fragmentos mediante PCR, empleando un par de cebadores cuyas secuencias son complementarias a la de los adaptadores que han sido ligados a los fragmentos de ADN desconocido (D). Otra particularidad de estos cebadores es que poseen un nucleótido seleccionante, es decir, que como última base en su secuencia nucleotídica posee uno de los cuatro nucleótidos posibles (A, C, G o T). El hecho de poseer sólo uno de estos nucleótidos hace posible disminuir la población de los fragmentos en aproximadamente 15 veces. Luego de esta reacción se hace un segundo PCR (E) en el cual se emplean cebadores con dos o tres nucleótidos selectivos, lo cual disminuye el número de fragmentos en varios órdenes de magnitud. Este PCR puede ser radioactivo. Los productos de PCR se separan mediante electroforesis en gel de poliácridamida (F). Una ventaja de los AFLP es que se puede hacer su detección bien con radioactividad, bien mediante técnicas de tinción con plata. El análisis de los resultados se hace mediante técnicas estadísticas que consideran matrices de 0 y 1 dependiendo de la ausencia o presencia de bandas, respectivamente.

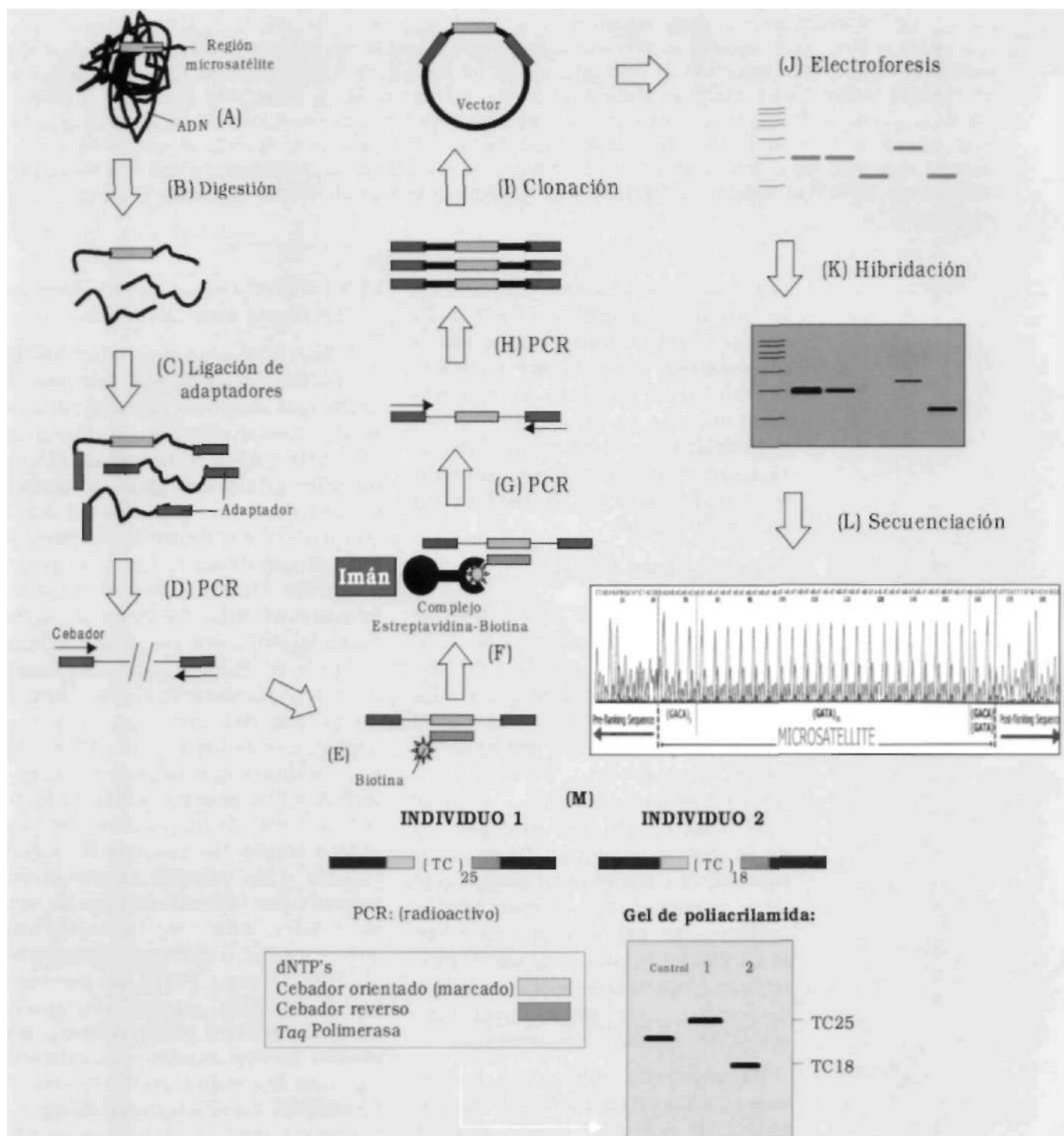


Figura 6

Metodología para la elaboración de bibliotecas genómicas enriquecidas en microsatélites (SSR) y detección de los mismos empleando PCR (Basado en Billotte et al. 1999). El ADN de un individuo contiene regiones de secuencias repetidas (A). El ADN es digerido con enzimas de restricción (B) y posteriormente es ligado a adaptadores de secuencia conocida (C). Los fragmentos de ADN digeridos y con adaptadores son amplificados por PCR empleando cebadores específicos que contienen parte de la secuencia de los adaptadores (D). Los productos de PCR (amplicones) son denaturados e hibridados con una sonda que contiene un oligonucleótido de secuencia repetida (E) asociado con una marca de biotina. La biotina se emplea como anzuelo para purificar las moléculas de ADN que contienen la secuencia de microsatélites, pues la biotina forma un complejo con la estreptavidina, la

