
DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MARCADORES CODOMINANTES PARA LA DETERMINACIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTIVO EN PLANTAS

Autores:

Marco Dalla Rizza*

Daniel Real**

Sabina Vidal***

* Ing. Agr., Ph.D. Unidad de Biotecnología. INIA Las Brujas

** Ing. Agr., Ph.D. Dpto. de Leguminosas forrajeras. INIA Tacuarembó

*** Lic. Biol., Ph.D. Dpto. de Biología molecular vegetal. Facultad de Ciencias (UDELAR)

Título: DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MARCADORES CODOMINANTES PARA LA DETERMINACIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTIVO EN PLANTAS

Autores: Marco Dalla Rizza - Daniel Real - Sabina Vidal

Serie Técnica N° 137

© 2003, INIA

ISBN: 9974-38-182-7

Editado por la Unidad de Agronegocios y Difusión del INIA.
Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
Página Web: <http://www.inia.org.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

PRÓLOGO

Las actividades de fitomejoramiento se han basado tradicionalmente en la exploración y domesticación de recursos genéticos como fuente de diversidad para el desarrollo de variedades adecuadas a las cambiantes necesidades de cada sociedad. En particular, la búsqueda de especies vegetales que aporten nuevas estrategias de crecimiento y sostenibilidad a los complejos procesos biológicos que ocurren en los agroecosistemas pastoriles ha sido una herramienta muy utilizada en nuestro país. Uno de los requisitos esenciales en la implementación de programas de mejoramiento genético a partir de estas especies es la identificación precisa de sus características reproductivas, y en consecuencia el conocimiento de la estructura de sus poblaciones. Esta información es altamente relevante para establecer métodos apropiados para la selección y propagación de los mejores materiales genéticos para nuestras condiciones. Cuando se dispone de escasa información a nivel internacional sobre las especies introducidas, el desafío propuesto a la investigación es doblemente exigente, dado que por un lado se deberá evaluar la potencial aptitud agronómica de la especie y por otro lado se deberá generar conocimiento biológico fundamental que permita disponer de sólidas bases científicas para el desarrollo productivo de la especie.

Como se podrá apreciar en los capítulos que componen esta publicación, ese doble desafío ha sido enfrentado exitosamente en el caso de la especie *Lotononis bainesii* Baker a través de los esfuerzos de un equipo de investigadores que combinó conocimientos en genética molecular vegetal y fitomejoramiento y utilizó en forma muy eficiente componentes de la tecnología genómica, instalados tanto en la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (UDELAR) como en la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). El establecimiento de dichos componentes ha contado con el apoyo del Banco Interamericano de Desarrollo (BID) y DINACYT del Ministerio de Educación y Cultura, en el marco de proyectos de fortalecimiento de la capacidad para desarrollar y aplicar biotecnologías en el sector agroalimentario. En este sentido podemos considerar que la estrategia aplicada en las investigaciones sobre *Lotononis* representa un ejemplo de integración de enfoques fundamentales y aplicados que se articularon a nivel de una plataforma tecnológica, a la que han contribuido diferentes instituciones de investigación y desarrollo del Uruguay.

En Uruguay las actividades agropecuarias y agroindustriales juegan un papel fundamental en el aprovisionamiento de materias primas y productos terminados, la generación de empleos y la capacidad exportadora. En el año 2002 se presentaron los resultados de un ejercicio de prospectiva en el área de Biotecnología coordinado por INIA con la asistencia de un panel de expertos de 62 integrantes provenientes de Instituciones públicas y empresas. Este estudio destacó la relevante capacidad instalada en el país para proyectos de desarrollo biotecnológico, en recursos humanos, recursos genéticos y conocimiento en producciones de base biológica. A un año de la presentación de ese estudio, la oportunidad de presentar este trabajo sobre *Lotononis* nos ofrece una lectura muy clara para enfatizar la importancia de la cooperación interdisciplinaria e integración de enfoques en los nuevos escenarios de investigación.

En resumen, esta publicación nos ayudará a visualizar la necesaria conexión entre la incorporación de las primeras secuencias de ADN obtenidas para *L. bainesii* en el banco de información genómica más grande del mundo (NCBI-GenBank), el uso de esta información para estudios del sistema reproductivo, y los esfuerzos para incorporar esta nueva especie en el sistema pastoril que se desarrolla sobre más de 2.6 millones de hectáreas de suelos superficiales en la región basáltica del país. Por lo tanto, y en nombre de todos los investigadores de INIA que participamos en el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas en fitomejoramiento, tenemos la satisfacción de invitarlos a compartir los avances más recientes en la generación de conocimientos sobre una especie en activo proceso de mejoramiento genético y desarrollo productivo para las condiciones ambientales de nuestro país.

Fabián M. Capdevielle
Coordinador, Unidad de Biotecnología
Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

ÍNDICE GENERAL

PRÓLOGO	3
CAPITULO I	9
Aspectos generales para la determinación del sistema reproductivo en plantas	9
1. Introducción	9
2. Tipo de marcadores empleados	9
2.1. Marcadores Morfológicos	9
2.2. Marcadores Moleculares	10
2.2.1. Marcadores Bioquímicos	10
2.2.1.1. Isoenzimas	10
2.2.1.2. Proteínas de reserva de la semilla.	12
2.2.2. Marcadores moleculares basados en ADN	13
2.2.2.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)	14
2.2.2.2. Marcadores obtenidos usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa	14
2.2.2.2.1. MAAP (Perfil múltiple de amplificación arbitraria)	14
2.2.2.2.2. STS (Marcadores Caracterizados por la Secuencia)	15
3. Características de los marcadores	16
4. Usos de los marcadores moleculares	16
5. Ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos	16
6. Empleo de marcadores para determinar el sistema reproductivo	17
6.1. Métodos de campo	17
6.2. Métodos de laboratorio	17
6.2.1. Marcadores bioquímicos	18
6.2.2. Marcadores moleculares basados en ADN	18
CAPITULO II	20
Estudio del sistema reproductivo de <i>Lotononis bainesii</i> Baker en INIA	20
1. Introducción	20
2. Material vegetal	24
3. Extracción de ADN genómico	25
4. Amplificación del ADN genómico con marcadores RAPD.	26
5. Clonación y secuenciación de los marcadores RAPD.	27
6. Diseño de marcadores SCAR.	31
7. Estudio de progenies procedentes de polinización abierta	31
7.1. Amplificación del ADN genómico con marcadores SCAR.	31
7.2. Empleo de polimorfismos de secuencia en amplicones SCAR evidenciados por enzimas de restricción (CAPS).	33
8. Conclusiones	36
9. Agradecimientos	37
10. Bibliografía	37
11. Lista de abreviaturas	39

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1** - Lecturas espectrofotométricas, relación de D.O.260/D.O.280 y concentración de ADN estimada en el material parental partiendo de 10 mg de tejido vegetal.
..... Pág. 25
- Tabla 2** - Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para análisis con RAPDs en *L. bainesii* Baker.
..... Pág. 26
- Tabla 3** - Lista de enzimas de restricción identificadas a partir de la secuencia genómica del fragmento de 600 pb, empleada para el diseño del cebador SCAR III.
..... Pág.34
- Tabla 4** - Fragmentos esperados de la digestión de los amplicones generados con el SCAR III empleando las enzimas Mbo II y Taq I.
..... Pág. 34
- Tabla 5** - Representación esquemática de la composición alélica de 5 genotipos encontrados con el SCAR III mediante un análisis PCR-RFLP usando la enzima Taq I.
..... Pág. 35

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1** - Fenotipo electroforético de isoenzimas. (1) enzima monomérica, (2) dimérica, (3) trimérica y (4) tetramérica en relación con genotipos observados en el locus isoenzimático.
..... Pág. 11
- Figura 2 A** - Segregación de un microsatélite en una descendencia de un cruzamiento entre un individuo heterocigota (parental femenino) y otro homocigota (parental masculino) para dicho locus, visto en un gel de agarosa. B: Ejemplo de cómo se realizaría la evaluación de paternidad. Alelos de diferente tamaño se presentan con colores diferentes. Los individuos procedentes del cruzamiento deben llevar uno de los dos alelos maternos y el paterno (en foto: 1, 3, 4, 5, 8, 11 y 13). Las autofecundaciones (2, 6, 7, 9, 10, 12, 14 y 15) y contaminaciones pueden detectarse por la presencia exclusiva de alelos maternos o por la aparición de alelos extraños respectivamente.
..... Pág. 19
- Figura 3** - Diferencias morfológicas de vainas y pistilos entre flores chasmógamas y cleistógamas. A1 y A2: vainas. A1: vaina formada en una flor chasmógama, A2: vaina formada en una flor cleistógama (notar el pequeño garfio estilar y las anteras adheridas al estigma). B1 y B2: pistilos. B1: pistilo de una flor chasmógama, B2: pistilo de una flor cleistógama (Van Wyk, 1990).
..... Pág. 21
- Figura 4** - Flor de *L. bainesii*. a) observación del estigma sobre las anteras (flecha); b) y c) frutos; en c) la flecha indica el garfio estilar adherido a la vaina
..... Pág. 21
- Figura 5** - Comportamiento dominante de marcadores RAPD donde se ilustra la relación que existe entre los fenotipos RAPD en el gel de electroforesis y los respectivos genotipos. El fenotipo 'presencia de banda' (paneles A y B) puede corresponder a dos genotipos diferentes (homocigota y heterocigota).
..... Pág. 22
- Figura 6** - Comportamiento codominante de marcadores locus-específico basados en PCR (A) en donde se observa la capacidad de estos marcadores para diferenciar genotipos y estos se visualizan en gels de electroforesis (B). Adaptado de Alberts et al. (1996).
..... Pág. 23

Figura 7 - Representación esquemática del desarrollo y diseño de marcadores. SCAR a partir de fragmentos de ADN provenientes de amplicones RAPD (adaptado de Bonierbale M., CIP 2000).	Pág. 24
Figura 8 - Gel de agarosa 0.8% en TAE 1X. ADN genómico (5 ml de solución) perteneciente a 10 muestras de Lotoononis. El carril de la izquierda corresponde a ADN de Lambda de 23 Kb.	Pág. 26
Figura 9 - Polimorfismo observado en el material parental mediante el análisis con el marcador RAPD G-17. La flecha indica uno de los fragmentos clonado, secuenciado y utilizado para desarrollar el marcador SCAR. Ultimo carril: marcador de peso molecular (100 pb Promega).	Pág. 27
Figura 10 - Análisis RAPD con el cebador G-17 de un genotipo usado como madre (M) y su progenie proveniente de autofecundación y de polinización abierta. Ultimo carril: marcador de peso molecular (100 pb Promega).	Pág. 27
Figura 11 - Clonación de productos de PCR en un plásmido. Adaptado de Watson et al. (1994).	Pág. 28
Figura 12 - En a puede observarse el crecimiento de las colonias transformadas con el plásmido recombinante (colonias blancas) y las colonias con vector sin inserto (colonias azules). En b se muestra el ADN plasmídico sin digerir y digerido. En este último caso puede observarse el fragmento de 500 pb clonado (flecha).	Pág. 29
Figura 13 - Perfil de secuenciación que se obtiene en un secuenciador automático capilar ABI310 (PE Biosystems, La Jolla, CA., USA).	Pág. 30
Figura 14 - Diseño experimental basado en los marcadores SCAR. El 'genotipo tester' (M) es el empleado como madre, el padre (P) y la progenie (F1) en la cual viene analizado el perfil electroforético obtenido.	Pág. 32
Figura 15 - Patrón de bandeo de una progenie de 10 individuos procedentes de una autofecundación y su madre (M) obtenido con el SCAR II. El carril de la derecha corresponde al marcador de peso molecular (100 pb Promega).	Pág. 33
Figura 16 - Patrón electroforético de 15 genotipos individuales procedentes de tres inflorescencias (a, b y c) originados por polinización abierta utilizando el SCAR II. El 'genotipo tester' usado como planta madre presenta una sola banda. El carril de la derecha corresponde al marcador de peso molecular (100 pb Promega).	Pág. 33
Figura 17 - Gel de poliacrilamida mostrando la digestión enzimática de los amplicones de 5 genotipos, producidos por el SCAR III, usando la enzima de restricción Taq I. Las flechas indican los alelos considerados en el experimento de polinización abierta.	Pág. 36
Figura 19 - Análisis con CAPS utilizando la enzima Taq I en el genotipo 71 (M) y su progenie proveniente de polinización abierta. Las flechas indican los alelos no maternos presentes en la progenie.	Pág. 36
Figura 18 - Patrón electroforético de una progenie proveniente de una polinización abierta del genotipo 22s, obtenido con el SCAR III al digerir los amplicones con la enzima Taq I. Las flechas indican los 3 alelos previamente identificados. Los carriles 3, 4, 5, 6, 12 y 14 presentan el mismo patrón que la planta madre (autógamas).	Pág. 36

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE MARCADORES CODOMINANTES PARA LA DETERMINACIÓN DEL SISTEMA REPRODUCTIVO EN PLANTAS

CAPITULO I

Aspectos generales para la determinación del sistema reproductivo en plantas

1. Introducción

El sistema de reproducción y la estructura genética de las poblaciones son factores clave para la conservación de los recursos genéticos, el fitomejoramiento, el mantenimiento varietal y la producción de semillas. Su conocimiento es tan fundamental para la mejora de plantas que su estudio debe preceder cualquier consideración sobre los métodos de mejora.

