

# MISCELÁNEA

## USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA<sup>1</sup>

### Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies

Viviana Becerra V.<sup>2</sup> y Mario Paredes C.<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

In the past decade there has been a remarkable increase in the use of genetic markers to characterize genetic diversity in different species. Some of these genetic markers have a different molecular basis, but all of them are focused to understand the organization of genetic structure of natural and cultivated populations. In addition, these markers have been used to determine the genetic similarity among and within populations avoiding environmental influence. Knowing the similarity between individuals and populations is of great utility in genetic improvement programs, because it allows the organization of material for the adequate selection of superior genotypes and the completion with phenotypic and agronomic data for the development of improved populations. This paper reviews the background of these markers based on their methodologies, and discusses their principal advantages and disadvantages.

**Key words:** biotechnology, genetic diversity, polymorphism.

#### INTRODUCCIÓN

La conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad. Las regiones centro y sud americana son consideradas como los centros de mayor diversidad biológica del mundo; de hecho varias especies de importancia agrícola, agroindustrial, medicinal y farmacológica se han originado en estas regiones.

Desde siempre, las diferentes especies vegetales han estado sometidas a una activa interacción con el medio ambiente, lo cual ha generado un gran número de genotipos adaptados a diferentes

condiciones locales, ampliando la diversidad genética. Sin embargo, en las últimas décadas esta diversidad genética se ha visto severamente reducida por las exigencias del mercado y la disminución de los suelos cultivados. Ante esta situación, uno de los desafíos actuales es buscar la manera de incentivar la conservación y uso racional de los recursos genéticos.

Actualmente existe un gran número de colecciones de germoplasma que contienen genotipos con un alto valor agronómico, susceptible de ser usado en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, en muchas ocasiones el conocimiento de la organización genética y la relación existente entre el material disponible es escaso, lo que impide su utilización en fitomejoramiento. Inclusive dentro de estas colecciones existen materiales ingresados como accesiones diferentes que resultan ser duplicaciones

<sup>1</sup>Recepción de originales: 19 de mayo de 1999.

<sup>2</sup>Instituto de investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. E-mail: vbecerra@quilamapu.inia.cl.

del mismo material, lo cual conlleva a una sobreestimación de la diversidad existente.

Históricamente, los estudios relacionados con diversidad genética en plantas han estado relacionados con datos arqueológicos, botánicos, lingüísticos, históricos y morfológicos. Vale decir, desde el punto de vista agronómico y comercial, la caracterización del germoplasma se ha basado fundamentalmente en características de alta y de baja heredabilidad, medidas a través del fenotipo. Sin embargo, las principales limitantes de esta caracterización son la influencia ambiental, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el reducido número de genes involucrados en este proceso.

En la década de los 50 la electroforesis comenzó a ser utilizada en estudios de diversidad genética. Básicamente la electroforesis es una técnica que separa moléculas por su movilidad diferencial a través de un solvente en un campo eléctrico.

Actualmente, los avances en biología molecular han incorporado nuevos marcadores, de naturaleza molecular y de mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo de los individuos, situación que ha permitido grandes avances en este tipo de estudios.

Los objetivos del presente artículo son describir las principales técnicas bioquímicas y moleculares usadas en estudios de diversidad genética, y analizar sus principales ventajas y desventajas.

## I. MARCADORES BIOQUÍMICOS

### a) Proteínas de reserva en semilla

En la actualidad existen diversos métodos analíticos para el estudio de las proteínas de reserva tales como: centrifugación, cromatografía, análisis de amino ácidos y electroforesis. A su vez, la electroforesis ha sido desarrollada en geles de almidón de una dimensión, en geles de poliacrilamida con o sin Sodium Dodecil Sulfate

(PAGE), punto isoeléctrico (IEF) y poliacrilamida de dos dimensiones. Entre estas formas, la de mayor uso en estudios de diversidad ha sido la electroforesis en poliacrilamida vertical (PAGE-SDS) por presentar una buena resolución de las proteínas.

El uso de proteínas de almacenamiento en sistemática y diversidad genética se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Debido a que las proteínas de reserva carecen de actividad enzimática, ellas son detectadas en el gel por medio de técnicas generales de tinte.