cual a su vez está recubriendo micro-esferas magnéticas. Por lo tanto, la separación de las moléculas de ADN que contienen los microsatélites se lleva a cabo empleando un imán (F). Los fragmentos seleccionados son de nuevo amplificados por PCR (G y H) y posteriormente introducidos (clonados) en un vector (plásmido) (I). Los plásmidos que contienen el fragmento de ADN seleccionado son analizados mediante electroforesis (J) e hibridación (K) con una sonda que contiene la secuencia del microsatélite de interés. Una vez la identidad de los fragmentos es confirmada, los fragmentos son secuenciados, determinando así las secuencias que están en los extremos del microsatélite (L). Aunque la longitud de los microsatélites es variable, las secuencias de sus extremos son altamente conservadas. Por lo tanto, es posible detectar variaciones en el tamaño de los microsatélites mediante PCR empleando cebadores cuya secuencia es específica. La separación de los fragmentos se lleva a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (M).

Estas metodologías permitirán, en un futuro cercano, evaluar la similitud de las diferentes palmas analizadas y construir dendrogramas que facilitan la reconstrucción de la filogenia de las variedades comerciales, la caracterización molecular y el seguimiento de características de interés en palma de aceite.

Consideraciones finales

Las técnicas para detección de marcadores moleculares se han simplificado tanto que, hoy en día, es casi tan simple identificar una variedad de un cultivo como leer el código de barras de un producto en un supermercado. Esta nueva herramienta permite analizar muestras de interés que por su perfil genético pueden tener valor para ser introducidas a programas de mejoramiento. Los marcadores moleculares están llamados a ser la herramienta para acelerar el proceso de selección genética en palma de aceite y para participar en procesos de control y seguimiento.

Dentro de los proyectos a realizar con marcadores moleculares en palma de aceite se busca generar bases de datos relacionables, muy completas, que incluyan datos de características morfoagronómicas, planes de fertilización y marcadores moleculares. Con esta información se generarían matrices de identificación de materiales, lo que permitiría

una inequívoca y rápida selección de las variedades de interés.