En las plantas superiores existen dos formas básicas de reproducción: la asexual y la sexual. En la reproducción 'asexual' no intervienen células especiales (gametos) y sobre todo no hay reducción cromosómica. Las células se reproducen por mitosis, donde cada cromosoma se duplica y luego se divide en dos mitades longitudinales idénticas y por tanto, todas las células resultantes tienen el mismo genomio y partes iguales del citoplasma. La reproducción 'sexual' se efectúa mediante la formación de células especializadas llamadas gametos. Tanto los gametos masculinos como los femeninos pasan, antes de formarse, por un proceso de reducción cromosómica (meiosis), en el cual cada miembro de un par cromosómico se va hacia una de las células que se forman. De este modo las células gaméticas llevan solamente la mitad del número de cromosomas correspondientes a la planta que realiza la meiosis. Cada uno de estos cromosomas es homólogo al que formó la otra célula hija, pero no idéntico a ella, de modo que los gametos provenientes de una sola célula pueden tener una constitución diferente o pueden ser iguales. En este caso, para dar origen a un nuevo individuo es ne-

cesario que un gameto femenino y un gameto masculino se unan durante el proceso denominado fecundación, dando así origen a un cigoto. El cigoto, y más tarde la planta adulta, contiene dentro de sus células un genoma que está formado entonces por la mitad del número de cromosomas provenientes del gameto femenino y la otra del gameto masculino.

Si la planta es autógama, es decir, si los gametos que se unen provienen de la misma planta (autofecundación), y este proceso se ha repetido durante muchas generaciones, lo más probable es que los gametos sean idénticos y las plantas sean homocigotas. Su reproducción por semilla (sexual) origina plantas idénticas. Por el contrario, si la planta es alógama, los gametos pueden ser completamente distintos dando así origen a plantas heterocigotas.

Mediante la recombinación sexual, hibridación somática y/o transformación genética, pueden incorporarse nuevas características a cultivares o poblaciones ya establecidas. En este proceso ninguna técnica de manipulación genética, individualmente, puede atender todos los problemas y necesidades de un programa. La tendencia general en el mejoramiento genético de plantas, es la integración de las técnicas clásicas con la biotecnología, teniendo en cuenta las ventajas y limitaciones de cada una de ellas. En este contexto, la tecnología de marcadores moleculares puede contribuir significativamente al conocimiento básico de los cultivos y de los caracteres estudiados, así como para la producción y desarrollo de materiales mejorados.

2. Tipo de marcadores empleados

2.1. Marcadores Morfológicos

A lo largo de la historia de la mejora de

plantas, se han hecho intentos para seleccionar caracteres con utilidad agronómica utilizando marcadores morfológicos lo cual requiere observaciones muy exhaustivas de los organismos en diferentes estadios del desarrollo (Stuber et al., 1992). Los criterios utilizados carecen muy a menudo de definición y objetividad (Struss et al., 2001) y, en algunos casos, son marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales (Olfet et al., 2001). El éxito de este análisis, entre otros factores, depende de la heredabilidad del carácter. Así por ejemplo, la herencia poligénica, dominancia parcial o completa, la influencia del ambiente y el tiempo necesario para la evaluación fenotípica en cultivos perennes, son factores que frecuentemente limitan la eficacia de este análisis.

Se han observado asociaciones entre los caracteres seleccionados y determinados marcadores morfológicos. Por ejemplo, entre el mayor rendimiento del grano del trigo y la menor talla de las plantas, y también entre el mayor rendimiento de híbridos de maíz y el ángulo más agudo de inserción de las hojas en el tallo, etc. La contribución directa de estos mutantes al carácter seleccionado no está cuantificada, pero es muy probable que en estos casos el incremento de rendimiento no se deba a su asociación directa con los marcadores sino a una causa indirecta como es permitir un aumento de la densidad de plantas y del nivel de fertilización en el cultivo.

Muchas de las complicaciones del análisis fenotípico pueden ser mitigadas a través de la identificación directa del genotipo. Para este fin, puede utilizarse un sistema de diagnóstico basado en marcadores moleculares de segregación conjunta a la de los genes de interés. La utilización de la información molecular para el análisis de diversidad y relaciones filogenéticas en germoplasma no domesticado, tiene el potencial de facilitar el control y manejo de la base genética de poblaciones de mejoramiento (Ferreira et al., 1998).

2.2. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son tecnologías que permiten la identificación de material biológico, basándose en diferencias a nivel peptídico o de ácidos nucleicos. Estas tecnologías son también conocidas con el nombre de Genotipaje o 'Huella Genética Digital' (del inglés '*Genetic Fingerprinting*'). Con estas se generan patrones los cuales son empleados para identificar especies, variedades o individuos (clasificación de la biodiversidad, control de la paternidad, protección de la propiedad individual, etc.). Asimismo, se pretende asociar dichos patrones a características de interés, para acelerar los programas de mejora genética clásica, previa construcción de un 'Mapa Físico de Ligamiento Genético'; es la denominada 'Mejora Asistida por Marcadores' (MAS; del inglés, '*Marker Assisted Selection*') (Dorado, 2001).

Generalmente, las biomoléculas empleadas como marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Los marcadores isoenzimáticos son muchas veces llamados marcadores bioquímicos. La secuencia de nucleótidos y la función de un marcador molecular pueden o no ser conocidas, y por lo general, son desconocidas. Cuando se verifica su comportamiento de acuerdo con las leyes básicas de la herencia Mendeliana, se define a un marcador molecular como marcador genético.

2.2.1. Marcadores Bioquímicos

Los primeros marcadores moleculares utilizados para el estudio de la variabilidad genética en especies vegetales fueron marcadores bioquímicos, como ser compuestos fenólicos, antociánicos, alcaloides o proteínas enzimáticas ampliamente utilizadas dado que su control genético es conocido.

2.2.1.1. Isoenzimas

El término isoenzima describe un grupo de múltiples formas moleculares de la mis-

ma enzima presentes en una especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificado para más de una de las enzimas. El principio básico de la técnica reside en el uso de electroforesis en gel de almidón y en la visualización del producto enzimático por métodos histoquímicos.

Las isoenzimas desempeñan la misma actividad catalítica, pero pueden tener diferentes propiedades cinéticas y ser separadas por procesos bioquímicos. Esto significa que las isoenzimas de un mismo grupo difieren entre sí en la secuencia de aminoácidos que poseen, lo que por consiguiente, puede influir en la naturaleza de la estructura proteica secundaria, terciaria o cuaternaria de la enzima. El número de isoenzimas de una determinada enzima está relacionado con el número de compartimentos subcelulares donde se realiza la misma reacción catalítica.

La premisa básica adoptada al utilizar datos isoenzimáticos, es que las diferencias en la movilidad electroforética de las isoenzimas son resultantes de las diferencias a nivel de secuencias del ADN que codifican tales enzimas. Así, si los patrones de bandas de los individuos difieren, se asume que estas diferencias posean base genética y sean heredables. El control genético de las isoenzimas está a cargo de varios genes, que pueden ser alelomorfos de un mismo locus o estar situados en diferentes loci. Las isoenzimas codificadas por genes alélicos son denominadas

aloenzimas. La expresión de las isoenzimas es codominante, es decir que en un individuo diploide, es posible visualizar la expresión de ambos alelos de un mismo locus. Un marcador codominante permite distinguir inequívocamente entre individuos homocigotas y heterocigotas en un gel electroforético. En contraste, los marcadores dominantes no pueden distinguir entre homocigotas dominantes e individuos en base a la presencia o ausencia de bandas en un gel (Piepho et al., 2000).

Para interpretar los patrones de bandas resultantes, es necesario tener conocimiento previo sobre el número de subunidades de la enzima; por ejemplo, las enzimas monoméricas están formadas por un único polipéptido, las enzimas diméricas por dos y así sucesivamente (Figura 1). Los individuos heterocigóticos para una enzima dimérica, además de las dos bandas correspondientes a los dos polipéptidos, presentan una tercera banda intermedia, producto de la conjunción de ambos polipéptidos. De la misma manera, individuos heterocigóticos para una enzima tetramérica presentan tres bandas intermedias.

Es común observar más de un locus genético en un mismo gel y la migración de las bandas de cada locus se visualiza en zonas diferentes. Ocasionalmente, las subunidades de una enzima pueden estar codificadas por loci distintos resultando más complejo el análisis del patrón de bandas observado.

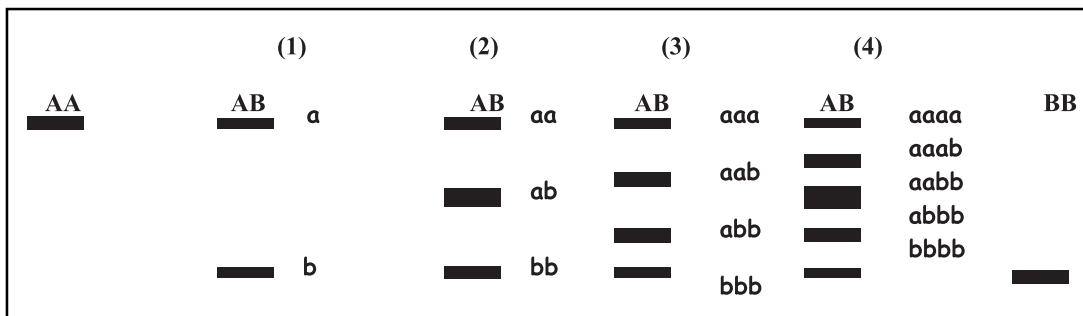


Figura 1 - Fenotipo electroforético de isoenzimas. (1) enzima monomérica, (2) dimérica, (3) trimérica y (4) tetramérica en relación con genotipos observados en el locus isoenzimático.

La detección de las isoenzimas incluye básicamente tres pasos: a) extracción de proteínas del tejido vegetal, b) separación de estas proteínas a través de electroforesis y c) coloración histoquímica del gel, lo que permite la visualización del producto de la reacción enzimática en forma de una "banda". En principio, la mayoría de los tejidos vegetales pueden ser utilizados para el análisis isoenzimático. Una vez identificado el tejido adecuado, se macera en presencia de un tampón que permita: 1) la extracción de las proteínas, 2) mantenimiento de su actividad catalítica y 3) la prevención contra la oxidación de compuestos fenólicos asociados. El extracto de proteínas es separado por electroforesis generalmente en geles de almidón y poliacrilamida. En esta fase, pueden ser usados diversos sistemas tampón, de acuerdo con el sistema enzimático a ser analizado. La determinación del sistema para la especie vegetal en estudio y el tipo de tejido a ser utilizado, son variables muy importantes para el éxito del análisis.

Después de la electroforesis, las isoenzimas se visualizan directamente mediante colorantes histoquímicos específicos, que proporcionan un sustrato para las enzimas. El patrón de bandas observado (zimograma) resulta de la reacción catalizada por la isoenzima presente en aquella posición del gel permitiendo la visualización de una banda electroforética. De esta manera, los genotipos de individuos de una población pueden ser identificados en el locus enzimático en cuestión.

El control genético de la mayoría de las isoenzimas es bien conocido, lo cual permite realizar inferencias genéticas directamente de los patrones de bandas observados. Los marcadores isoenzimáticos generalmente proporcionan amplia información genética para diversas aplicaciones. La técnica en sí es relativamente barata y técnicamente accesible. Aunque en número limitado, pueden ser analizados varios loci isoenzimáticos rápida y simultáneamente.

Como los alelos isoenzimáticos son codominantes, permiten estimar directamente parámetros tales como frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas y a partir de éstas, coeficientes de diversidad genética y heterocigosidad. Además, pueden ser analizadas las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en un locus o del equilibrio de ligamiento de los gametos entre loci.

Cuando la investigación requiere una cobertura más amplia del genoma, como en el caso de mapeamiento genético o de una caracterización detallada del germoplasma, las isoenzimas presentan dos limitaciones básicas:

- el número total de loci que pueden ser detectados en el genoma;
- el número de alelos por locus, es decir, el nivel de polimorfismo genético detectable en cada locus.

A pesar de ser considerados como marcadores selectivamente neutros, el nivel de polimorfismo de las isoenzimas se ve limitado por la propia función metabólica que desempeñan, además del límite de detección intrínseco a la técnica. Siendo así, además del número limitado de loci, frecuentemente existe ausencia de polimorfismo genético para uno o varios de los loci disponibles, lo cual limita aún más el poder de la técnica. Esta ausencia se debe a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades.

2.2.1.2. Proteínas de reserva de la semilla.

Aunque son efectivos, los métodos isoenzimáticos requieren la examinación de muchas plántulas de cada cultivar para obtener resultados estadísticamente significa-

tivos. Muchas veces es más ventajoso analizar las proteínas totales de la semilla, ya que no se necesita hacer crecer las plantas, el material se puede almacenar fácilmente (Moller et al., 1993), se reduce también el número de análisis de separación requeridos, y no se necesita preservar la actividad enzimática durante la extracción (Gardiner et al., 1986).

Además la electroforesis de proteínas totales de reserva es una técnica más rápida, más barata (Heidenreich et al., 1999) y los patrones de bandas aparentemente no están afectados por la viabilidad de las semillas (Ferguson et al., 1986), ni por el ambiente en el cual las plantas fueron crecidas, lo cual permite el análisis de muestras todo el año (Galussi et al., 1997).

2.2.2. Marcadores moleculares basados en ADN

El estudio de la diversidad genética presente en el germoplasma puede tener numerosas aplicaciones en investigación y mejoramiento genético vegetal. Por ejemplo, el conocimiento del grado de similitud genética entre líneas o poblaciones puede ayudar al mejorador en la elección de los parentales a emplear en la ejecución de cruzamientos controlados para la obtención de nuevas combinaciones genéticas o para maximizar la heterosis.

La identificación de individuos altamente valiosos por sus características agronómicas puede ser potenciada asimismo si se cuenta con herramientas rápidas y sencillas que permitan evaluar el grado de similitud de los materiales. De hecho, la cuantificación de la variabilidad genética, presente ya sea dentro o entre poblaciones, puede simplificar notablemente la actividad prevista para la conservación de la diversidad genética en bancos de germoplasma.

Inicialmente, la evaluación de la diversidad genética se efectuaba exclusivamente utilizando caracteres morfológicos y toman-

do por tanto en consideración la expresión fenotípica de uno o más caracteres. En este caso, el efecto del ambiente sobre el fenotipo constituía una limitación importante sobre la cantidad de información genética obtenida, principalmente en caracteres de control poligénico y de baja heredabilidad.

Los avances de la tecnología del ADN recombinante y la amplificación enzimática del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; (Polymerase Chain Reaction) han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades, evitando las influencias de los factores ambientales ya que se basan en la variación controlada genéticamente (Struss et al., 2001). La posibilidad de obtener grandes cantidades de ADN correspondiente a un segmento específico del genoma es uno de los aspectos más importantes de la técnica de PCR.