Estudios genéticos han demostrado que los patrones de bandas de las proteínas de reserva son heredados como características discretas y en forma codominante, observándose en algunos casos un efecto maternal (Leonard *et al.*, 1988). El número de genes que controlan estas características es reducido y varía de acuerdo a la especie (Gepts, 1990). Como marcador bioquímico las proteínas de reserva tienen una baja influencia ambiental, aunque se han reportado algunas excepciones (Gayler y Sykes, 1985) además, permite un análisis rápido de decenas de muestras por ser un método simple y de bajo costo comparado con otras técnicas.

Sin embargo, los distintos patrones electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que puede incluir sustituciones, inserciones y pérdidas nucleotídicas. También las diferencias pueden ser causadas por modificaciones pre y post transcripción y/o traducción. Hasta ahora ha sido difícil relacionar los cambios fenotípicos de los patrones de bandas con el tipo de cambio a nivel molecular. Por otro lado, la cantidad de diversidad genética mediante polimorfismo proteico puede ser subestimada por la no detección de mutaciones silenciosas.

El polimorfismo de las proteínas de reserva en semillas ha sido utilizado para identificar y dis-

tinguir genotipos cultivados y silvestres en numerosas especies, tales como: frejoles (*Phaseolus vulgaris*) (Gepts y Bliss, 1986), trigo (*Triticum aestivum*) (Meachman *et al.*, 1978), cebada (*Hordeum vulgare*) (Nebo *et al.*, 1983), arveja (*Pisum sativum*) (Casey *et al.*, 1986) y maíz (*Zeamays*) (Wilson, 1985). En algunas especies, como es el caso del frejol, esta técnica fue tan eficaz que mediante el estudio de un *locus* fue posible determinar por primera vez la organización de la diversidad genética de la especie (Gepts, 1990), situación que ha sido comprobada más tarde con el uso de isoenzimas y Fragmentos de Restricción polimórficos (RFLP) (Koenig y Gepts, 1989; Becerra y Gepts, 1994).

### b) Isoenzimas

Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70, el uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se demostró dentro de un organismo la existencia de las isoenzimas, formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza, debido a un cambio de movilidad electroforética. Esta sensibilidad electroforética hizo que la técnica haya revolucionado los estudios de diversidad genética en diversas especies.

Para estos estudios se han utilizado varias estructuras de la planta, tales como hojas, raíces o botones florales, de las cuales se obtiene un extracto crudo proteico. La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón, PAGE) bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un teñido histoquímico. La separación se realiza mediante la carga eléctrica neta, peso molecular, punto isoeléctrico y/o combinación de estos criterios (separación multidimensional). De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alelos de un mismo gen.

Las principales características de las isoenzimas incluyen la simplicidad, mínima cantidad del material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 *loci* por especie, ausencia de epistasis e influencias ambientales. La expresión alélica es de tipo codominante, lo que permite establecer comparaciones entre especies, poblaciones de una misma especie, y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Paredes y Gepts, 1995).

Entre sus desventajas se incluye un nivel bajo de polimorfismo al presentar pocos alelos por *locus*, especialmente cuando la base genética es estrecha. Por ejemplo, en lechuga (*Lactuca* sp.) el número de polimorfismos fue tan bajo que no permitió diferenciar entre cultivares (Kesseli *et al.*, 1991). Otro aspecto a considerar es que las proteínas, siendo un producto del ADN, pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales. Para aumentar la eficiencia de la técnica ante este factor, deben ser identificados los estados de desarrollo de la planta durante los cuales la proteína es estable. Además, al igual que con las proteínas de reserva, las isoenzimas pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN, además sólo un set de genes estructurales están representados en estas proteínas, vale decir, sólo parte del genoma se puede evaluar.

Las isoenzimas han sido usadas a menudo para investigar problemas de sistemática, evolución o para medir los niveles de variación genética entre y dentro de las poblaciones (Paredes y Gepts, 1995), en la identificación de cultivares (Arulsekhar *et al.*, 1985). Varios estudios de diversidad genética se han realizado en diferentes especies de cultivos anuales y perennes, tales como lentejas (*Lens culinaris*) (Rodríguez *et al.*, 1999), frejoles (*P. vulgaris*) (Paredes y Gepts, 1995), nogal (*Junglans regia*) (Arulzekar *et al.*, 1985) y vid (*Vitis* sp.) (Arulsekhar y Parfitt, 1986).

## II. MARCADORES MOLECULARES

El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros.

### a) Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP)

Los RFLPs permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del ADN (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas (Wang *et al.*, 1992). Las principales ventajas de los RFLPs radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta.