Como se ve, las posibilidades de aplicación son enormes. Además, la teoría que sustenta cada técnica es relativamente sencilla. Las técnicas son diferentes y brindan información variada en cuanto a calidad y cantidad. La decisión de cuál técnica utilizar depende del propósito de la investigación y de la dirección sugerida por el mejoramiento genético tradicional. Además, dependiendo de la naturaleza de la característica de interés (cuantitativa o cualitativa), el tipo y forma de acción del gen (gen mayor o menor, efecto dominante o recesivo) y la facilidad con la cual la característica puede ser medida (detectable a través de inspección visual o sólo a través de análisis de laboratorio o de campo) la selección asistida por marcadores puede ser más adecuada que la selección convencional o viceversa (Morris et al. 2003; Young 1999). Es por esto que Cenipalma, en su Laboratorio de Marcadores Moleculares, ha venido incorporando y adaptando algunas de estas tecnologías como complemento al programa de mejoramiento genético (convencional). Es en la estrecha relación entre el fitomejoramiento convencional y las técnicas moleculares que se puede encontrar una ruta adecuada para el desarrollo de nuevos materiales de utilidad para el sector palmiticultor.

Agradecimientos

El autor expresa sus agradecimientos a la Dra. Esperanza Torres Rojas (Instituto Alexander von Humboldt), al Dr. Fernando Ángel (Cenicaña) y al Dr. Pedro León Gómez Cuervo (Cenipalma) por la valiosa crítica a este manuscrito. Esta publicación hace parte del

proyecto "Identificación de marcadores moleculares asociados con la Pudrición de Cogollo en palma de aceite" financiado por Cenipalma y el FONTAGRO, Convenio de Cooperación Técnica IICA-BID-FTG-5811999, FTG-0111999 y FTG-2411999. La investigación de Cenipalma es apoyada por el Fondo de Fomento Palmero.

Glosario

Alelo: Es la forma alternativa de una característica codificada por un gen particular. Por ejemplo, un gen puede codificar para la característica color de flor. Las alternativas (alelos) para esa característica (gen) pueden ser rojo o blanco. En este caso se habla de dos alelos para una característica.

Amplicón: Nombre técnico dado a los fragmentos de ADN generados en la reacción de PCR.

Cebador: Son secuencias de ADN de cadena sencilla que contienen entre 10 y 25 nucleótidos. Estos oligonucleótidos son empleados como iniciadores en las reacciones de PCR debido a que se unen a las regiones complementarias del ADN que están bordeando el fragmento de interés.

Electroforesis: Es una técnica de separación de moléculas de ADN o proteínas a través de una matriz (agarosa o poliacrilamida), debido a la aplicación de un campo eléctrico.

Enzimas de restricción: Son enzimas que tienen como función reconocer secuencias específicas de ADN y cortar a través de ellas. Estas enzimas son consideradas en biotecnología como tijeras moleculares que cortan al ADN de manera muy precisa en sitios con secuencias particulares.

Genoteca: Es la colección de genes de un individuo. Algunas veces llamado biblioteca (o

"librería") genética, las genotecas permiten tener acceso a todo el genoma de un organismo (biblioteca genómica) o a todos los genes que están siendo expresados en un tejido o estado particular del desarrollo de un individuo (bibliotecas de expresión).

Hibridación: Es un fenómeno que consiste en el reconocimiento de secuencias complementarias de ADN por parte de otro ADN o ARN.

Locus o Loci: Locus es la ubicación física de un alelo en el cromosoma. El plural de locus es loci.

Mapa Genético: Es la secuencia ordenada de los marcadores moleculares, morfológicos, bioquímicos y genes conocidos de una especie, así como las distancias que hay entre ellos. La secuencia ordenada de marcadores moleculares se conoce como mapa molecular. Los mapas genéticos difieren según la especie. Sin embargo, existe un alto grado de similitud entre algunas de ellas. Esto quiere decir que el orden en el que se encuentran los genes es muy parecido en ambas especies.

Polimorfismo: Es un término genérico que indica la presencia de variantes en un grupo dado de observaciones, unidades experimentales o medidas. En genética, polimorfismo implica la presencia de variantes hereditarias dentro del genoma en la forma de alelos, genotipos, nucleótidos, bandas o perfiles, haplotipos, etc.

