

OBTENCIÓN DE HUELLA GENÉTICA POR AFLP EN *Capsicum annuum* L.

Laura Angélica Díaz Martínez¹
Dr. Octavio Martínez de la Vega²
Ing. Stephanie Gwizdak²
Biól. Fernando Hernández Godínez²

RESUMEN

Como parte de un proyecto de cartografía de loci con efectos cuantitativos (QTLs) en chile (*Capsicum annuum* L.), se obtuvieron huellas genéticas por marcadores moleculares de DNA (AFLPs) de 130 individuos F_2 de una cruce de dos variedades contrastantes de chile, así como de los progenitores y F_1 . Los objetivos de este trabajo fueron detectar bandas polimórficas entre los progenitores, cuantificar el grado de polimorfismo y analizar la segregación de las bandas polimórficas en la descendencia. Se obtuvieron seis autorradiogramas de geles de poliácridamida resultado de probar dos combinaciones de oligonucleótidos selectivos, conteniendo más de 350 fragmentos de DNA marcados radioactivamente.

INTRODUCCIÓN

La cartografía de loci con efectos sobre caracteres cuantitativos (QTLs) utilizando marcadores moleculares de DNA, es una técnica que permite estimar el número, tamaño de efecto y posiciones de genes que determinan caracteres continuos en plantas y animales (Paterson y col, 1988), además es pieza clave para resolver problemas en campos como la ecología, biología evolutiva y la taxonomía. Como primer paso para la cartografía de QTLs es necesario obtener la huella

genética de los progenitores y descendencia de cruces entre variedades contrastantes. La metodología básica para el mapeo de QTLs implica una cruce entre dos razas que difieran sustancialmente en un carácter cuantitativo, la progenie segregante, producida generalmente por retrocruza B_1 (F_1 x progenitor) o intercruza F_2 (F_1 x F_1), es examinada tanto fenotípicamente para el carácter en cuestión, como por mapeo de marcadores genéticos (Lander y Botstein, 1989).

El mapeo de marcadores genéticos implica el ordenamiento de un juego de fragmentos de DNA provenientes de una muestra de DNA específica. Idealmente una técnica de mapeo de marcadores genéticos no requiere un análisis de secuencia, síntesis de primers o caracterización de DNA previos, algunos métodos que cumplen con estas condiciones son: RAPD (random amplified polymorphic DNA), DAF (DNA amplification fingerprinting), AP-PCR (arbitrarily primed PCR) y AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos y col, 1995).

Además de lo anterior, los marcadores moleculares de DNA se utilizan a nivel poblacional para el estudio de la diversidad genética en colecciones de germoplasma (Karp y Edwards, 1997).

La técnica de AFLP es una poderosa metodología, concebida originalmente para permitir la construcción de mapas de marcadores genéticos de muy alta densidad para su aplicación en la investigación del genoma y la clonación posicional de genes (Vos y Kuiper, 1997). Esta parece ser una técnica consistente para el análisis de la diversidad genética en distintas especies

¹ Estudiante del 6o. Semestre de Análisis Químico Biológicos. Centro de Ciencias Básicas. UAA.

² Profesor-investigador del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Irapuato.

* Este trabajo fue realizado durante la estancia del Verano Regional de la Ciencia.

vegetales (Paran y col, 1998), (van Eck y col, 1995), (Maughan y col, 1996), además de que tiene una muy alta reproducibilidad (Janssen y col, 1996) y una mayor efectividad en la detección de polimorfismo en Chile (Paran y col, 1998).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la detección de QTLs se seleccionaron dos materiales altamente contrastantes de la especie *Capsicum annuum*: La variedad «Tobi», un Chile pequeño, semi-silvestre y extremadamente pungente y la accesión PI 592835 «Yolo Wonder», una variedad mejorada, de fruto grande y dulce, donada por el banco de germoplasma de GRIN (Germoplasm Resources Information Network) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América. Se les caracterizó fenotípicamente, y se realizaron las cruces y autofecundaciones pertinentes, encontrándose en este momento en evaluación una población segregante de 250 individuos F_2 .