La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce cantidades equimolares de fragmentos para una molécula de ADN dada. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda.

Básicamente, los RFLPs son causados por arreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con la sonda seleccionada.

Los RFLPs se heredan en forma Mendeliana simple, y si la sonda empleada representa una copia única, ella es considerada como un *locus* y las variaciones en patrones son analizados como alelos (bialélicos o multialélicos) (Doebly y Wendel, 1989). La expresión de estos marcadores es codominante, vale decir, todas las formas alélicas del gen son distinguibles, permitiendo detectar los híbridos y estudiar el flujo de genes entre poblaciones. El nivel de polimorfismo que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio.

Dentro de las principales desventajas de los RFLP están la clonación de las sondas, detección de RFLP en las membranas y el uso de radioactividad; tareas consideradas laboriosas, lentas y caras. Aunque últimamente, el desarrollo de la técnica no-radioactiva ha simplificado esta metodología (Foolad *et al.*, 1995).

El uso de los RFLP en plantas representa una buena alternativa para realizar diversos estudios relacionados con los tres genomas que existen en ellas, el nuclear (ADN<sub>n</sub>), mitocondrial (ADN<sub>mt</sub>) y el de cloroplasto (ADN<sub>cp</sub>). La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética (Becerra y Gepts, 1994) e identificación de cultivares con propósitos de protección varietal.

El uso de uno u otro genoma dependerá de los propósitos del estudio. El ADN nuclear ha sido mayormente usado para estudios de diversidad

genética de individuos emparentados por su mayor tasa de mutación en comparación al ADN mitocondrial y el de cloroplasto.

Es así como el ADNmt ha sido usado mayormente en estudios de filogenia en animales. En plantas, el uso de este genoma en estudios filogenéticos es discutido debido a la presencia de rearrreglos del ADN y a la detección de ADN foráneo dentro de sus secuencias nucleotídicas (Palmer, 1992). Sin embargo, en maíz este ADN ha sido usado, detectándose una variabilidad considerable (Weissinger *et al.*, 1983). Debido a su alta tasa de rearrreglos este organelo pareciera ser más útil que el uso del cloroplasto para estudiar diversidad en las especies.

Por otro lado, se ha detectado diversidad de ADNcp entre especies, por lo que el uso de este organelo es importante en estudios de filogenia (Palmer *et al.*, 1983). Durante la evolución del cloroplasto han ocurrido considerables sustituciones de bases, lo que ha producido cambios en los sitios de restricción, en lugar de rearrreglos dentro del genoma como ha ocurrido con las mitocondrias. Dentro de las especies el ADNcp ha sido usado principalmente para comparar entre genotipos cultivados y silvestres. En algunos casos, el uso de este ADN ha sido bastante exitoso, como es el caso de la cebada (*Hordeum vulgare*) (Clegg *et al.*, 1984), maíz (*Zea mays*) (Doebley, 1992) y cebolla (*Allium sativum*) (Havey, 1991). Sin embargo, en otras especies no ha sido eficiente, como es en el caso del sorgo (*Sorghum* sp.).

#### **b) Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)**

Recientemente, se ha desarrollado una serie de técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (White *et al.*, 1989). El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando un partidor, ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y *Taq* ADN polimerasa. Esta reac-

ción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde. Estos productos son polimórficos cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (ADN genómico).

A partir del PCR se han generado una serie de técnicas, tales como la de Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificado al Azar (RAPD). Esta técnica usa partidores aleatorios de 10 mers (Williams *et al.*, 1990) para amplificar el ADN. Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis, y las bandas visualizadas de diferente peso molecular representan diferentes *loci*. En algunas especies, la técnica da la opción de usar dos o más partidores dentro de la misma reacción para aumentar el número de bandas, logrando una mayor cantidad de información por reacción.

Los productos de la reacción dependerán del genoma en estudio, del partidor y de las condiciones de la reacción. Los resultados de RAPD obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 *loci* por partidor), su tremenda potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas.

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo, como desventaja aparece la inconsistencia de los datos. Diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación, pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos

de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes.

La técnica del PCR también ha sido ampliamente usada para estudiar diversidad genética de cultivares y su relación con sus ancestros silvestres (Demeke *et al.*, 1992; Vierling y Nguyen, 1992; Sharma *et al.*, 1995).