Bibliografía

- ARIAS, D. 2003. Asistencia para la identificación de marcadores moleculares asociados con la resistencia al Complejo Pudrición de Cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Tunja. 82p. Tesis de pregrado.
- BARCELOS, E.; AMBLARD, P.; BERTHAUD, J.; SEGUIN, M. 2002. Genetic diversity and relationship in American and African oil palm as revealed by RFLP and AFLP molecular markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* (Brasília) v.37 no.8. p. 1105-1114.
- BARCELOS, E. 1998. Etude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* (Kunth) Cortés et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). Université Montpellier II, Francia. 137p. Tesis *PhD*.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RUSTERUCCI, A.M.; BAURENS F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* (Francia) v.54 no.4, p.277-288.
- BILLOTTE, N.; RUSTERUCCI, A-M.; BARCELOS, E.; NOYER, J.L.; AMBLARD, P.; BAURENS F.C. 2001a. Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) microsatellite markers. *Genome* (Canadá) v.44. p.413-425.
- BILLOTTE, N.; FRANCES, L.; AMBLARD, P.; DURAND-GASSELIN, T.; NOYER, J.L.; COURTOIS, B. 2001b. Search for AFLP and microsatellite molecular markers of the SH gene in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) by bulk segregant analysis (BSA) and by genetic mapping. 2001 PIPOC International Palm Oil Congress - Cutting-edge technologies for sustained competitiveness. Proceedings (Agriculture) (Malasia). p.442-445.
- CENIPALMA. 1996. Actividad: Identificación de marcadores RAPD asociados con la resistencia a Pudrición de Cogollo. *Ceniavances* (Colombia) No.68. p.1-4.
- CHUA, K.L.; SINGH, R.; CHEAH, S.C. 2001. Construction of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) linkage maps using AFLP markers. 2001 PIPOC International Palm Oil Congress - Cutting-edge technologies for sustained competitiveness. Proceeding (Agriculture). (Malasia) p.461-467.
- DREHER, K.; KHAIRALLAH, M.; RIBAUT, J.-M.; MORRIS, M. 2003. Money matters (I): costs of field and laboratory procedures associated with conventional and marker-assisted maize breeding at CIMMYT. *Molecular Breeding* (Holanda) v.11. p.221-234.
- FLAVELL, R.B.; TWELL, D. 1996. Plant genome constituents and their organisation. In: G.D. Foster; D. Twell (Eds.). *Plant Gene Isolation*. John Wiley & Sons, London.
- KARP, A.; EDWARDS, K.J. 1997. DNA markers: a global overview. In: Caetano-Anollés, G.; Gresshoff, P.M. (Eds.) *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Wiley-VCH. New York. p.1-13.
- KUIPER, H.A.; KLETER, G.A.; NOTEBOON, H.P.J.M.; KOK, E.J. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal* (Reino Unido) v.27 no.6. p.503-528.
- LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. 1993. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0: A tutorial and reference manual. Whitehead Institute.
- MAIZURA, I.; CHEAH, S.C.; RAJANAIDU, N. 2001. Genetic diversity of oil palm germplasm collections using RFLPs. 2001 PIPOC International Palm Oil Congress - Cutting-edge technologies for sustained competitiveness. Proceedings (Agriculture). (Malasia). p.526-535.
- MAYES, S.; JACK, P.L.; MARSHALL, D.F.; CORLEY, R.H.V. 1997. Construction of RFLP genetic linkage map for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* (Canadá) v.40. p. 116-122.
- MAYES, S.; JAMES, C.; PRICE, Z.; GROVES, C.M.; JACK, P.L.; CORLEY, R.H.V. 1996. The application of restriction fragment length polymorphism for the genetic fingerprinting of oil palm (*Elaeis guineensis*). *Molecular Breeding* (Holanda) v.2. p.175-180.
- MAZUR, B.J.; TINGEY, S.V. 1995. Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. *Current Opinion in Biotechnology* (Reino Unido) v.6. p.175-182.
- MOHAN, M.; NAIR, S.; BHAGWAT, A.; KRISHNA, T.G.; YANO, M.; BHATIA, C.R.; et al. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* (Holanda) v.3, p.87-103.
- MORRIS, M.; DREHER, K.; RIBAUT, J.M.; KHAIRALLAH, M. 2003. Money matters (II): costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection. *Molecular Breeding* (Holanda) v.11, p.235-247.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy Sciences*. (Estados Unidos) v.70 no. 12, p.3321-3323.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics* (Estados Unidos) v.89. p.583-590.
- NEI, M.; LI, W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy Sciences* (Estados Unidos) v.76. no. 10, p.5269-5273.