Caracterización molecular

Se obtuvo el DNA de cada uno de los individuos a caracterizar de acuerdo a la siguiente técnica: se molió suficiente tejido vegetal (2 o 3 hojas de aproximadamente 3 cm de largo) en presencia de nitrógeno líquido, se añadieron 750 μ L de buffer de lisis (7.0M urea, 0.35M NaCl, 0.05M Tris-HCl pH 8.0, 0.02M EDTA, 1% N-Lauroilsarcocina) y se homogeneizó. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y se agitó. Se centrifugó a 14000g por 20 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se le añadieron 10 μ L de RNasa (10mg/mL en 10mM Tris-HCl pH 7.5, 15 mM NaCl), se mezcló por inversión, se incubó a 37°C y se colocó en hielo. Se añadió un volumen de isopropanol (-20°C) en forma violenta, agitando por inversión. Se retiró el líquido de forma que sólo quedó el DNA precipitado. Se lavó dos veces con 500 μ L de etanol al 70%. Se lavó con etanol absoluto y secó a temperatura ambiente por 30 min o en termoblock a 45°C por 15 minutos. Se disolvió el DNA en 50 μ L de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0).

El DNA obtenido se procesó de acuerdo al protocolo AFLP descrito por Vos y colaboradores (1995) con modificaciones mínimas. Una breve descripción del protocolo se muestra a continuación:

I Digestión con enzimas de restricción

Se incubaron 0.5 μ g de DNA genómico por 4 h a 37°C con la mezcla de digestión (5 U EcoRI, 5 U MseI, en 40 μ L 10mM Tris-HAc pH 7.5, 10mM MgAc, 50 mM KAc, 5 mM DTT, 50 ng/ μ L BSA). Se inactivó la enzima a 70°C por 15 minutos.

II Ligación de adaptadores

Se adicionaron 10 mL de mezcla de ligación (5pM EcoRI-adaptadores, 50pM MseI-adaptadores, 1 U T4 DNA-ligasa, 1mM ATP en 10mM Tris-Ac pH 7.5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 5 mM DTT, 50 ng/ μ L BSA) y se incubó a 15°C durante toda la noche, se diluyó a 500 μ L con 10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0 y se almacenó a -20°C.

III Primera amplificación (Preamplificación)

Se tomaron 5 μ L de DNA ligado y se le adicionaron 25 μ L de mezcla 1 (PrimerEcoRI+1, MseI+1, dNTPs 50 ng/ μ L) y 20 μ L de mezcla 2 (Taq-polimerasa 5 U/ μ L, buffer para PCR). Se corrió el siguiente programa: 30 segundos a 94°C para desnaturalizar, 60 segundos a 56°C para alineamiento, 60 segundos a 72°C para extensión, se repitió durante 20 ciclos.

IV Segunda amplificación

Se tomaron 5 μ L de DNA preamplificado y se le agregaron 5 μ L de mezcla 1 (Primer MseI+3, Primer EcoRI+3 marcado con γ -³²P, dNTPs 50 ng/ μ L) y 10 μ L de mezcla 2 (taq-polimerasa 5 U/ μ L, buffer para PCR). Se corrió el siguiente programa: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 60 segundos a 72°C, se hicieron 11 ciclos, bajando la temperatura de alineamiento 0.7° cada ciclo, cuando llegó a 56°C, se repitieron 24 ciclos sin bajar, y luego se dejó a 4°C.

V Despliegue diferencial

Se tomó el DNA marcado y se le agregaron 20 μ L de buffer de carga (xilen-cianol, azul de bromofenol al 2% en formamida), se colocaron 5 μ L de cada muestra en un gel de acrilamida al 6% y se corrió a voltaje constante (2000V, 2.5 horas).