### c) Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP)

Recientemente otra técnica basada en el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido desarrollada (Vos *et al.*, 1995). En esta técnica se combinan los principios de los RFLP y PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN bajo estudio son amplificados selectivamente en cascada. Los AFLPs usan como partidores oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN digerido. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos y son normalmente, al igual que RAPD, de herencia dominante.

Con esta técnica se puede detectar una variación considerable del genoma, lo cual se refleja en el número de productos amplificados con una sola combinación de partidores. La eficiencia en detectar polimorfismo puede ser varias veces mayor que la obtenida con RAPD y RFLP. Esta metodología ha sido ampliamente usada en diversas especies para medir diversidad genética, tales como: lechuga (*Lactuca sativa*) (Hill *et al.*, 1996) y lenteja (*Lens culinaris*) (Sharma *et al.*, 1996) entre otras. En el futuro esta técnica tendrá una gran utilización en la saturación de mapas genómicos y en la identificación de fragmentos ligados a genes de interés comercial (Colwin *et al.*, 1995).

El procedimiento comienza con la digestión del ADN genómico de los individuos con enzimas de restricción que reconocen 4 y 6 bases de reconocimiento, lo cual genera fragmentos de tamaño preferentemente pequeño. Luego se

ligan adaptadores de secuencia conocida a cada extremo y para el proceso de amplificación se usan partidores complementarios a estos adaptadores, manteniendo el sitio de restricción más un cierto número de nucleótidos (3 generalmente) que deben agregarse al extremo 3'. Finalmente, el proceso implica dos alternativas de detección de las bandas, la primera es la marcación radioactiva de los productos amplificados en la última etapa de amplificación, su separación en geles de poliacrilamida, secado del gel y su visualización en autoradiografías. La segunda alternativa usa la tinción directa del gel con nitrato de plata. Los resultados entre ambas alternativas son comparables, siendo esta última de menor costo y fácil aplicación. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que en una sola reacción se puede identificar alrededor de 50 *loci* en un tiempo corto (Tohme *et al.*, 1996).

Se han realizado comparaciones de los diversos marcadores utilizados a medida que se han ido desarrollando. Por ejemplo: al comparar resultados de este marcador con RFLPs y otros marcadores en lechuga (*Lactuca sativa*) (Hill *et al.*, 1996) los genotipos fueron agrupados en forma similar. En soya (*Glycine max*) los AFLPs detectaron alrededor de 12 veces el número de *loci* polimórficos (Voguel *et al.*, 1994) comparados con RAPDs. Es así como en el caso puntual de estudios de diversidad genética del frejol, la técnica de AFLP detectó una diversidad de 0,31 (1 = igualdad genética) entre genotipos silvestres y cultivados (Tohme *et al.*, 1996), mayor a la detectada por isoenzimas en los mismos genotipos (Singh *et al.*, 1991). Sin embargo, los resultados de diversidad genética obtenidos fueron similares con los AFLP y RFLP.

Una de las desventajas para la interpretación de los datos es el tiempo necesario para el análisis cuando se realiza en forma no automatizada (visual). Por otro lado, los *loci* de AFLP son tan reproducibles como los RFLPs, pues son prácticamente insensibles a las condiciones de la reacción (Tohme *et al.*, 1996), aunque ambas técnicas requieren de una buena calidad de

ADN para el proceso de digestión con enzimas de restricción. Comparativamente, estas dos técnicas son de mayor precisión que los RAPDs, susceptibles a una falta de estandarización del proceso de amplificación.

#### d) Minisatélites y Microsatélites

Las secuencias de ADN de mini (VNTR) y microsatélites (SSR) son dos categorías de secuencias repetidas que se presentan en eucariotes. Ellas se encuentran repetidas en tandem y dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. A través del uso de estos marcadores se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas, y microorganismos.

Dentro de la primera categoría, los minisatélites son usados como sondas de secuencias simples repetidas. Las secuencias repetidas de estos minisatélites son monómeros que generalmente tienen 15-35 pares de bases, y han sido aislados de mamíferos, plantas y del genoma del bacteriófago M13. Una combinación de una enzima de restricción con la sonda de M13 puede generar un alto número de bandas, lo cual produce una gran información, comparada con los RFLPs. Al igual que éstos, la técnica es de alta reproducibilidad, aunque requiere de un proceso de clonación previo de la sonda hipervariable, además de un ADN de alta calidad para el proceso de restricción y transferencia (Southern blot), e hibridación con la sonda, generalmente marcada radioactivamente, y finalmente de la exposición a una película de rayos X. Actualmente este polimorfismo puede ser detectado mediante PCR, mediante el uso de partidores que reconocen secuencias externas que rodean a las secuencias repetidas (Heat *et al.*, 1993). Este polimorfismo identifica un *locus* que resulta ser multi-alelico debido a un elevado número de unidades repetidas, que corresponden a muchos alelos.

