

Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético

Márcio Elias Ferreira, Ph.D.
Dario Grattapaglia, Ph.D.

Traducción al español:
Javier Nicolás Fernández
Angeles Sánchez Herhampérez
Luján Rodríguez



Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN

Brasília, DF

1998

Proyecto gráfico y coordinación editorial:

Marcelo Mancuso da Cunha

Tel: (061) 983-6857 E-mail: mmcunha@solar.com.br

Fotos de portada:

- Plantaciones clonales de *Eucalyptus* en la ARACRUZ, Espírito Santo, Brasil (Fernando Bertolucci).
- Polimorfismos de marcadores AFLP en especies de arroz, basados en fluorescencia, detectados por medio de Secuenciador Automático ABI 377 PE-Applied Biosystems (Alexandra Maria Casa).
- Ensayo de variedades de *Brassica* (Márcio Elias Ferreira)

Ejemplares de esta publicación pueden ser adquiridos en:

Embrapa Produção de Informação

Serviço de Produção de Informação
SAIN Parque Rural. Av. W/3 Norte (final)
CEP 70770-901 Brasília, DF, Brasil
Tel.: (061) 348-4236 ou (061) 348-4155
Fax.: (061) 272-4168

Dirección electrónica:

ferreira@cenargen.embrapa.br
dario@cenargen.embrapa.br

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. 1 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. pp. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20)

1. Genética - Marcadores moleculares. I. Grattapaglia, D., colab. II. Título. III. Série.

CDD 574.87328

EMBRAPA 1998

Agradecimientos

Agradecemos al CENARGEN/EMBRAPA, y en especial a la D^{ra}. María José Amstalden Sampaio, al Dr. Márcio de Miranda Santos y al Dr. Afonso Celso Candeira Valois, por el estímulo a este proyecto desde su concepción.

Estamos muy agradecidos a la dirección de la Perkin Elmer Industria y Comercio Ltda. por su apoyo en la realización del curso y en la preparación de este libro. Creemos y sumamos votos para una interacción creciente entre el sector público y privado en iniciativas de esta naturaleza y en actividades de investigación en Brasil.

Estamos sinceramente agradecidos a los alumnos del curso "Introducción al Uso de Marcadores Moleculares para el Análisis Genético" por el entusiasmo durante las clases teóricas y prácticas, y por las reveladoras discusiones en el ámbito de la genética de plantas. Agradecemos también a Marcelo Mancuso da Cunha y José Rodrigues Ferreira por el empeño y sugerencias en la confección del libro.

Agradecimiento muy especial a Ellen Ferreira y a Tania Grattapaglia, por la amistad y comprensión, y por habernos concedido tiempo frente al computador para la realización de este proyecto.

Agradecemos al Dr. Spartaco Astolfi Filho y a Eduardo Nogueira Campinhos por las diligentes revisiones para esta segunda edición del libro.

Márcio Elias Ferreira

Dario Grattapaglia

Presentación

Este libro nació de ideas y discusiones durante el curso "Introducción al Uso de Marcadores Moleculares para el Análisis Genético", ofrecido por el CENARGEN/EMBRAPA con el apoyo del PROMOAGRO, para actividades de entrenamiento de recursos humanos en el área de genética. Este curso es dictado regularmente como parte del Programa de Posgraduación en Biología Molecular de la Universidad de Brasilia - UnB, y es un ejemplo de la intensa colaboración entre investigadores del CENARGEN/EMBRAPA y de la Universidad de Brasilia.

La idea de confeccionar un texto sobre el asunto nació al darnos cuenta de la carencia de información sobre marcadores moleculares en portugués. El objetivo principal fue presentar a los alumnos iniciantes en el estudio de genética los principios básicos y las relevantes aplicaciones de técnicas ampliamente utilizadas en estudios contemporáneos de genética. El enfoque y ejemplos ofrecidos son decurrentes de investigaciones desarrolladas con plantas agrícolas y forestales, pero vale resaltar que los principios genéticos se aplican a los más diversos modelos biológicos. El lector debe considerar paso a paso, algunos de aspectos más relevantes que serán considerados en este tipo de análisis. Las referencias específicas de los tópicos discutidos son citados a lo largo del texto.

La primera sección del libro discute la base genética de diversas clases de marcadores moleculares desde isoenzimas hasta AFLP. Esta parte se concentra en el abordaje de los principios genéticos que llevan a la observación de polimorfismo molecular, a través de técnicas que revelan variabilidad en las secuencias de nucleótidos que componen la cadena de ADN. Además se realizan comparaciones con otros tipos de marcadores genéticos, discuriendo sobre las ventajas y desventajas de cada uno. La segunda sección del libro presenta una sinopsis del empleo de marcadores moleculares en diversas áreas de genética, desde la caracterización de germoplasma y análisis de diversidad genética hasta la utilización de marcadores moleculares en la construcción de mapas genéticos y su empleo en el mejoramiento de plantas. La tercera sección del libro se concentra en la presentación de métodos utilizados para la generación de datos moleculares a través de dos técnicas ampliamente utilizadas hoy en el análisis genético: RAPD y RFLP. Esta parte del libro presenta además algunos aspectos que serán considerados en el montaje de un laboratorio para el análisis genético utilizando marcadores RAPD.