La principal ventaja ligada a la utilización de estos marcadores moleculares consiste en la posibilidad de comparar los materiales en examen tomando en consideración todo el genoma, comprendiendo sea ADN codificante y no codificante.

Los marcadores moleculares basados en PCR proporcionan una técnica eficaz y sensible para los diversos programas de mejoramiento genético de plantas, y su uso es particularmente conveniente cuando el fenotipo seleccionado se manifiesta tardíamente en el ciclo de vida de la planta (Albertini et al., 2001).

En las plantas cultivadas, la mayoría de los caracteres más importantes desde un punto de vista agronómico son de tipo cuantitativo, es decir, están bajo el control de muchos genes. Si bien los experimentos de genética clásica han logrado demostrar que los caracteres cuantitativos son controlados por genes que segregan según las reglas mendelianas, estas han brindado escasa

información acerca del número de loci involucrados, sobre la posición de estos loci y sobre la importancia de la contribución de cada locus simple en la expresión fenotípica del carácter mismo. El empleo de los marcadores moleculares para la localización de loci involucrados en el control genético de caracteres cuantitativos (QTL, quantitative trait loci) es un instrumento muy eficiente para la adquisición de esta información.

Los marcadores moleculares más empleados son los Polimorfismos de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) y marcadores producidos utilizando PCR.

2.2.2.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)

Los RFLPs fueron usados por primera vez por Botstein et al. (1980), y constituye una de las primeras técnicas usadas para detectar variación a nivel de secuencia. La técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinta longitud por digestión con la(s) misma(s) enzima(s) de restricción. Las diferencias en los patrones de restricción se atribuyen a mutaciones puntuales en el sitio de restricción o a deleciones/inserciones entre los sitios de restricción.

Estos segmentos son observados por hibridación de los mismos con secuencias homólogas de ADN (sondas) marcadas radioactivamente o con compuestos luminiscentes.

Los RFLPs son particularmente atractivos ya que son codominantes (Michelmore et al., 1991; Rafalski et al., 1993), es decir que en cada locus estudiado se puede identificar genotipos heterocigotos y homocigotos generando mayor cantidad de información genética y permitiendo un análisis detallado de la acción genética y de la interacción entre alelos.

2.2.2.2. Marcadores obtenidos usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los marcadores basados en la amplificación diferencial del ADN pueden dividirse en

dos grupos según la secuencia del 'primer' usado en la PCR. Los métodos que usan primers arbitrarios se denominan colectivamente MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling); y los métodos que usan primers específicos para amplificar el ADN se conocen generalmente como Marcadores Caracterizados por la Secuencia o STS (Sequence Tagged Sites; Olson et al., 1989).

2.2.2.2.1. MAAP (Perfil múltiple de amplificación arbitraria)

Todos los métodos MAAP son marcadores dominantes, o sea que tienen la desventaja de no poder distinguir entre homocigotas dominantes y heterocigotas. Entre estas técnicas cabe destacar:

RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Es una de las técnicas más versátiles desde que se desarrolló en el año 1990 por Williams et al. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Se utilizan primers cortos y de secuencia arbitraria para dirigir la reacción de amplificación eliminando así la necesidad del conocimiento previo de la secuencia. Su pequeñez y baja temperatura de hibridación aseguran que se unan a infinidad de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de ADN. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que varían según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, proporcionando una huella dactilar característica.

Se dice que estos fragmentos amplificados son elementos Mendelianos dominantes en organismos diploides (Williams et al., 1990; Cole et al., 2001). La dominancia en este caso no se refiere al concepto clásico de interacción genética entre alelos de un mismo locus, sino a la interpretación relativa entre genotipo y fenotipo de un individuo (Ferreira et al., 1998). Al observar una banda RAPD en el gel no es posible distinguir si el fragmento se originó a partir de una o dos copias de una secuencia amplificada,

es decir, no se distinguen individuos homocigotas de heterocigotas (Devey et al., 1995).

AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados). Esta técnica se desarrolló en 1995 por Vos et al., y combina el uso de enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, de manera que se obtienen marcadores moleculares muy específicos sin necesidad de conocer la secuencia con anterioridad.

Los AFLPs presentan la ventaja de poder estudiar el polimorfismo de varios loci en una sola reacción (Struss et al., 2001), pero presenta la desventaja de que son en su mayoría elementos Mendelianos dominantes y los datos son procesados al igual que los fragmentos RAPDs (presencia o ausencia de banda). Piepho et al., (2000), reportaron un análisis codominante que permite obtener más información basándose en que el genotipo de un marcador dominante puede inferirse de la densidad óptica de la banda en el gel. Para los individuos homocigotas se espera que el valor de densidad óptica sea mayor que para los individuos heterocigotas, ya que para estos últimos, la cantidad del producto de PCR debería ser la mitad de la cantidad de ácido nucleico obtenida para los homocigotas.

2.2.2.2. STS (Marcadores Caracterizados por la Secuencia)

SSR (Repetición de secuencias discretas). Los genomas eucariotas son densamente poblados por diferentes clases de secuencias repetidas, algunas de ellas denominadas microsatélites. Los mismos consisten en mono-, di-, tri- y tetra-nucleótidos repetidos en tándem. Estas secuencias se amplifican individualmente a través de PCR utilizando un par de primers específicos (20 a 30 b) complementarios a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Los segmentos amplificados presentan un gran polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos. Es por ello que los microsatélites

se pueden utilizar como marcadores moleculares para el análisis de poblaciones.

Este tipo de ensayo genera datos de un solo locus que informa muchos alelos (segmentos de diferente longitud) y genotipos (Macaulay et al., 2001). Para los microsatélites se observa herencia codominante Mendeliana, y teniendo en cuenta esto y el multialelismo, los marcadores SSR son los que poseen más elevado contenido de información de polimorfismo.

ISSR (Inter- Repetición de secuencias discretas). Este método, llamado Inter-SSR, es una variante de la técnica SSR en la que se usan los nucleótidos de los microsatélites para amplificar segmentos genómicos que no incluyen la región repetida. Se obtiene un apareamiento sitio específico del oligo con la secuencia de ADN blanco y se inicia la amplificación de los segmentos genómicos que están flanqueados por secuencias repetidas esparcidas e inversamente orientadas.

CAPS (Polimorfismo de secuencia en amplicones originados por enzimas de restricción). Los fragmentos amplificados se someten a una restricción enzimática y se migra en un gel de agarosa o poliacrilamida. Las variaciones se destacan por presencia o ausencia de sitios de restricción. Se pueden así localizar cambios finos originados por una mutación en el sitio de corte de la enzima o por inserciones/deleciones de nucleótidos en el amplicón.

SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas por secuencia). Los marcadores SCARs son fragmentos de ADN amplificados por PCR usando primers específicos diseñados a partir de secuencia nucleotídica establecida basándose en fragmentos RAPD clonados y secuenciados u otras secuencias conocidas.

Una ventaja sobre los marcadores SCAR es que pueden ser marcadores codominantes. Además son marcadores locus específicos, por lo que se han aplicado en estudios de mapeo genómico, estudios de paternidad y caracterización de

germoplasma.

En el estudio del sistema reproductivo de una especie, donde el fenotipo seleccionable se manifiesta durante la floración o incluso más tarde en la siguiente generación, los marcadores basados en PCR pueden ser usados en el estado de semilla de la planta o antes aún, lo cual reduce el tiempo y los costos involucrados (Albertini et al., 2001).

3. Características de los marcadores

Aunque el marcador molecular 'ideal' no existe, las características deseadas pueden resumirse en las siguientes (Dorado, 2001):

- Barato, rápido, consistente, de fácil desarrollo y aplicación rutinaria, con posibilidad de automatización y detección no isotópica y sin ambigüedades.
- Aplicabilidad en ausencia de conocimiento de la secuencia a estudiar.
- Detección en cualquier estadio del desarrollo, a partir de muestras mínimas.
- Elevado polimorfismo, con herencia mendeliana codominante.
- Transferible en cruzamientos e introgresiones.
- Ausencia de influencia ambiental, efectos epistáticos y pleiotrópicos.

4. Usos de los marcadores moleculares

Los marcadores moleculares se han utilizado en los siguientes aspectos de la mejora genética de plantas:

- Estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos. Esto permite: i) la clasificación taxonómica de ecotipos o muestras que acceden a los Bancos de Germoplasma como un complemento de los datos morfológicos; y ii) la asignación de líneas puras a grupos heteróticos con objeto de predecir el valor de los híbridos resultantes del cruce.
- Identificación y distinción de variedades, líneas puras e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el Registro de Variedades Protegidas. Los marcadores de ADN permiten una distin-

ción más precisa de genotipos que los 'descriptores' morfológicos. Sin embargo estos marcadores moleculares no han sido todavía adoptados por los organismos oficiales encargados de la protección de variedades.

- Establecimiento de relaciones de parentesco o 'pedigree' entre líneas o variedades para realizar estudios genéticos.
- Localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños afectando a caracteres cuantitativos (los así llamados QTLs).

5. Ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos

Según Ferreira et al. (1998) es necesario mucho esfuerzo y planificación para construir mapas genéticos a partir de marcadores morfológicos debido a que el número reducido de marcadores restringe la cobertura total del genoma. El limitado polimorfismo que presentan estos marcadores, generalmente hace que el investigador deba recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamiento genético. En cambio, en el caso de los marcadores moleculares, un gran número de loci polimórficos cuyos alelos pueden ser estudiados en poblaciones segregantes de cruzamientos específicos, facilitan la construcción de mapas genéticos. El nivel de polimorfismo de estos marcadores es generalmente alto para cada locus estudiado, mientras que los marcadores morfológicos poseen un bajo nivel de polimorfismo.

Los marcadores moleculares en general, son neutros con relación a los efectos fenotípicos, con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo. Los marcadores morfológicos muchas veces cohiben o restringen el desarrollo normal de la planta (albinos, mutantes clorofílicos) y su control genético puede afectar, o ser afectado, por genes que controlan otros caracteres, dificultando la caracterización de los genotipos de interés.

Por regla general, los marcadores codominantes contienen mayor cantidad de información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría, son dominantes o recesivos.

Los marcadores morfológicos presentan además la desventaja de ser identificados, en su mayoría, solamente al nivel de planta entera o adulta, mientras que los marcadores bioquímicos o moleculares como isoenzimas o fragmentos de ADN, pueden ser utilizados para caracterizar el genotipo de un individuo a partir de muestras de células o de tejidos. Los marcadores basados en ADN pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo de la planta, siempre que sea posible obtener suficiente cantidad de ADN. La identificación de genotipos en fases iniciales del desarrollo de la planta, abre la posibilidad de acelerar el proceso de selección y recombinación de los individuos deseados y, consecuentemente, reducir el tiempo necesario para completar una generación de mejoramiento, con lo cual se aumenta considerablemente la eficacia del programa. Este aspecto es particularmente importante para el mejoramiento genético de especies perennes frutícolas y forestales, que, contrariamente a cultivos agrícolas donde es posible obtener más de una generación por año, requieren varios años o décadas para completar una generación de mejoramiento.

6. Empleo de marcadores para determinar el sistema reproductivo

Para la determinación del sistema reproductivo de una especie en condiciones naturales, pueden emplearse métodos de campo y métodos de laboratorio.

6.1. Métodos de campo

Las experiencias para determinar si una planta es autógena o alógama son generalmente simples y directas. El examen de la estructura floral es evidentemente el primer paso. Generalmente, el siguiente paso consiste en aislar plantas individuales y observar si producen o no semillas. El método

preferido es el aislamiento en espacio porque el aislamiento mediante bolsas o jaulas introduce la posibilidad de imponer condiciones ambientales adversas para la producción de semilla. El fallo de la semilla en espacio confinado es una indicación casi cierta de que la especie es alógama. Sin embargo, la inversa no es necesariamente verdad porque muchas especies alógamas, como el maíz, son muy autofértiles (Allard, 1980).

El conocimiento del sistema reproductivo del pepino dulce (*Solanum muricatum*) es importante tanto para el manejo de su cultivo como para un adecuado desarrollo de programas de mejora genética. Basándose en la determinación de un sistema de dos genes con epistasia recesiva para el control del color del fruto inmaduro, Murray et al. (1992) afirmaron que el color blanco del fruto inmaduro está determinado por un único gen recesivo, y que la fecundación en pepino dulce se produce normalmente por autopolinización.

Para determinar las progenies que resultan de autofecundaciones o de fecundaciones cruzadas en *Lotus corniculatus*, Seaney, (1964), utilizó la cianogénesis (liberación de cianuro de hidrógeno a partir de hojas y tallos) como un marcador genético dominante. De esta manera, esta información puede ser utilizada para determinar el mejor método de hibridación o cruzamiento.

6.2. Métodos de laboratorio

En el laboratorio, actualmente se cuenta con herramientas moleculares específicas basados en el análisis de los ácidos nucleicos, donde la generación de información genómica específica es cada vez más abundante y permite resolver analíticamente con alta precisión y especificidad. En tal sentido, para el estudio del sistema reproductivo es importante el desarrollo de marcadores de tipo codominantes los cuales permiten el estudio de la segregación de los mismos, ya que amplifican ambos alelos

de un locus (Ferreira et al., 1998).

En un programa de mejoramiento es muy importante conocer el nivel de polinización cruzada por diversas razones: 1) para determinar el método de mejoramiento genético 2) determinar el porcentaje de hibridación alcanzado en un programa de cruzamientos; 3) para evaluar los efectos de los cruzamientos en el desarrollo y producción de un cultivar sintético y/o variedad híbrida y, 4) para asignar posibles cambios y/o contaminaciones durante la multiplicación de semillas de una variedad (Bullita et al., 1993).

6.2.1. Marcadores bioquímicos

Un ejemplo en el uso de isoenzimas para la determinación del sistema reproductivo es el estudio realizado en *Bromus auleticus*, una gramínea perenne de Uruguay, Sur de Brasil y Argentina, de reconocido valor forrajero. Los estudios previos sobre el sistema reproductivo de la especie no han sido concluyentes debido a que los análisis de diversidad se realizaron con caracteres fenotípicos, sujetos a influencias ambientales.