Análisis de datos

Se leyeron los autorradiogramas, asignando 1 a bandas presentes y 0 a bandas ausentes, y se capturó

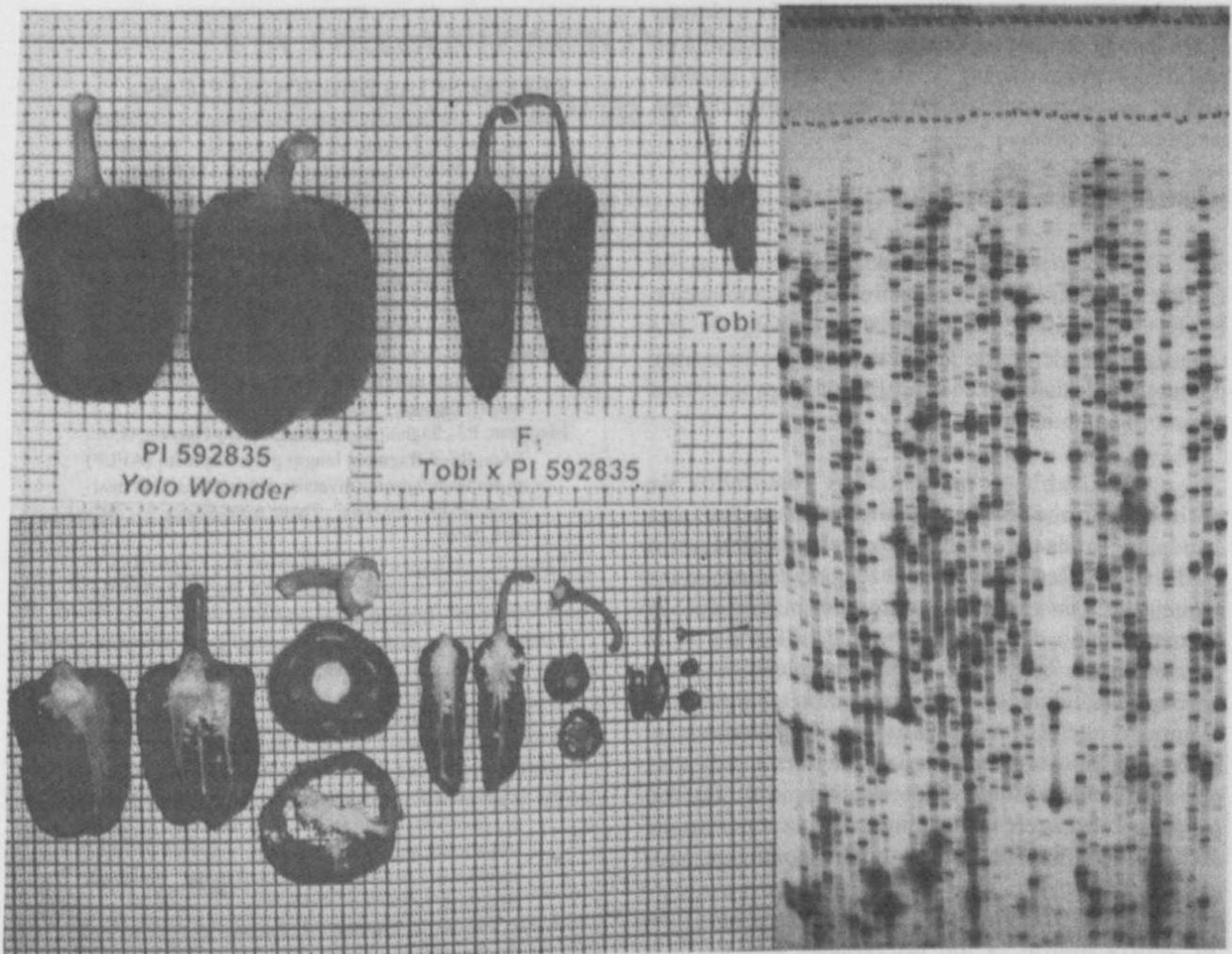


Figura 1. Comparación entre los frutos de las plantas progenitoras y autorradiograma de AFLPs de progenie.