Los minisatélites han sido usados para estudiar diversidad genética y realizar la identificación

de individuos ("fingerprinting") en diversas especies (Stockton *et al.*, 1990; Ramakrishna *et al.*, 1995).

La segunda categoría de secuencias repetidas son los microsatélites; ellos son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas en tandem y existen en forma abundante en plantas (Condit y Hubbell, 1991). Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. El uso de microsatélites ha ido aumentando mediante la producción de bibliotecas de partidores y la secuenciación automática fluorescente que permiten el diseño de los partidores que rodean los microsatélites (Brondani *et al.*, 1998). Los fragmentos generados son separados en geles denaturantes de poliacrilamida y visualizados radioactivamente o por tinción con nitrato de plata.

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad. El alto nivel de polimorfismo que detecta permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicas y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas.

En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que éstos son más variables que isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Por ejemplo, en *Cucumis*, 29 isoenzimas no mostraron polimorfismo entre dos genotipos comerciales (Perl-Treves *et al.*, 1985). Dentro del mismo género RAPD detectó un 38% de polimorfismo, mientras que los microsatélites detectaron un 71%, e incluso detectaron diferencias genéticas entre cultivares altamente emparentados que mediante otras técnicas no habían podido ser distinguidos

(Katzir *et al.*, 1996). Es así como se ha comprobado, en diversas especies, la complementariedad de todas las técnicas mencionadas anteriormente en el estudio global de la organización genética del germoplasma.

Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada partidador, sin embargo, existe la posibilidad de usar los mismos partidores en más de una especie. Esto es debido, a que existe un grado de conservación de los microsatélites entre genomas de especies tan distantes como son algunos mamíferos, plantas anuales y perennes. Esto no es generalizado en todas las especies, puesto que al comparar entre cereales de grano pequeño como trigo, cebada y centeno, se ha detectado una limitada conservación de las secuencias microsatelitales.

Los microsatélites han sido también utilizados para medir diversidad genética de diversas especies anuales como: soya (*Glycine max*) (Akkaya *et al.*, 1992), arroz (*Oryza sativa*) (Wu y Tanksley, 1993), maíz (*Zea mays*) (Senior y Heun, 1995), cebada (*Hordeum vulgare*) (Becker y Heun, 1995), trigo (*Triticum aestivum*) (Röder *et al.*, 1995) y raps (*Brassica sp.*) (Lagercrantz *et al.*, 1993).

Hasta ahora también se han desarrollado microsatélites en especies perennes, aunque el número de ellos ha sido escaso (Brondani *et al.*, 1998). En el caso de *Eucalyptus* los microsatélites han sido transferidos entre poblaciones y especies del mismo género. En forma adicional, la estimación de heterocigosidad que este marcador pueden entregar presenta una gran ventaja en el mapeo de características cuantitativas (QTLs), comparación de mapas que incluyen QTL y estudios de flujo genético en árboles.

Aunque el uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de germoplasma y diversidad genética es limitado por el costo de los reactivos, y en algunos casos por el elevado costo de los equipos, los avances técnicos que estas tecnologías han alcanzado en los últimos años, los hacen más accesibles a los genetistas y a los programas de mejoramiento. Ambos tipos de análisis son complementarios en la caracterización morfológica y agronómica del germoplasma y en el entendimiento de la diversidad y estructura genética de las poblaciones, especies y taxas.

La elección del marcador a usar dependerá de los objetivos del estudio, del costo y de las características que cada uno de ellos presentan (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Características generales de los marcadores genéticos**

**Table 1. General characteristics of genetic markers**

Característica	Proteínas	Isoenzima	RFLP	RAPD	VNTR	AFLP	SSR
Polimorfismo	Alto	Bajo	Bajo-alto	Medio-alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto
Estabilidad ambiental	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de loci	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Reproducibilidad	Alta	Moderada-alta	Alta	Moderada-alta	Alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida-barata	Rápida-barata	Lenta-cara	Rápida-cara	Intermedia	Lenta-cara	Lenta-cara

RFLP: Fragmentos de restricción polimórficos. RAPD: Amplificación de ADN al azar. VNTR: Número variable de repeticiones en tandem. AFLP: Amplificación de fragmentos polimórficos. SSR: Secuencias simples repetidas.