Considerando las dificultades que presentan los análisis de diversidad basados exclusivamente en caracteres morfo-fenológicos, se estudió el sistema reproductivo y la estructura genética de la población mediante el análisis de la variación isoenzimática de progenies. Los índices de polimorfismo de las bandas encontradas en el análisis de la variación isoenzimática para peroxidasas y esterases indicaron que la población presenta diversidad genética. Las plantas dentro de cada progenie son genéticamente diferentes, dando descendencias variables.

La concordancia entre los datos isoenzimáticos y morfo-fenológicos, permite sostener que la población bajo estudio presentó diversidad genética. Estos resultados señalan que la estructura genética poblacional se corresponde con la de una especie alógama o una especie de apareamiento

mixto, cuyas plantas son heterocigotas y producen progenies variables. Si la población se reprodujera por autogamia tendría un alto grado de homocigosis, produciría genotipos homogéneos en sus progenies y podría presentar una alta diferenciación entre sus progenies (Rivas, 2001).

Bullita et al. (1993), analizaron el sistema reproductivo que opera en *Lolium rigidum* Gaud. Para esto, se realizó el estudio del polimorfismo en el locus PGI-2, cuyo producto es una enzima dimérica con expresión codominante. Esta característica de la enzima permite determinar los alelos (composición genotípica) presentes en la población. De esta manera, mediante cruzamientos dirigidos es posible determinar el porcentaje de autogamia/alogamia de la misma.

6.2.2. Marcadores moleculares basados en ADN

La disponibilidad de un método rápido y eficiente para comprobar la paternidad de los individuos procedentes de un cruzamiento es un requisito indispensable en cualquier programa de mejora genética. Esto es especialmente importante en por ejemplo el caso del olivo ya que, a pesar de ser una especie parcialmente alógama, el nivel de autocompatibilidad es alto, por lo que el riesgo de contaminación por autofecundación es elevado (Rallo et al., 2001). En este sentido los microsatélites (SSR) se presentan como una herramienta ideal para la realización de pruebas de paternidad. El carácter codominante de estos marcadores moleculares permite identificar los alelos procedentes de cada parental.

Rallo et al. (2001) realizaron pruebas de paternidad basadas en marcadores SSR, las cuales son relativamente sencillas ya que consisten básicamente en hacer una reacción de PCR en la que se incluyen los parentales y la descendencia a analizar. Los parentales deben ser polimórficos para los microsatélites elegidos en cuestión, es decir,

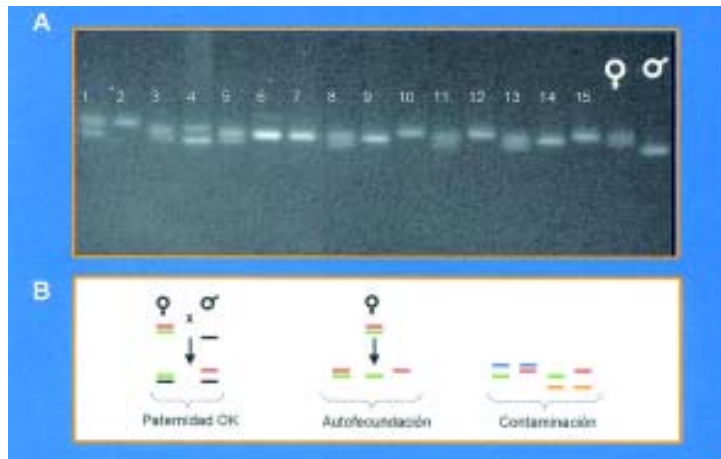


Figura 2 A: Segregación de un microsatélite en una descendencia de un cruzamiento entre un individuo heterocigota (parental femenino) y otro homocigota (parental masculino) para dicho locus, visto en un gel de agarosa. **B:** Ejemplo de cómo se realizaría la evaluación de paternidad. Alelos de diferente tamaño se presentan con colores diferentes. Los individuos procedentes del cruzamiento deben llevar uno de los dos alelos maternos y el paterno (en foto: 1, 3, 4, 5, 8, 11 y 13). Las autofecundaciones (2, 6, 7, 9, 10, 12, 14 y 15) y contaminaciones pueden detectarse por la presencia exclusiva de alelos maternos o por la aparición de alelos extraños respectivamente.

deben amplificar productos de diferente tamaño (alelos). Al tratarse de un marcador codominante los individuos de la progenie deben presentar un alelo del parental femenino y otro del masculino (Figura 2).

La aparición de alelos exclusivamente maternos suele indicar que dicho individuo procede de autofecundación. Si aparecen nuevos alelos no presentes en ninguno de los parentales habría que pensar en una posible contaminación por polen de otra planta. La presencia de alelos nulos o falta de polimorfismo suficiente de los microsatélites disponibles puede dificultar dicha labor e incluso llevar a error a la hora de testar la paternidad. En este sentido un microsatélite ideal sería aquel para el cual los parentales fueran heterocigotos y no compartieran ningún alelo entre ellos.

El sistema reproductivo de la especie *Vitex lucens* (puriri) ha sido estudiado por Barrel et al. (1997) mediante la realización de polinizaciones controladas y análisis de paternidad usando marcadores RAPD y microsatélites (SSR). En este estudio se desarrollaron marcadores SSR maternos y paternos, con el objetivo de estudiar su se-

gregación en distintos tipos de progenies: a) progenies naturales (sin manipulación de los progenitores), b) progenies procedentes de autopolinizaciones manuales y c) progenies procedentes de polinizaciones cruzadas (cruzamientos dirigidos).

Con los resultados obtenidos mediante la observación en geles de agarosa de los alelos segregados se pudo determinar que la especie es capaz de experimentar tanto autopolinización como polinización cruzada, pero teniendo en condiciones naturales una mayor proporción de autogamia. Si bien los marcadores RAPD presentan la desventaja de ser dominantes, con lo cual no es posible determinar en la progenie de que parental proceden las bandas RAPD, en este estudio han sido muy valiosos para determinar la variación genética y la estructura de la población de la especie.

En *Paspalum notatum* Flügge (Martínez y Quarín, 2000), una gramínea forrajera rizomatosa nativa de América del Sur, se obtuvieron dos marcadores moleculares RAPD 100% ligados al locus de la apomixis en una población tetraploide ($2n=4x=40$). Las

respectivas bandas ligadas a la apomixis son amplificadas por todos los genotipos apomícticos y están ausentes en los respectivos individuos sexuales, lo cual demuestra una alta especificidad de dichas regiones dentro de la especie. El descubrimiento de regiones genómicas específicas de la apomixis en *P. notatum* abre la posibilidad de poder utilizar dichos marcadores en la selección y el mejoramiento forrajero dentro del género, permitiendo, debido a su alta especificidad, seleccionar rápidamente aquellos genotipos apomícticos superiores. Por otra parte, estos resultados permiten determinar que grado de especificidad y conservación existe en las restantes especies del género.

Poa pratensis L. (Kentucky bluegrass) es una especie que posee un modo de reproducción muy versátil, que va desde una apomixis obligada a una completa sexualidad. Albertini et al. (2001), propusieron un método basado en el uso de marcadores moleculares para distinguir genotipos sexuales de genotipos apomícticos, lo cual reduce el tiempo y costo que llevaría realizar estudios fenotípicos en las progenies. Para esto, desarrollaron dos marcadores codominantes SCAR, los cuales identifican genotipos apomícticos y sexuales, a partir de marcadores polimórficos específicos observados con marcadores dominantes (AFLPs).

CAPITULO II

Estudio del sistema reproductivo de *Lotononis bainesii* Baker en INIA

1. Introducción

Una consideración importante en la domesticación de cualquier especie leguminosa forrajera es el modo de polinización y reproducción. Aunque parece simple determinar si una especie es autógena o alógama, para la mayoría de las especies no domesticadas no han sido realizados estudios definitivos, los cuales son críticos antes de comenzar cualquier programa de mejoramiento genético (Bullita et al., 1993).

L. bainesii es una leguminosa forrajera herbácea subtropical proveniente de Sudáfrica, reportada como cleistógama por Hutton (1960) y Byth (1964). En estos primeros reportes el comportamiento cleistógamo de *L. bainesii* fue determinado únicamente por estudios del desarrollo floral. Hutton (1960) reportó que la dehiscencia de las anteras ocurre unas pocas horas antes de que la flor se abra y Byth (1964) reportó que los tubos polínicos eran vistos por primera vez en el estigma después de que el largo de la corola fuera la mitad del largo del cáliz, cuando la flor está aún cerrada. Esta especie ha sido también reportada como chasmógama por Van Wyk en 1991, el cual reportó que la Sección *Listia*, a la cual *L. bainesii* pertenece, contiene plantas chasmógamas, no habiendo sin embargo, referencias establecidas al nivel de especie. Van Wyk (1990) también realizó estudios sobre la ocurrencia de cleistogamia en la Sección *Leptis* del género *Lotononis*, basado en diferencias morfológicas entre vainas procedentes de muestras de herbarios. Sin embargo, en la literatura internacional esta especie ha sido citada fundamentalmente como cleistógama basados en el reporte de Byth de 1964 y, por tanto, como autógena (Oram, 1990; Skerman et al., 1991; FAO, 2003).

Desde 1999 en INIA Tacuarembó se ha estudiado el desarrollo floral en *L. bainesii* y la forma de polinización (Real et al., 2003) con el fin de establecer la predisposición reproductiva de esta especie. Para el estudio del desarrollo floral, se realizaron mediciones del cáliz y de la corola y se describió la ubicación del anillo superior e inferior de las anteras con relación al ovario y el estilo.

Asimismo se estudió la morfología de las vainas (chauchas) para determinar si las mismas eran típicas de una especie cleistógama o chasmógama, de acuerdo a las observaciones realizadas por Van Wyk en 1990 (Figura 3).

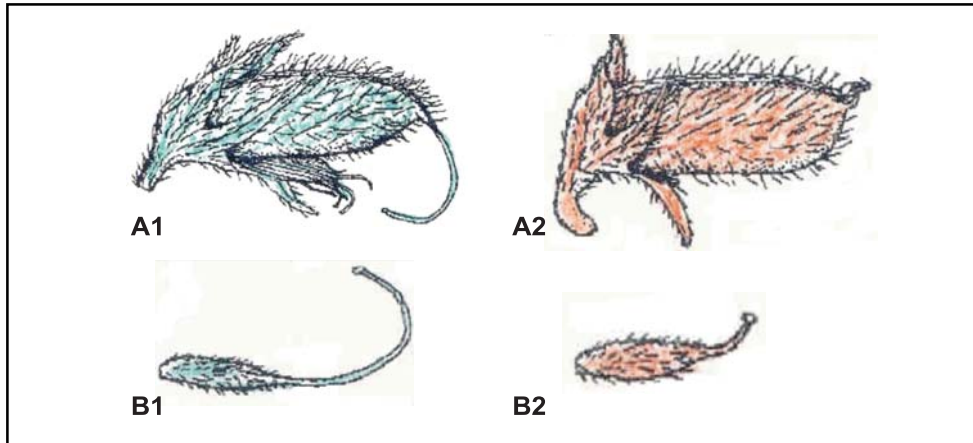


Figura 3. Diferencias morfológicas de vainas y pistilos entre flores chasmógamas y cleistógamas. A1 y A2: vainas. A1: vaina formada en una flor chasmógama, A2: vaina formada en una flor cleistógama (notar el pequeño garfio estilar y las anteras adheridas al estigma). B1 y B2: pistilos. B1: pistilo de una flor chasmógama, B2: pistilo de una flor cleistógama (Van Wyk, 1990).

En las flores de *L. bainesii* las anteras se disponen formando dos anillos, uno superior formado por 5 anteras grandes y un anillo inferior formado por 5 anteras pequeñas (Figura 4). Es de resaltar que el estigma se encontró por encima del nivel de las anteras (longistilia) en el 95% de los casos estudiados, y por lo tanto, si no hay movimiento de polen de las anteras al estigma mediante polinizadores, resulta altamente improbable que se produzca autopolinización mientras la flor se encuentra cerrada. En consecuencia, la posición superior del es-

tigma con respecto a las anteras previo a la dehiscencia de la misma, facilita la polinización cruzada. Además, la dehiscencia de la antera ocurre en un estado avanzado del desarrollo floral, cuando el estigma está por encima de las anteras.

En la etapa de fruto maduro, todas las vainas de *L. bainesii* observadas por Real et al. (2003) presentaron el garfio estilar descrito por Van Wyk (Figura 3) y por tanto de acuerdo a esta característica, correspondería a una especie chasmógama.



Figura 4. Flor de *L. bainesii*. a) observación del estigma sobre las anteras (flecha); b) y c) frutos; en c) la flecha indica el garfio estilar adherido a la vaina.

En los estudios de polinización las inflorescencias de diversas plantas fueron sometidas a varios tratamientos, obteniéndose suficiente evidencia para establecer que *L. bainesii* necesita agentes polinizadores para producir semilla. También hay evidencia preliminar acerca de la existencia de plantas auto-incompatibles.

Todas las observaciones realizadas acerca del desarrollo floral indican la predisposición de alogamia de las flores, pero estas consideraciones no son suficientes para concluir el sistema reproductivo de la especie.

Los marcadores moleculares basados en ADN constituyen una herramienta muy valiosa para el estudio del sistema reproductivo de una especie. En particular, los marcadores RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA; Welsch y McClelland, 1990; Williams et al., 1990) han sido muy usados para una amplia variedad de análisis genéticos debido a que la técnica es sencilla y no requiere conocer la secuencia del ADN de la especie.