Los errores e imprecisiones que por ventura fuesen encontrados en el texto son de nuestra entera responsabilidad. Pedimos a los lectores que nos los revelen y comenten para que podamos hacer las correcciones pertinentes.

Dario Grattapaglia

Márcio Elias Ferreira

Brasília, julio de 1995.

Índice

LISTA DE FIGURAS	9
INTRODUCCIÓN	11
CLASES DE MARCADORES MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS GENETICO	13
1. Introducción	15
2. Isoenzimas	16
2.1. Base genética de los marcadores isoenzimáticos	18
2.2. Detección de marcadores isoenzimáticos	20
2.3. Ventajas de los marcadores isoenzimáticos	20
2.4. Limitaciones de los marcadores isoenzimáticos	23
3. Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción - RFLP	23
3.1. Base genética de los marcadores RFLP	24
3.2. Obtención de sondas para la detección de los marcadores RFLP	29
3.3. Ventajas de los marcadores RFLP	29
3.4. Limitaciones de marcadores RFLP	31
4. Marcadores Basados en Loci Hipervariables de Minisatélites	32
4.1. Base genética y detección de loci hipervariables	33
4.2. Ventajas y limitaciones de los loci hipervariables	36
5. Marcadores Basados en PCR	37
5.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
6. Polimorfismo de ADN Amplificado Arbitrariamente (RAPD)	38
6.1. Base genética de los marcadores RAPD	40
6.2. Ventajas de marcadores RAPD	50
6.3. Limitaciones de los marcadores RAPD	51
7. Marcadores Basados en PCR de Secuencia Especifica	53
7.1. Conversión de RFLP y RAPD a marcadores basados en PCR específico	53
8. Marcadores Basados en la Amplificación de Microsatélites	55
8.1. Base genética y detección de marcadores microsatélites	56
8.2. Limitaciones de los marcadores microsatélites	60
9. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP)	62
9.1. Base genética y detección de marcadores AFLP	62
9.2. Ventajas de los marcadores AFLP	66
9.3. Limitaciones de los marcadores AFLP	67
10. Comentarios Finales	67
APLICACIONES DE MARCADORES MOLECULARES EN LA GENETICA Y MEJORAMIENTO DE PLANTAS	69

1. Introducción	71
2. Historia	72
3. Aplicaciones de Marcadores Moleculares en el Mejoramiento de Plantas	74
3.1. Aplicaciones a corto plazo	76
3.2. Aplicaciones a medio y largo plazo	82
3.2.1. <i>Construcción de mapas genéticos</i>	82
3.2.2. <i>Mapeamiento de loci de herencia simple</i>	98
3.2.3. <i>Mapeamiento de características de herencia cuantitativa</i>	104
3.2.4. <i>Selección auxiliada por marcadores</i> <i>("MAS - Marker Asisted Selection")</i>	111
3.3. Clonación de genes basados en el mapeamiento <i>("map-based cloning")</i>	116
4. Comentarios Adicionales	118
MÉTODOS	119
1. Extracción de ADN Genómico Total de Plantas	121
1.1. Consideraciones generales	121
1.2. Método experimental	125
2. Análisis Genético Con Marcadores RAPD	140
2.1. Consideraciones Generales	140
2.2. Componentes de la reacción	141
2.3. Método experimental	146
3. Hibridación y Detección Quimioluminiscente Utilizando Fragmentos RAPD Como Sondas: Estudios de Homología de Fragmentos RAPD	154
3.1. Consideraciones Generales	154
3.2. Método Experimental	159
4. Análisis Genético con Marcadores RFLP	167
4.1. Consideraciones Generales	167
4.2. Método Experimental	170
4.2.1. <i>Digestión del ADN Electroforesis de Fragmentos y «Southern Blotting»</i> 170	
4.2.2. <i>Construcción de la Biblioteca de Clones y Selección de Clones Utiles.</i> 178	
4.2.3. <i>Hibridación y Detección de Polimorfismo de Distancias de Fragmentos</i> <i>de ADN</i>	188
APÉNDICE	197
MONTAJE DE UN LABORATORIO PARA EL ANALISIS DE MARCADORES RAPD	199
CONFIGURACIÓN DE LABORATORIO BÁSICO	199
CONFIGURACIÓN DE LABORATORIO AVANZADO	200
REFERENCIAS	205