## RESUMEN

En las últimas décadas ha habido un notorio aumento en los marcadores genéticos disponibles para estudios de diversidad genética. Algunos de ellos tienen diferentes bases moleculares, pero todos están enfocados a determinar la organización de la estructura genética en las poblaciones naturales y cultivadas. Además, ellos muestran la similitud entre y dentro de las poblaciones evitando el efecto ambiental. Conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de me-

joramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de los genotipos superiores y la complementación con datos fenotípicos y agronómicos para el desarrollo de una población mejorada. Este artículo revisa algunos antecedentes de estos marcadores basados en su metodología, ventajas y desventajas de su uso.

**Palabras claves:** biotecnología, diversidad genética, polimorfismo.

## LITERATURA CITADA

- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A. AND CREGAN, P. B. 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132: 1131-1139.
- ARULSEKAR, S.; PARFITT, D. E. AND MCGRANAHAN, G. 1985. Isozyme gene markers in *Junglans* species: Inheritance of GPI and AAT in *J. regia* and *J. hindsii*. *The Journal of Heredity* 76: 103-106.
- ARULSEKAR, S. AND PARFITT, D. E. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, pistachio and fig. *HortScience* 21: 928-933.
- BECERRA, V. AND GEPTS, P. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. *Genome* 37: 253-263.
- BECKER, J. AND HEUN, M. 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant Mol. Biol.* 27: 835-845.
- BRONDANI, R.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R. AND GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 816-827.
- CASEY, R.; DOMONEY, C. AND ELLIS, N. 1986. Legume storage proteins and their genes. *Oxford Surveys Plant Mol. Cell Biol.* 3: 1-95.
- CLEGG, M. T.; BROWN, A. H. D. AND WHITFIELD, P. R. 1984. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated barley: Implications for genetic conservation. *Genet. Res.* 43: 339-343.
- COLWIN, T.; VOS, P.; ZABEAU, M.; JONES, D.; NORCOTT, K.; CHADWICK, B. AND JONES, J. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal* 8: 785-794.
- CONDIT, R. AND HUBBELL, S. P. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome* 34: 66-71.
- DEMEKE, T.; ADAMS, R. P. AND CHIBBAR, R. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84: 990-994.

- DOEBLEY, J. 1992. Molecular systematics and crop evolution. *In*: Soltis, P.; Soltis, D.; Doyle, J. (Eds.) Molecular systematics of plants. New York, U.S.A. Chapman and Hall p. 202-222.
- DOEBLEY, J. AND WENDEL, J. D. 1989. Application of RFLPs to plant systematics. *In*: Helentjarus, T.; Barr, B. (Eds.) Development and application of molecular markers to problems in plant genetics. New York, U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratories. p. 57-67.
- FOOLAD, M. R.; ARULSEKAR, S.; BECERRA, V. AND BLISS, F. A. 1995. A genetic map of *Prunus* based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* 91: 262-269.
- GAYLER, K. R. AND SYKES, G. E. 1985. Effect of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiol.* 78: 582-585.
- GEPTS, P. 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. *In*: Brown, H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. and Weir, B.S. (Eds.) Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sunderland, Massachusetts, U.S.A. p. 64-82.
- GEPTS, P. AND BLISS, F. A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Econ. Bot.* 40: 469-478.
- HAVEY, M. J. 1991. Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of the chloroplast genome. *Theor. Appl. Genet.* 81: 752-757.
- HEAT, D. D.; IWAMA, G. K. AND DEVLIN, R. H. 1993. PCR primed with VNTR core sequences yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Res.* 21: 5782-5785.
- HILL, M.; WITSENBOER, H.; ZABEAU, M.; VOS, P.; KESSELI, R. AND MICHELMORE, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1202-1210.
- KATZIR, N.; DANIN-POLEG, Y.; TZURI, G.; KARCHI, Z.; LAVI, U. AND CREGAN, P. 1996. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several *Cucurbitaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1282-1290.
- KESSELI, R.; OCHOA, O. AND MICHELMORE, R. 1991. Variation at RFLP in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome* 34: 430-436.
- KOENIG, R. AND GEPTS, P. 1989. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. *Theor. Appl. Genet.* 78: 809-817.
- LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H. AND ANDERSON, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111-1115.
- LEONARD, A.; DAMERVAL, C. AND DE VIENNE, D. 1988. Organ-specific variability and inheritance of maize proteins revealed by two dimensional electrophoresis. *Genet. Res.* 52: 97-103.
- MEACHMAN, D. K.; KASARDA, D. D. AND QUALSET, C. O. 1978. Genetic aspects of wheat gliadin proteins. *Biochem. Genet.* 16: 813-853.
- NEBO, E.; BEILES, A.; STORCH, N.; DOLL, H. AND ANDERSEN, B. 1983. Microgeographic edaphic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. *Theor. Appl. Genet.* 64: 123-132.