- OCHOA, I.E.; VILLEGAS, V.E.; BEEBE S.E. 1997. Identificación de marcadores moleculares RAPD asociados con la resistencia al Complejo de Pudrición de Cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Palmas (Colombia) v. 18 no.1, p.33-38.
- PURBA, A.R.; NOYER, J.L.; BAUDOUIN, L.; PERRIER, X.; HAMON, S.; LAGODA, P.J.L. 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. Theoretical Applied Genetics (Alemania) v. 101 p.956-961.
- RAJINDER, S.; CHEAH, S.C.; MADON, M.; OOI, L.C.L.; RAHIMAH, A.R. 2001. Genomic strategies for enhancing the value of the oil palm. 2001 PIPOC International Palm Oil Congress - Cutting-edge technologies for sustained competitiveness. Proceedings (Agriculture). (Malasia) p.3-17.
- RANADE, S.A.; FAROOQUI, N.; BHATTACHARYA, E.; VERMA, A. 2001. Gene tagging with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for molecular breeding in plants. Critical Reviews in Plant Sciences (Irlanda) v.20 no.3, p.251-275.
- REY, L.; OCHOA, I.; DELGADO, W.; ROCHA, P. 2003. Colecta de material genético de palma noli *Elaeis oleifera* [H.B.K.] Cortés en el Trapecio Amazónico. Ceniavances (Colombia) No.101. p.1-4.
- RIBAUT, J.M.; HOISINGTON, D.A. 1998. Marker-assisted selection: New tools and strategies. Trends in Plant Science (Holanda) v.3, p.236-239.
- ROCHA S., P.J. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Palmas (Colombia) v.23 no.3. p.9-17.
- RIVAL, A.; TREGAR, J.; MORCILLO, F.; ABERLENC, F.; BILLOTTE, N.; RICHAUD, F.; BEULE, T.; BORGEL, A.; DUVAL, Y. 2001. Oil palm biotechnology: progress and prospects. Oleagineux Corps Gras Lipides (Francia) v.8 no.4, p.295-306.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science (Estados Unidos) v.230. p.1350-1354.
- SAIKI, R.K.; GELFAN, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science (Estados Unidos) v.239. p.487-491.
- SHAH, F.H.; CHA, T.S. 2000. A mesocarp and species-specific cDNA clone from oil palm encodes for sesquiterpene synthase. Plant Science (Irlanda) v.154, p.153-160.
- SHAH, F.H.; RASHID, O.; SIMONS, A.J.; DUNDSON, A. 1994. The utility of RAPD markers for determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). Theoretical Applied Genetics (Alemania) v.89. p.713-718.
- SINGH, R.; CHEAH, S.C. 2000. Differential gene expression during flowering in the oil palm (*Elaeis guineensis*). Plant Cell Reports (Alemania) v.19, p.804-809.
- SINGH, R.; CHEAH, S.C. 1999. Analysis of the inheritance of AFLP markers in an interspecific cross of oil palm using the pseudo-testcross strategy. Journal of Palm Oil Research -Special Issue- (Malasia) p.64-73.
- SOUTHERN, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology (Holanda) v.98. p.503-517.
- STAM, P.; VAN OOIEN, J.W. 1995. JoinMap TM version 2.0: software for the calculation of genetic linkage maps. CPRO-DLO, Wageningen.
- TANKSLEY, 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 (Estados Unidos) v.7, p.257-264.
- VILLEGAS, V.E.; DURAN, C.; BEEBE, S. 2000. Caracterización molecular de materiales Dura. Palmas (Colombia) v.21. no. Especial. Tomo I, p.35-40.
- VILLEGAS, V.E.; GÓMEZ, P.L. 1998. Construcción de mapas genéticos. Ceniavances (Colombia) no. 54. p.1-4.
- VILLEGAS, V.E. 2000. Mejoramiento vegetal mediante selección asistida por marcadores. Ceniavances (Colombia) No.68. p.1-4.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research (Reino Unido) v.23 no.21. p. 4407-4414.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. 1990. DNAPolymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research (Reino Unido) v.18. no.22. p.6531-6535.
- YOUNG, N.D. 1999. A cautiously optimistic vision for marker assisted breeding. Molecular Breeding (Holanda) v.5, p.505-510.