Sin embargo, para los estudios de paternidad, la naturaleza 'dominante' de las bandas obtenidas con marcadores RAPD hace difícil reconocer la procedencia de los marcadores, es decir, si se originaron a partir de una o de dos copias de la secuencia amplificada. Por ejemplo, si se tiene un individuo diploide homocigota para un locus RAPD que tiene dos alelos idénticos (AA) a partir de los cuales se genera la amplificación; y por otro lado se tiene un individuo heterocigota (Aa) para el mismo locus RAPD, donde el alelo A es amplificado y el alelo a no lo es (Figura 5). En este caso, la técnica RAPD no tiene sensibilidad cuantitativa para discriminar ambos casos. O sea que los genotipos AA y Aa presentarán una banda y serán considerados como una misma clase fenotípica mientras que en un individuo recesivo, con genotipo aa dicha banda estará ausente (Cole & Kuchenreuther, 2001).

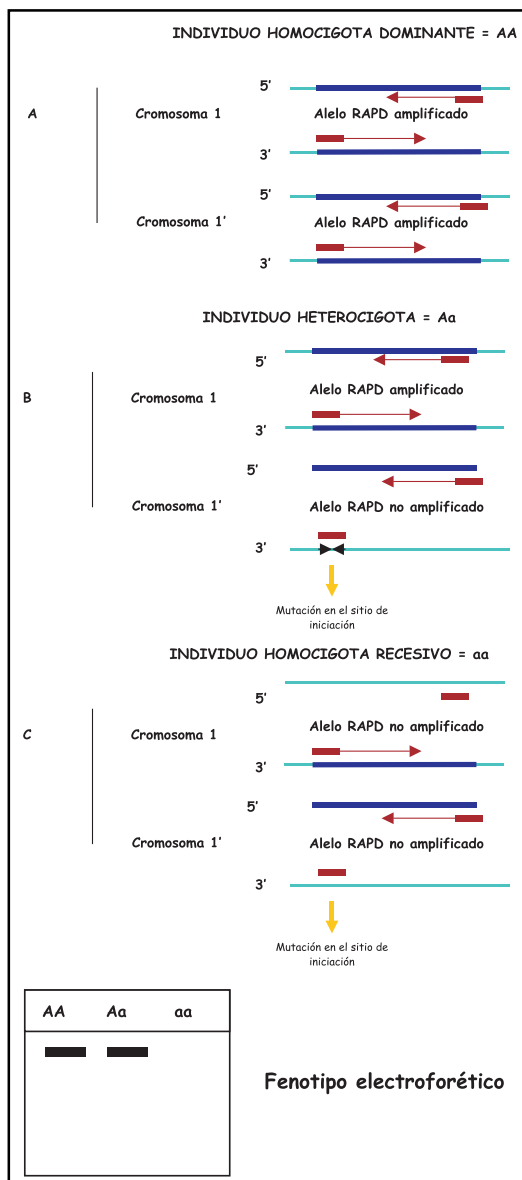


Figura 5. Comportamiento dominante de marcadores RAPD donde se ilustra la relación que existe entre los fenotipos RAPD en el gel de electroforesis y los respectivos genotipos. El fenotipo 'presencia de banda' (paneles A y B) puede corresponder a dos genotipos diferentes (homocigota y heterocigota).

Por el contrario, los marcadores 'codominantes', generalmente basados en el conocimiento de la secuencia de ADN de la especie en estudio, permiten identificar genotipos heterocigotas y evidenciar la presencia de alelos (Figura 6).

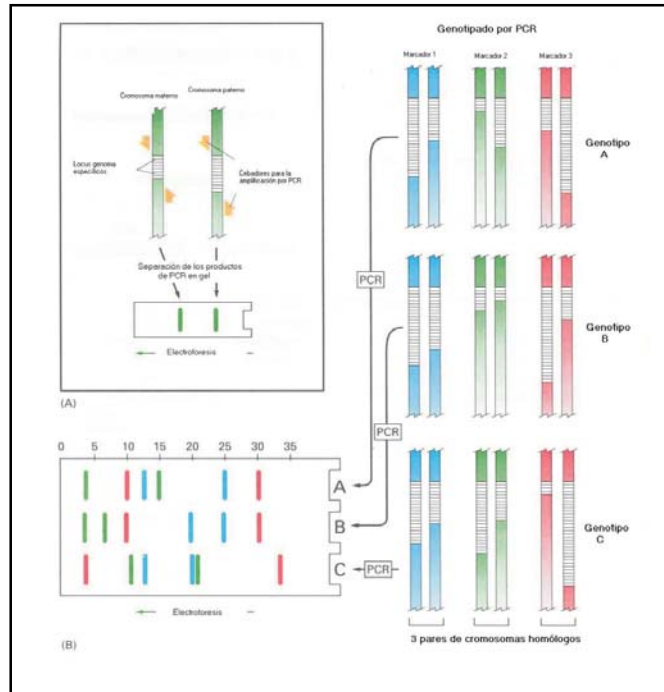


Figura 6. Comportamiento codominante de marcadores locus-específico basados en PCR (A) en donde se observa la capacidad de estos marcadores para diferenciar genotipos y estos se visualizan en gels de electroforesis (B). Adaptado de Alberts et al. (1996).

Los marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), generalmente codominantes, fueron introducidos por Paran y Michelmore en 1993 y se caracterizan por ser fragmentos de ADN genómico pertenecientes a un locus genético, el cual es identificado mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) usando un par de cebadores específicos de la especie. Los SCAR pueden ser sintetizados a partir de marcadores RAPD, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) u otros, mediante el desarrollo de cebadores basados en la información obtenida de la secuencia del fragmento; de esta manera, los fragmentos de ADN procedentes de un marcador pueden ser clonados, secuenciados y transformados en marcadores específicos que permiten la amplificación por PCR de la banda que le dio origen (Figura 7). Frecuentemente se diseñan cebadores basados en la información original usado para amplificar el fragmento (10 nucleótidos en caso de cebadores RAPD) más 10-14 nucleótidos adicionales en la zona 3' del cebador, específicos de la secuencia del fragmento clonado.

Las ventajas de uso de marcadores SCAR en relación con los RAPD son múltiples: la detección de locus único, una amplificación menos sensible a las condiciones de reacción de amplificación y su naturaleza codominante (García-Mas et al., 2000; Paran y Michelmore, 1993; Weng et al., 1998; Albertini et al., 2001). Recientemente, los marcadores SCAR han sido usados para estudios de genética de poblaciones, análisis de paternidad, mapeo de genes de interés, mapeo basado en clonación y selección asistida por marcadores (MAS, *marker assisted selection*) en diversos organismos.

Los marcadores dominantes obtenidos por PCR (así como también los fragmentos monomórficos procedentes de marcadores codominantes) pueden ser convertidos en marcadores CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; Konieczny et al., 1993; Tragoonrung et al., 1992) con el propósito de generar fragmentos polimórficos más informativos.

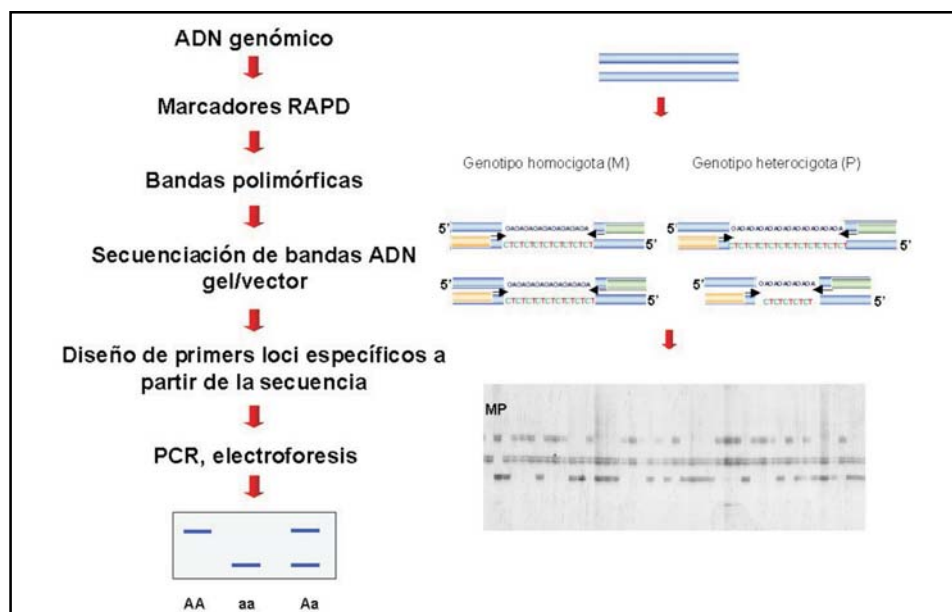


Figura 7. Representación esquemática del desarrollo y diseño de marcadores SCAR a partir de fragmentos de ADN provenientes de amplicones RAPD (adaptado de Bonierbale M., CIP 2000).

Los marcadores CAPS se basan en el diseño de cebadores homólogos a la secuencia de ADN, la cual puede provenir de una banda de gel (por ejemplo una banda RAPD/SCAR) o de una sonda (por ejemplo RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism). Los productos de PCR generados en parentales y en la progenie raramente exhiben polimorfismo directamente. Sin embargo, la distribución diferencial de sitios de restricción entre los productos de los parentales debido a diferencias en la secuencia de ADN pueden ser testados mediante la digestión con enzimas.

En esta aplicación práctica llevada a cabo por INIA, se desarrollaron marcadores codominantes especie-específicos (SCAR) que permitieron determinar, en progenies de una misma madre, la existencia de alelos no explicados por autopolinización.

Posteriormente se emplearon marcadores CAPS como una herramienta que permitió extender el análisis a genotipos que resultaron monomórficos mediante marcadores SCAR.

2. Material vegetal

Para los ensayos se utilizaron plantas de *L. bainesii* provenientes de diferentes áreas geográficas. Para el estudio de paternidad se utilizaron cinco genotipos (6s, 71s, 85s, 67s y 22s), provenientes de cruzamientos dirigidos con genotipos individuales de las diferentes accesiones.

Las muestras fueron traídas de Tacuarembó en bolsas de plástico a temperatura ambiente. Se ha observado que las mismas se mantienen frescas en el laboratorio de 2 a 3 días no siendo aconsejable mantenerlas a temperaturas de refrigeración ya que las mismas se marchitan.

Los experimentos de campo fueron diseñados basándose en la selección de parentales (femeninos y masculinos) de acuerdo al genotipo SCAR observado en geles de agarosa. De esta forma, se eligió un parental femenino homocigota, de alelo raro o de baja frecuencia en la población estudiada denominada 'genotipo tester', y el parental masculino heterocigota para ese locus o que presentase otros alelos.

3. Extracción de ADN genómico.

Para extraer ADN genómico en *L. bainesii* fue adoptado el procedimiento descrito por Edwards et al., (1991) para *Brassica napus* L., con algunas modificaciones menores, el cual resultó rápido y sencillo. Diez mg fue la cantidad de tejido joven que se encontró más adecuada para ser manipulada en tubos Eppendorf de 2 ml. El tejido proveniente de zonas de la planta en activo crecimiento (brotes jóvenes) fue macerado en presencia de nitrógeno líquido.

Protocolo de extracción de ADN genómico

Pesar 10 mg de muestra (preferentemente brotes jóvenes).

Macerar el tejido con un émbolo en presencia de nitrógeno líquido por 15 seg.

Agregar 400ml de buffer de extracción (200mM Tris-HCl pH 7.5; 250mM NaCl; 25mM EDTA; 0.5% SDS). Agitar por 5 segundos.

Centrifugar 10 min. a máxima velocidad y transferir 300ml del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf.

Mezclar con 300ml de isopropanol y dejar a temperatura ambiente por 2 min.

Centrifugar a máxima velocidad por 15 min.

Secar el pellet y disolver en 150ml de 1/3 de TE.

Centrifugar 10 min. y transferir el sobrenadante a un nuevo Eppendorf.

La calidad del ADN genómico de *L. bainesii* se evaluó en geles de agarosa 0.9%, evidenciándose las bandas con bromuro de etidio. Las mismas fueron comparadas con ADN de Lambda de peso molecular conocido (23 Kb) para evaluar su integridad. La concentración de ADN genómico se obtuvo midiendo la absorbancia de cada muestra espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm. Considerando que una unidad de absorbancia a 260nm equivale a 50 ng/ml de ADN, se pudo determinar la concentración aproximada de ADN de cada muestra.

En la Tabla 1 se muestran las relaciones de densidad óptica (D.O.) $D.O._{260}/D.O._{280}$ y

MATERIAL PARENTAL	D.O. ₂₆₀ /D.O. ₂₈₀ (nm)	Concentración de ADN (ng/μl)
422	1.88	560
424	1.87	583.9
10	1.88	677.8
424-b	1.92	281
425	1.92	266.5
425-b	1.95	219.1
426	1.85	285.5
427	1.75	286.5
427-b	1.88	545.1
450-1	1.85	235.9
450-2	1.93	626.5
71	1.81	305.4
450-b	1.89	465.4
1169	1.77	512.6
22	1.86	414.5
1167	1.82	532.8
6	1.9	428.6
1167-b	1.89	570.6
1168	1.95	548.4

Tabla 1. Lecturas espectrofotométricas, relación de $D.O._{260}/D.O._{280}$ y concentración de ADN estimada en el material parental partiendo de 10 mg de tejido vegetal.

la concentración de ADN estimada en diferentes materiales usados como padres para los cruzamientos.

El promedio de la concentración de ADN genómico partiendo de 10 mg de muestra fue de 439.27 ng / ml (rango de 219.1 a 677.8), correspondiendo a 57,11 mg de ADN promedialmente, mientras que la relación de densidad óptica $D.O._{260}/D.O._{280}$ media fue 1.87 (rango de 1.75 a 1.95), lo cual evidencia una escasa contaminación con proteínas y/o polisacáridos.