- PALMER, J.D. 1992. Mitochondrial DNA in plant systematics: applications and limitations. *In*: Soltis, P. ; Soltis, D. and Doyle, J. (Eds.) Molecular systematic of plants. New York, U.S.A. Chapman and Hall. p. 36-49.
- PALMER, J. D.; SHIELD, C. D.; COHEN, D. B. AND ORTON, T. J. 1983. Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica* species. *Theor. Appl. Genet.* 109: 195-213.
- PAREDES, M. AND GEPTS, P. 1995. Extensive introgression of Middle American germ-plasm into Chilean common bean. *Gen. Res. and Crop Evo.* 42: 29-41.
- PERL-TREVES, R.; ZAMIR, R.; NAVOT, D. AND GALUN, E. 1985. Phylogeny of *Cucumis* based on isozyme variability and its comparison with plastome phylogeny. *Theor. Appl. Genet.* 71: 430-436.
- RAMAKRISHNA, W.; CHOWDARI, K.; LAGU, M.; GUPTA, V. AND RANJEKAR, P. 1995. DNA fingerprinting to detect genetic variation in rice using hypervariable DNA sequences. *Theor. Appl. Genet.* 90: 1000-1006.
- RÖDER, M. S.; PLASCHKE, J.; KÖNING, S. V.; BÖRNER, A.; SORRELS, M. E.; TANSKLEY, S. D. AND GANAL, M. W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- RODRÍGUEZ, M.; PAREDES, M. AND BECERRA, V. 1999. Diversidad isoenzimática en el germoplasma de lentejas (*Lens culinaris* Medick) naturalizado en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 59: 186-195.
- SENIOR, M. M. AND HEUM, M. 1995. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a ct primer. *Genome* 36: 884-889.
- SHARMA, S. K.; DAWSON, J. K. AND WAUGH, R. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 91: 647-654.
- SHARMA, S. K.; KNOX, M. R. AND ELLIS, T. H. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 751-758.
- SINGH, S.; NODARI, R. AND GEPTS, P. 1991. Genetic diversity in cultivated common bean : I. Allozymes. *Crop Science* 31: 19-29.
- STOCKTON, T.; SONNANTE, G. AND GEPTS, P. 1990. Detection of minisatellite sequences in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol. Bio. Reporter* 10: 47-59.
- TOHME, J. ; GONZÁLEZ, O. ; BEEBE, S. AND DUQUE, M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36: 1375-1384.
- VIERLING, R. A. AND NGUYEN, H. T. 1992. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 84: 835-838.
- VOGUEL, J. M.; POWELL, W.; RAFALSKI, A.; MORGANTE, M.; TUDO, J. D.; TARAMINO, G.; BIDDLE, P.; HANAFEY, M. AND TINGLEY, S. V. 1994. Application of genetic diagnosis to plant genome analysis: comparison of marker systems. *Appl. Biotechnol. Tree Cult.* 1: 119-124.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AND ZABEAU, M. 1995. AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

- WANG, Z. Y.; SECOND, G. AND TANSKLEY, S. D. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 83: 565-581.
- WEISSINGER, A. K.; TIMOTHY, D. H.; LEVINGS, C. S. AND GOODMAN, M. M. 1983. Patterns of mitochondrial DNA variation in indigenous maize races of Latin America. *Genetics* 104: 365-379.
- WHITE, T. J.; ARNHEIM, N. AND ERLICH, H. 1989. The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* 5: 185-188.
- WILLIAMS, K. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKY, J. A. AND TINGEY, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6533.
- WILSON, C. M. 1985. Mapping of zein polypeptides after isoelectric focusing on agarose gels. *Biochem. Genet.* 23: 115-124.
- WU, K. S. AND TANSKLEY, S. D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol. Gen. Genet.* 241: 225-235.