Tabla 1 – Resultados del análisis de polimorfismo entre los progenitores

Combinación	Número de bandas (bandas efectivas)	% Bandas polimórficas ± error estándar
EcoRI+ACG/MseI+CAG (1 ^a)	88 (54)	31.48 ± 0.40
EcoRI+ACG/MseI+CAG (2 ^a)	92 (52)	26.92 ± 0.38
EcoRI+AGT/MseI+CGA	151 (112)	13.39 ± 0.10

en un archivo de computadora, procediendo a obtener el porcentaje de bandas polimórficas (presentes sólo en uno de los progenitores). Se obtuvo el error estándar para el porcentaje de polimorfismo, asumiendo una distribución binomial.

RESULTADOS

Se corrieron seis geles, dos con la combinación EcoRI+ACG/MseI+CAG, y cuatro con la combinación EcoRI+AGT/ MseI+CGA, sumando un total de 263 muestras procedentes de 130 individuos, de los cuales, por motivos de tiempo sólo se analizaron los progenitores en ambas combinaciones.

La Tabla 1 presenta los resultados de polimorfismo entre progenitores para las dos combinaciones realizadas. La combinación EcoRI+ACG/MseI+CAG se realizó por duplicado en los progenitores en carriles distintos del mismo gel. El primer renglón de la tabla presenta la lectura de la primera repetición (1ª), y el segundo renglón la segunda repetición (2ª). La segunda columna de la tabla presenta el número total de bandas leídas y, entre paréntesis, el número de bandas efectivas que pudieron ser utilizadas por no existir datos perdidos en ninguno de los dos progenitores. La tercera columna presenta el porcentaje de bandas polimórficas con su correspondiente error estándar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. y Kresters, K., "Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy", *Microbiology*, 142, 1881-1893, 1996.

Karp, A. y Edwards, K.J., "DNA markers: a global overview", *DNA markers. Protocols, applications and overviews*, edited by Caetano-anollés, G. y Gresshoff P.M., Wiley-VCH, New York, 1997.

Lander, E.S. y Botstein, D., "Mapping Mendelian factor underlying quantitative traits using RFLP linkage maps", *Genetics*, 121, 185-199, 1989.

Maughan, P.J., Saghai, M.A., Buss, G.R. y Huestis, G.M., "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis", *Theor Appl Genet*, 93, 392-401, 1996.

Paran, I., Aftergoot, E. y Shifriss, C., "Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers", *Euphytica*, 99, 167-173, 1998.

Paterson, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E. y Tanksley, S.D., "Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms", *Nature*, 335(20), 721-726, 1988.

van Eck, H.J., van der Voort, J.R., Draaistra, J., van Zandvoort, P., van Enckevort, E., Segers, B., Peleman, J., Jacobsen, E., Helder, J. y Bakker, J., "The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring" *Molecular Breeding*, 1, 397-410, 1995.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M., "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting", *Nucl Acid Res*, 23(21), 4407-4414, 1995.

Vos, P. y Kuiper, M., "AFLP analysis", *DNA markers. Protocols, applications and overviews*, edited by Caetano-anollés, G. y Gresshoff P.M., Wiley-VCH, New York, 1997.

Tabla 1 - Resultados del análisis de polimorfismo entre los progenitores de los individuos de la población de estudio.

Combinación	Repetición	Número total de bandas leídas (entre paréntesis, número de bandas efectivas)	Porcentaje de bandas polimórficas (error estándar)
EcoRI+ACG/MseI+CAG	1ª	10 (8)	20% (5.5%)
	2ª	10 (8)	20% (5.5%)
EcoRI+AGT/MseI+CGA	1ª	10 (8)	20% (5.5%)
	2ª	10 (8)	20% (5.5%)