En la Figura 8 se observa el ADN genómico de *L. bainesii* obtenido con el protocolo antes mencionado, en comparación con ADN de Lambda de peso molecular conocido (23 Kb). El método empleado para la extracción de ADN produjo ADN genómico de alta calidad, por lo que el uso de este método resultó muy adecuado cuando se tienen numerosas muestras. El ensayo

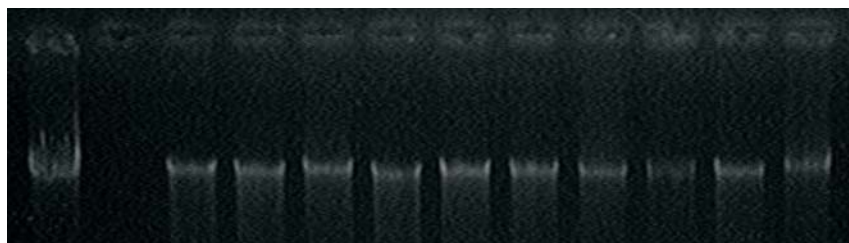


Figura 8. Gel de agarosa 0.8% en TAE 1X. ADN genómico (5 ml de solución) perteneciente a 10 muestras de *Lotononis*. El carril de la izquierda corresponde a ADN de Lambda de 23 Kb.

electroforético de las muestras evidenció ADN de alto peso molecular y sin degradación.

4. Amplificación del ADN genómico con marcadores RAPD.

Varios marcadores RAPD fueron analizados en los genotipos de las distintas accesiones, con los objetivos de determinar la variabilidad existente y desarrollar cebadores genoma específico (SCAR). Para esto se probaron 14 RAPD (Operon Technologies Inc., Alameda, CA), cuya secuencia es reportada en la Tabla 2, y descripta por Kongkiatngam et al. (1996).

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen final de 20 ml conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 0.4 mM de cebador, 1.5 U de *Taq* ADN Polimerasa (ATGen) y 40 ng de ADN, en un termociclador Genius (Technique, Cambridge, Ltd.). Las condiciones de amplificación descriptas por Kongkiatngam et

al., (1996) fueron las siguientes: una etapa de desnaturalización a 94°C por 5 min seguida de 35 ciclos de 92°C por 1 min, 36°C por 1 min, 72°C por 2 min y una etapa de extensión final de 6 min. a 72°C.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1.4% (Sigma, St. Louis, MI, USA) usando buffer TAE (40 mM de Tris base, 20 mM de acetato de sodio, 1 mM de EDTA, ácido acético glacial, pH 7.2), con un voltaje de 5V/cm. La visualización de las bandas se realizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se empleó como referencia de peso molecular ADN Ladder 100 pb (Promega).

Se observaron un total de 161 marcadores RAPD con un promedio de 11.2 marcadores por muestra corrida, en un rango de 8 a 12. Los productos de amplificación obtenidos se encontraron en un rango de aproximadamente 250 a 1300 pb y los patrones RAPD, con grados de similitud variables,

Cebador	Secuencia	Cebador	Secuencia
G-03	GAGCCCTCCA	H-04	GGAAGTCGCC
G-04	AGCGTGCTG	H-06	ACGCATCGCA
G-05	CTGAGACGGA	H-07	CTGCATCGTG
G-06	GTGCCTAACC	H-09	TGTAGCTGGG
G-16	AGCGTCCTCC	H-12	ACGCGCATGT
G-17	ACGACCGACA	H-14	ACCAGGTTGG
H-02	TCGGACGTGA	H-15	AATGGCGCAG

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para análisis con RAPDs en *L. bainesii* Baker.

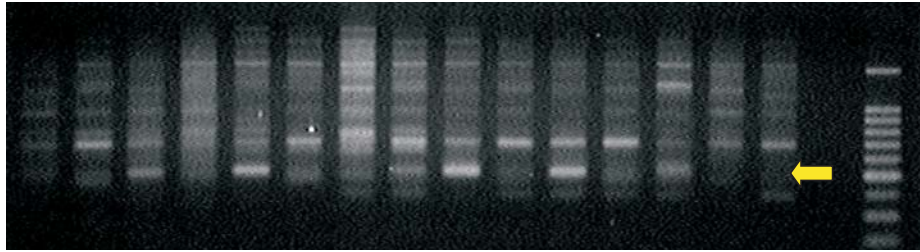


Figura 9. Polimorfismo observado en el material parental mediante el análisis con el marcador RAPD G-17. La flecha indica uno de los fragmentos clonado, secuenciado y utilizado para desarrollar el marcador SCAR. Último carril: marcador de peso molecular (100 pb Promega).

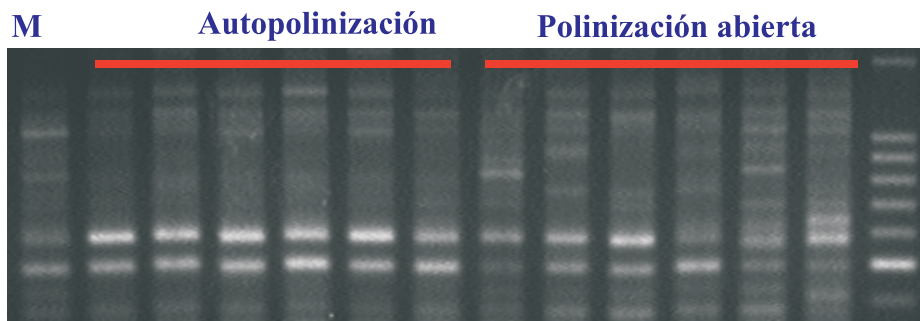


Figura 10. Análisis RAPD con el cebador G-17 de un genotipo usado como madre (M) y su progenie proveniente de autofecundación y de polinización abierta. Último carril: marcador de peso molecular (100 pb Promega).

sugieren una evidente distancia genética entre las accesiones (datos no mostrados). En la Figura 9 se muestra el patrón de bandas del material parental usando el cebador G-17.

El análisis con marcadores RAPD reveló también polimorfismo entre progenies provenientes de autopolinización y polinización cruzada, lo cual fue observado con diferentes decámetros. En la Figura 10, se puede observar el polimorfismo obtenido en progenies provenientes de la misma madre, en la cual algunas flores fueron autofecundadas manualmente y otras no fueron manipuladas, permitiendo de esta forma la polinización por otras plantas.

5. Clonación y secuenciación de los marcadores RAPD.

A partir de la década de 1960 la genética recibió un enorme impulso gracias a la identificación de numerosas enzimas que actúan

sobre los ácidos nucleicos. El aislamiento y caracterización de estas enzimas en efecto, ha hecho posible o facilitado mucho el análisis de la estructura y de las funciones del material hereditario. La posibilidad de utilizar estas enzimas, combinadas con la demostrada capacidad de introducir moléculas de ADN (denominados 'plásmidos') en las células bacterianas, dio paso a la puesta a punto y a la utilización de las técnicas hoy conocidas como *ingeniería genética*. El nuevo sector de estudio comprende numerosas metodologías, las cuales permiten la manipulación de las secuencias nucleotídicas y la construcción *in vitro* de nuevas moléculas de ADN, uniendo secuencias provenientes de diversas fuentes. Estas nuevas secuencias –ADN recombinante– pueden ser transferidas, mediante 'vectores' oportunos, como p. ej. los plásmidos, al interno de células huésped donde pueden ser propagadas y reproducidas (clonadas) en un número elevado de copias (Figura 11).

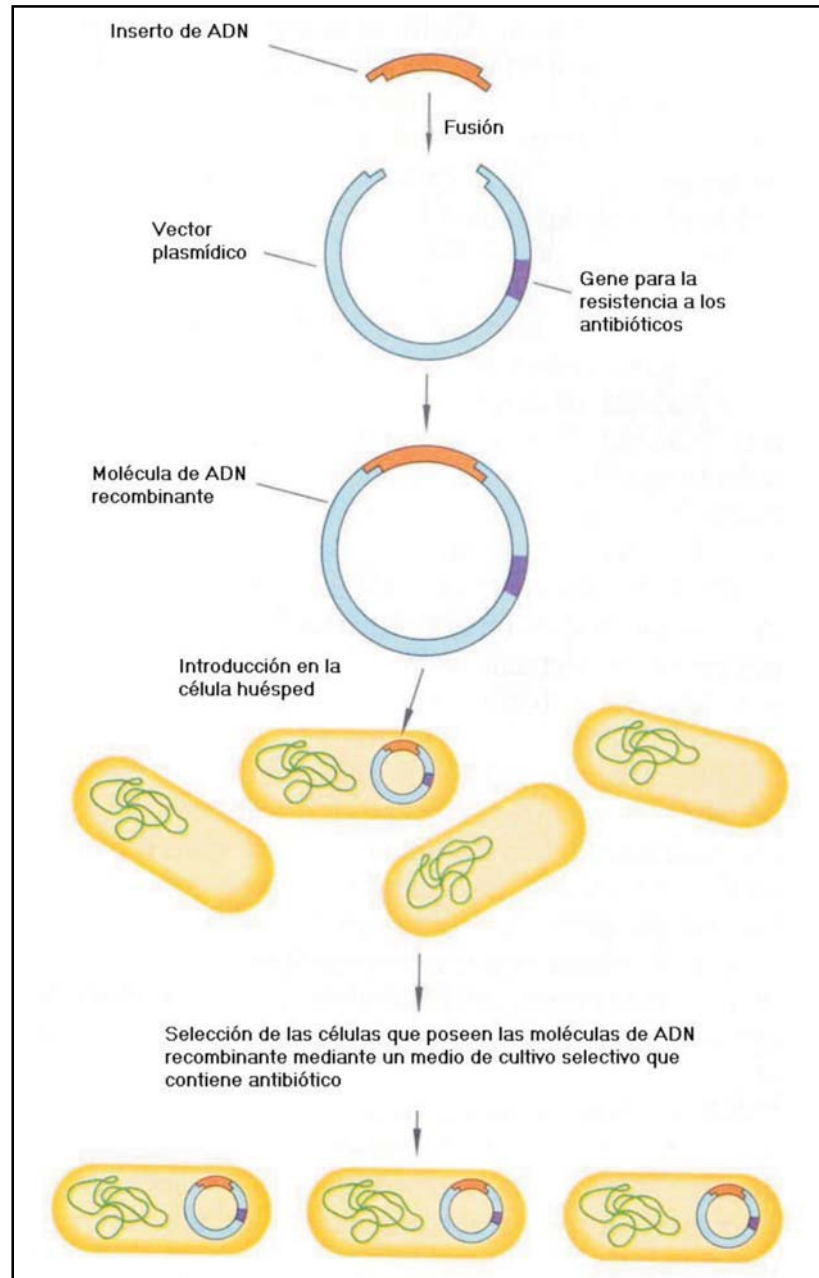


Figura 11. Clonación de productos de PCR en un plásmido. Adaptado de Watson et al. (1994).

Mediante estos elementos de ingeniería genética es posible entonces obtener un número elevado de copias de un fragmento de ADN de interés contenido en un 'vector de clonación' (en nuestro caso un plásmido bacteriano), el cual posee una serie de características propias que los hacen muy aptos para ser empleados para la secuenciación del inserto.

Los plásmidos bacterianos son moléculas de ADN de doble cadena, circulares y cerrados, con una dimensión variable entre 1 más de 200 kb, que se replican autónomamente en la célula bacteriana debido a la presencia en su propia secuencia de un 'origen de replicación'. Los vectores plasmídicos han sido modificados con el fin de contener un número elevado de sitios

únicos para la acción de las enzimas de restricción (denominado 'polylinker'), las cuales permiten la integración y el clonado de fragmentos de ADN exógeno. Otra característica importante presente en estos plásmidos es la presencia de genes marcadores seleccionables como p. ej. aquellos que confieren la resistencia a los antibióticos y que permiten diferenciar las colonias bacterianas que lo contienen. También pueden presentar la información nucleotídica para la hibridación de iniciadores universales que permiten la amplificación por PCR; entre estos iniciadores se puede localizar el fragmento de ADN inserto de manera de permitir su amplificación selectiva.

En *L. bainesii*, a partir del análisis de genotipos con los distintos marcadores RAPD se seleccionaron las bandas de 500 y 600 pares de bases (obtenidas con el marcador G-17) para ser clonadas, ya que las mismas están presentes en algunos y ausentes en otros (bandas polimórficas).

De esta forma, las bandas de 500 y 600

pares de bases fueron extraídas del gel de agarosa y eluidas, incubándose las mismas 20 min a 65°C. Posteriormente, fueron empleados 4 ml del gel derretido (conteniendo el producto de PCR) en la reacción de clonación, donde se insertó el fragmento de ADN en el vector PCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen); las células competentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5-a, fueron transformadas químicamente

En la Figura 12 se puede observar el crecimiento de las colonias bacterianas, tanto las que fueron transformadas exitosamente (colonias blancas) como las que no aceptaron el inserto en el vector (colonias azules). También se observa la digestión del ADN plasmídico con la enzima de restricción Eco R/I para verificar la presencia del inserto dentro del vector.

Las células de *E. coli* transformadas crecieron durante toda la noche a 37°C en un medio selectivo LB (Luria-Bertani Broth: 1%

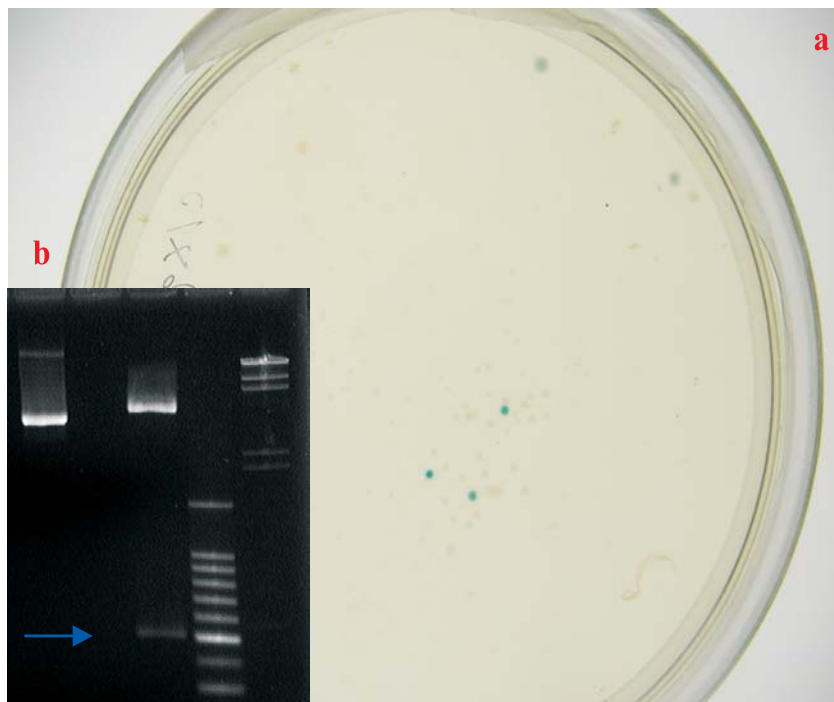


Figura 12. En **a** puede observarse el crecimiento de las colonias transformadas con el plásmido recombinante (colonias blancas) y las colonias con vector sin inserto (colonias azules). En **b** se muestra el ADN plasmídico sin digerir y digerido. En este último caso puede observarse el fragmento de 500 pb clonado (flecha).

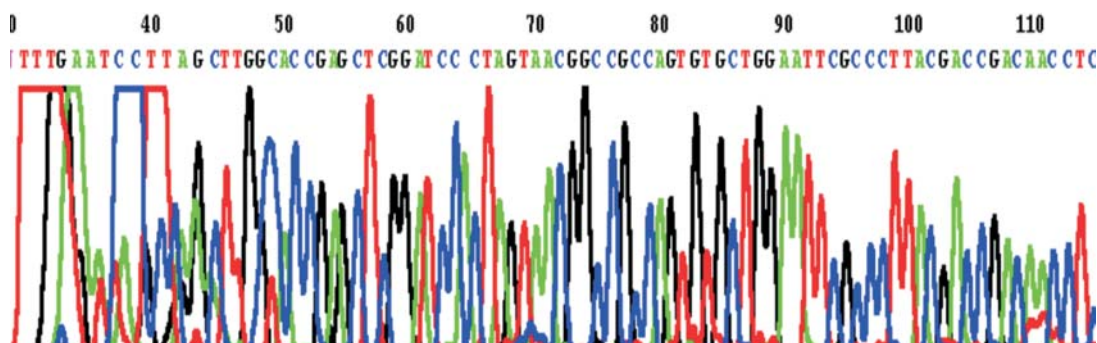


Figura 13. Perfil de secuenciación que se obtiene en un secuenciador automático capilar ABI310 (PE Biosystems, La Jolla, CA., USA).

Bacto-tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl), conteniendo 50 mg/ml de ampicilina y 0.8 mg/ml de X-gal. El ADN plasmídico se purificó a partir de 25 ml de un cultivo líquido de *E. coli* usando el kit de purificación Concert (Life Technologies). El ADN plasmídico fue sometido a un análisis con enzimas de restricción para corroborar la inserción del fragmento de ADN deseado, realizándose además una reamplificación del fragmento, tal como lo sugieren los fabricantes.

Las reacciones de secuenciación a partir del ADN plasmídico se llevaron a cabo usando un kit de secuenciación 'Applied Biosystems Perkin Elmer Big Dye Terminator' (PE Biosystems, Warrington, UK), cebadores M13 universales sentido y antisentido, y un secuenciador automático capilar ABI310 (PE Biosystems, La Jolla, CA., USA). En la Figura 13 puede observarse el perfil de secuenciación obtenido para uno de los fragmentos.

La reacción de secuenciación dio como resultado la secuencia completa de los fragmentos de 500 y 600 pb clonados. A continuación se presenta la secuencia genómica de las mismas, estando representado en color azul la secuencia decamérica correspondiente al cebador RAPD G-17 que diera origen a las bandas y subrayada la información propia del genoma de *Lotononis* empleada para generar los cebadores específicos

Secuencia 500 pb

ACGACCGACAGTATAAGCAGCGGAATAAAAT
AAATAGTATCAGTTCATAGTACTACTCTAGGG
AAAATATAACATAACATAAAATAAGCCCTCC
CAAGTATCCCTAGAGCATAAGTCACATCCTC
CCGTCTCTGACACCGGAGTGTCATCAATCACA
TCAATAATATCATCCATACCTAACACACAAG
AGGAGAGAGGAGTTAGTTACATAACTCATCA
TATAAGTTACAATTAGAAAGAACTAAGAGTA
ATCAATCACAATGCCATGTGTATCGTCTCGC
AACTAAACCAAGTCGACTCAGGATTACACAC
CGTGTGTAATGATCTACTACTCTCTAGGAAAG
GCATTGTAGAACCACACTCTCGCGCACGCAC
TTACCTAGGCGATCCATCGCACGAACCTATCA
CACAAGGTTAGGTAGTATTCGAGACATGCTCC
CTAACGACCTGGATATCGATCTAGAGGT**TGTC
GGTCGT**

Secuencia 600 pb

ACGACCGACAACAGGACGAGTAAATGGTTT
CGAAAATAAAGGATTGAATATAAAGTGAAAA
GAACTGGAATTCGGGAACCTTGAATGTATTG
AAATGACAAGGCTTAAAAGAAATGACTTAAA
ATGGAAAGGCAAGAATATAAAAATGCTGTAA
GTAAATGTGCAGAATGATTAATAACAGAGAA
AGTAAAGTGTGGGAATCGACAGATAGAATT
AACTTTTCATTGAATAAAAATGGAAGATTAC
ATGGTGTCTCCGTTATCTGCTTGTGTGAGATG
TTAGGAGTAACCAGAATCAACCTCTTTACAA
TCTGAAATCCTACTATTTATAGAACAACAAAA
ATAAACTGCCTATCTAATCTATTACAAGTGTA

AGACCGATTTCAAACTTGGCCACAACCTGCTAA
 ATGTTTGAATTTGAATCCTAAGTTTGAAAACCTG
 CTTTTGTCTTCGATTCTGCAAGCTTCGACATCAG
 TCTTGTGTTTTGTCTTCGACGCTTCAGGCTTCGAC
 ATCAGTCTTCACTTCGTTCTTCGACATCTTTGCCA
 TTTGATTCTTGATGATTGCTTCT**TGTCGGTCTGT**

Se buscó homología de secuencia de los fragmentos RAPD secuenciados en la base de datos del GenBank utilizando el software BLAST (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) no encontrándose similitudes significativas con las secuencias depositadas.

Estas secuencias fueron depositadas en el GenBank, en la división de base de datos genómicos (dbGSS, Genome Survey Sequences) con el Número de acceso CC149835 y CC149836 respectivamente, resultando las primeras secuencias reportadas en el género *Lotononis*.

6. Diseño de marcadores SCAR.

Utilizando la información de las dos secuencias de las bandas RAPD clonadas, se sintetizaron ocho oligonucleótidos para ser utilizados como marcadores SCAR.

Los dos pares de cebadores SCAR obtenidos de cada banda RAPD fueron diseñados empleando dos métodos; el primero de ellos consistió en la extensión del cebador RAPD desde su extremo 3', con lo cual se obtuvieron dos cebadores SCAR constituidos por los 10 nucleótidos correspondientes al cebador RAPD más 14 nucleótidos adicionales adyacentes a estos (SCAR I y III).

En el segundo método se utilizó un programa de computación denominado Primer3 Software, versión 0.9 (Rozen y Skaletsky, 1998), el cual identificó secuencias internas adecuadas para el análisis por PCR (SCAR II y IV). Al programa se le pidió que identificara el par de cebadores de 20 nucleótidos en la secuencia de forma de optimizar las condiciones de reacción de amplificación y que amplificase un fragmento posible de ser observado en geles de agarosa.

Los cebadores diseñados a partir de fragmentos RAPD secuenciados fueron los siguientes (**S**: cebador sentido; **A**: cebador antisentido):

SCAR I: S: ACGACCGACAGTATAAGCAGCGGA
 A: ACGACCGACAACCTCTAGATCGAT

SCAR II: S: AGCCCTCCCAAGTATCCCTA
 A: TGGATCGCCTAGGTAAGTGC

SCAR III: S: ACGACCGACAACAGGACGAGTAAA
 A: ACGACCGACAGAAGCAATCATCAA

SCAR IV: S: CTGGAATTCGGGAAGTTGAA
 A: CAGTTGTGGCCAAGTTTGA

7. Estudio de progenies procedentes de polinización abierta.

Sobre la base del comportamiento molecular de los marcadores SCAR se definieron 'plantas tester' a ser utilizadas como madres y genotipos a ser utilizados como padres, en forma tal de poder evidenciar si la progenie tuviese solamente alelos maternos (autofecundación) o extraños (polinización cruzada), como se ilustra en la Figura 14.

Estos marcadores SCAR fueron empleados en numerosas plantas observándose en general un perfil con 1 ó 2 bandas para el locus específico analizado. De esta forma, las plantas analizadas con un marcador SCAR que presentaron un genotipo molecular con una sola banda fueron elegidas como madres; en consecuencia, las progenies procedentes de su autofecundación deberían presentar una sola banda. Es de resaltar además, que estas plantas se encontraron en baja frecuencia en los genotipos estudiados. Teniendo en cuenta esta elección, se estudió el patrón de bandeo de 3 familias, correspondiendo cada una a 1 madre y 15 progenies, obtenidas por polinización abierta.

7.1. Amplificación del ADN genómico con marcadores SCAR.

Se emplearon diferentes condiciones de reacción y métodos de ciclado para optimizar la amplificación del ADN genómico de *L.*

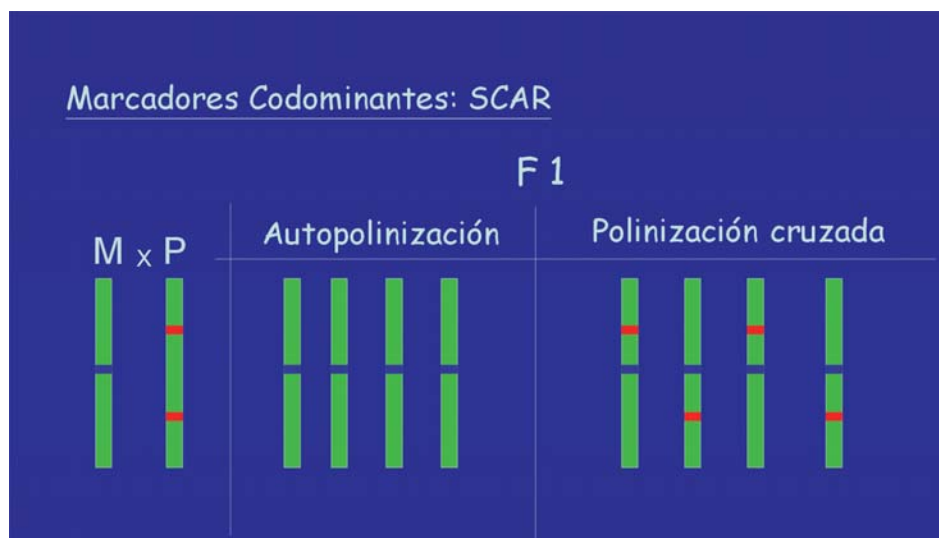


Figura 14. Diseño experimental basado en los marcadores SCAR. El 'genotipo tester' (M) es el empleado como madre, el padre (P) y la progenie (F1) en la cual viene analizado el perfil electroforético obtenido.

bainesii con los marcadores SCAR. Las condiciones de reacción seleccionadas fueron las siguientes: un volumen final de 20 ml conteniendo 100 ng de ADN genómico, 20 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 0.1 mM de EDTA, 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 0.2 mM de cada cebador, sentido y antisentido, y 1.5 U de Taq ADN Polimerasa (ATGen), realizada en un termociclador Genius (Techne Ltd., Cambridge, UK).

Para la reacción de PCR se utilizó una temperatura de hibridación variable, partiendo de una temperatura de 65°C, la cual va disminuyendo de a un grado en cada ciclo hasta llegar a una temperatura de hibridación de 60°C (touch-down profile). Las condiciones de ciclado usadas para las ampliificaciones con SCAR fueron las siguientes (Bryan et al., 2002): un paso inicial de desnaturalización durante 3 min. a 94°C; un ciclo de 3 min. a 94°C, 1 min. a 65°C, 1 min. a 72°C; seguido de cinco ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 65°C, 30 seg. a 72°C, disminuyendo 1 grado la temperatura de hibridación por ciclo; seguido de 24 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 60°C, 30 seg. a 72°C; y un paso final de extensión a 72°C durante 5 min. Los productos de amplificación fue-

ron separados en geles de agarosa 2% y teñidos en bromuro de etidio.

Estos marcadores específicos de *Lotononis* mostraron en muchos de los genotipos igual patrón de bandeo en los perfiles de electroforesis (bandas monomórficas). Todos los amplicones obtenidos con los cuatro marcadores SCAR diseñados fueron del peso esperado, observándose una o dos bandas; de hecho, en el caso de los SCAR III y IV se observó en muchos de los genotipos evaluados una o dos bandas, probablemente debiendo su diferencia a pequeñas inserciones/delecciones del fragmento, como fuese también reportado por Albertini et al. (2001).

Los 'genotipos tester' (empleados como plantas madre) elegidos para los experimentos de polinización abierta fueron plantas que presentaron una sola banda. En la Figura 15 se presenta el patrón de bandas de un 'genotipo tester' usado como madre y su progenie obtenida mediante autofecundación.

Como era de esperarse, la progenie presentó una única banda idéntica a la presente en la planta madre.

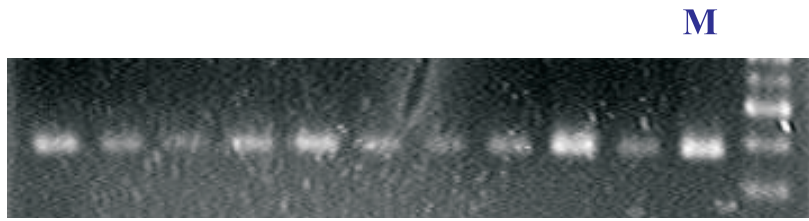


Figura 15. Patrón de bandeo de una progenie de 10 individuos procedentes de una autofecundación y su madre (M) obtenido con el SCAR II. El carril de la derecha corresponde al marcador de peso molecular (100 pb Promega).

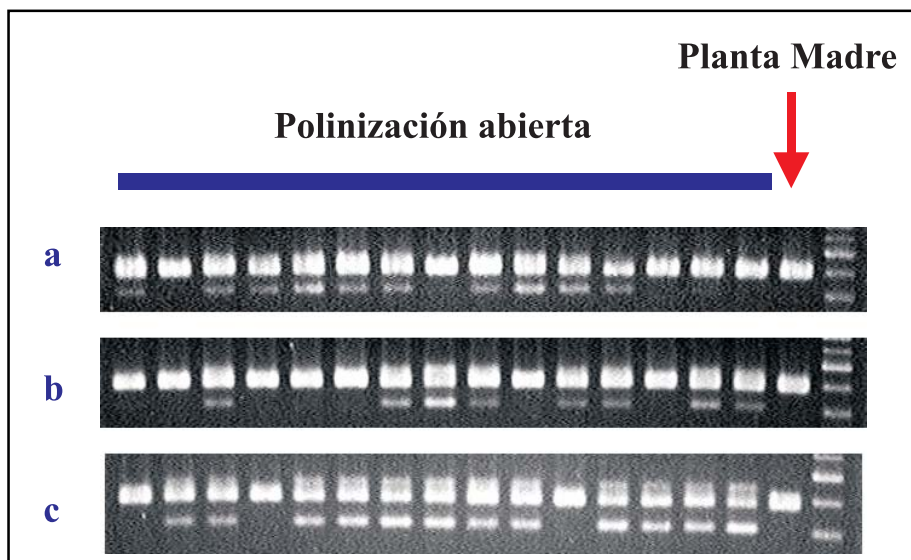


Figura 16. Patrón electroforético de 15 genotipos individuales procedentes de tres inflorescencias (a, b y c) originados por polinización abierta utilizando el SCAR II. El 'genotipo tester' usado como planta madre presenta una sola banda. El carril de la derecha corresponde al marcador de peso molecular (100 pb Promega).

Por otro lado, el patrón de bandeo de una progenie de 15 individuos provenientes de polinización abierta se muestra en la Figura 16. Como puede observarse, más de una banda está presente en 30 de los 45 individuos de la progenie (67%), revelando la contribución de un alelo no materno el cual es proporcionado por otra fuente de polen.

En algunos de los genotipos estudiados no fue posible determinar directamente el sistema reproductivo de la especie debido al fenotipo monomórfico observado en geles de agarosa/poliacrilamida. En estos genotipos donde los marcadores SCAR resultaron monomórficos, se evaluó la posibilidad de emplear marcadores CAPS con el

objetivo de generar marcadores polimórficos.

7.2. Empleo de polimorfismos de secuencia en amplicones SCAR evidenciados por enzimas de restricción (CAPS).

Los polimorfismos CAPS se basan en diferencias en la secuencia de un fragmento de amplificación originados por restricción causado por diferencias nucleotídicas (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) o por inserciones/delecciones que crean o eliminan sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (Tragoonrung et al., 1992; Konieczny y Ausubel, 1993). Esta metodología genera un nuevo tipo de marcador

molecular, el cual combina tanto técnicas de PCR como de RFLPs (los marcadores CAPS también son llamados PCR/RFLP). Es una técnica que requiere muy poca cantidad de producto de PCR (amplicones) y el sistema electroforético para revelar polimorfismos es sencillo.

Los ensayos con CAPS realizados en *Lotononis* consistieron en la digestión de amplicones SCAR con una o varias enzimas de restricción, donde el ADN digerido es separado en geles de agarosa o poliácridamida.

Los sitios de restricción en las secuencias genómicas de los dos fragmentos clonados fueron identificados utilizando un programa de software de uso público WebCutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>).

El análisis se concentró en los genotipos usados como padres para los cruzamientos en los cuales se encontraron bandas SCAR monomórficas, con el objetivo de convertirlas en bandas polimórficas. Estas enzimas mostraron en teoría al menos cinco sitios de restricción en el análisis previo de la secuencia (Tabla 3 y 4).

	Enzima	Número de cortes		Enzima	Número de cortes
1	«Alu I»	1	23	«Hae III»	1
2	«Apo I»	3	24	«Hga I»	1
3	«Asu II»	1	25	«Hind III»	1
4	«Bal I»	1	26	«Hinf I»	4
5	«Bbs I»	5	27	«Mae III»	1
6	«BsaO I»	2	28	« Mbo II »	6
7	«Bsc91 I»	5	29	«Mcr I»	2
8	«Bsg I»	1	30	«Mnl I»	1
9	«Bsi Y I»	1	31	«Msc I»	1
10	«BsiE I»	2	32	« Mse I »	5
11	«Bsl I»	1	33	«Mwo I»	1
12	«BspW I»	1	34	«Nla III»	1
13	«Bsr I»	1	35	«Nsp V»	1
14	«BstB I»	1	36	«Nsp7524 V»	1
15	«Cac 8 I»	1	37	«Pal I»	1
16	«Cfr I»	1	38	«Sfc I»	1
17	«Csp45 I»	1	39	«Sfu I»	1
18	«Dde I»	1	40	« Taq I »	7
19	«Eae I»	1	41	«Tfi I»	4
20	«Eco 57 I»	1	42	«Tru9 I»	5
21	«EcoR I»	2	43	«Tsp509 I»	4
22	«EcoR I*»	1	44	«TthHB8 I»	7

Tabla 3. Lista de enzimas de restricción identificadas a partir de la secuencia genómica del fragmento de 600 pb, empleada para el diseño del cebador SCAR III.

Enzima de Restricción	Número de cortes	Sitios de corte	Fragmentos esperados
Mbo II	6	258, 449, 477, 488, 516, 527	7
Taq I	7	31, 208, 460, 475, 499, 514, 538	8

Tabla 4. Fragmentos esperados de la digestión de los amplicones generados con el SCAR III empleando las enzimas Mbo II y Taq I.

De acuerdo a los sitios de restricción evidenciados, 2 enzimas de 44 posibles, *Taq I* y *Mbo II*, fueron elegidas para digerir los fragmentos SCAR.

Los amplicones obtenidos con el SCAR III fueron digeridos con estas enzimas de restricción usando temperaturas de incubación recomendadas para cada una de ellas (37°C para *Mbo II* y 65°C para *Taq I*) según recomiendan su fabricantes (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA y New England Biolabs, UK).

Volúmenes iguales de buffer de carga (95% de formamida, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.5 mg/ml de azul de bromofenol y xilen cianol) se agregaron a las muestras digeridas, las cuales fueron luego desnaturalizadas por 5 min a 95°C., incubadas en hielo, y finalmente sembradas en un gel de poli(acrilamida) desnaturalizante (5% de acrilamida, 7 M de Urea) en TBE 1 X (89 mM Tris-Borato, 2 mM de EDTA). Los geles se prepararon mediante la adición de 250 ml de APS al 10% y 100 ml de TEMED a 100 ml de una solución de acrilamida. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Sturdier (Amersham Biosciences Corp, SF,

USA) usando buffer TBE 1X.

El método de tinción con plata (Tixier et al., 1997) usado para revelar las bandas mostró fragmentos polimórficos entre los genotipos, permitiendo evidenciar una combinación de alelos en cruzamientos naturales. Cada material empleado como padre fue caracterizado previamente mediante la digestión con enzimas de restricción de manera tal de poder reconocer el aporte de cada uno en la progenie.

La representación esquemática de tres alelos (A1, A2 y A3) encontrados en 5 genotipos mediante la utilización de marcadores CAPS se muestra en la Tabla 5 y el correspondiente patrón electroforético en la Figura 17. El genotipo 22s actúa como madre ('genotipo tester') en un ensayo de polinización abierta (Figuras 17 y 18). A partir de la Figura puede establecerse al menos un 57% de alogamia, el cual se basa en la presencia de alelos no maternos en la progenie. En otro genotipo se encontró un mayor porcentaje de alogamia, alcanzando un valor de por lo menos un 80% (Figura 19).

Genotipos			
71s2	■		
67s		■	
6s3, 67s, 85s			■
<hr/>			
Alelos	A1	A2	A3

Tabla 5. Representación esquemática de la composición alélica de 5 genotipos encontrados con el SCAR III mediante un análisis PCR-RFLP usando la enzima *Taq I*.

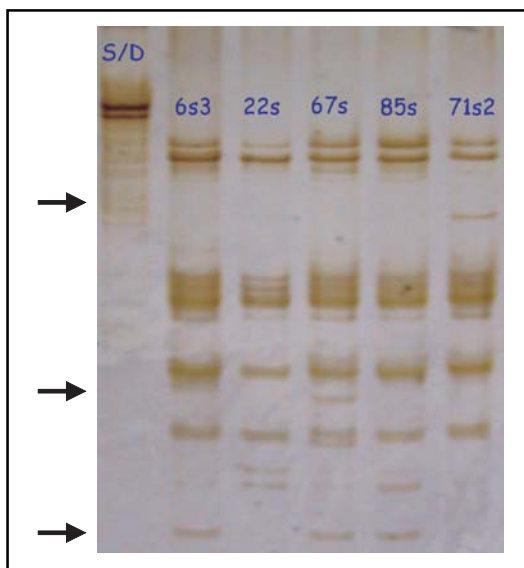


Figura 17. Gel de poliacrilamida mostrando la digestión enzimática de los amplicones de 5 genotipos, producidos por el SCAR III, usando la enzima de restricción *Taq* I. Las flechas indican los alelos considerados en el experimento de polinización abierta.

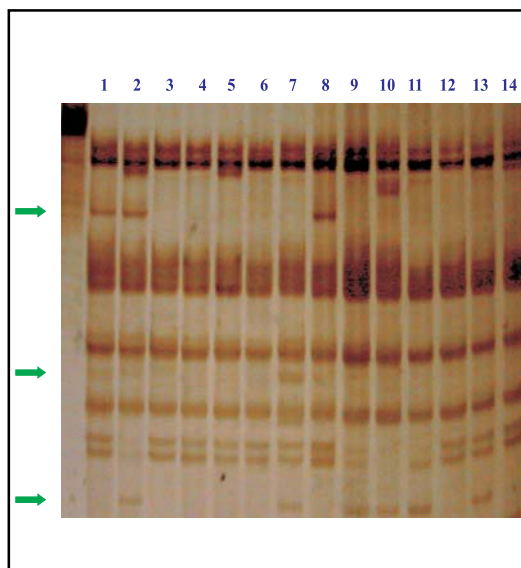


Figura 18. Patrón electroforético de una progenie proveniente de una polinización abierta del genotipo 22s, obtenido con el SCAR III al digerir los amplicones con la enzima *Taq* I. Las flechas indican los 3 alelos previamente identificados. Los carriles 3, 4, 5, 6, 12 y 14 presentan el mismo patrón que la planta madre (autógamas).

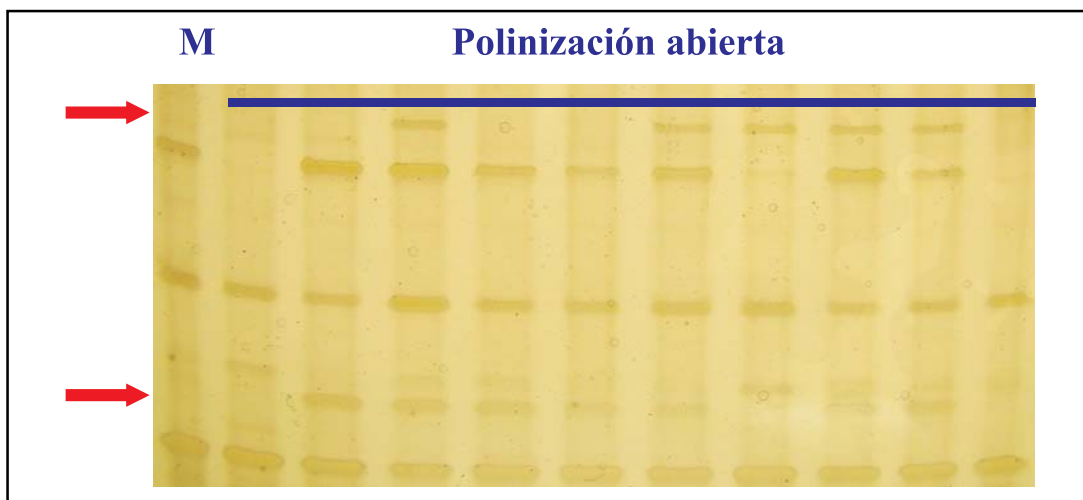


Figura 19. Análisis con CAPS utilizando la enzima *Taq* I en el genotipo 71 (M) y su progenie proveniente de polinización abierta. Las flechas indican los alelos no maternos presentes en la progenie.

En general, el número de bandas observado luego de la digestión con la enzima de restricción fue menor al esperado. El estudio realizado con la enzima de restricción *Mbo* II no reveló polimorfismo entre los cinco genotipos estudiados, por lo que no se realizó este análisis en la progenie.

8. Conclusiones

De los estudios realizados con plantas de polinización abierta usando marcadores SCAR y CAPS en diferentes genotipos y loci, se obtuvieron valores de alogamia en la progenie comprendidos entre el 50% y 80% en condiciones naturales.

Los marcadores SCAR representan una técnica potente para estudiar la variación alélica en un locus específico, presentando ventajas en relación con los marcadores dominantes como p. ej. RAPD, los cuales han sido usados en otros estudios para determinar sistemas reproductivos. Los marcadores SCAR desarrollados a partir de fragmentos RAPD resultaron ser más confiables, repetitivos y de más fácil análisis que los marcadores RAPD. Los marcadores CAPS utilizados sobre los amplicones SCAR tienen la ventaja adicional de convertir fenotipos moleculares monomórficos en bandas moleculares polimórficas pudiendo revelar entonces variaciones alélicas. Por otro lado, se pudo utilizar los marcadores CAPS en plantas madre fenotípicamente monomórficas con marcadores SCAR para analizar el sistema reproductivo, ampliando el número de genotipos que pueden ser evaluados.

Mediante el uso combinado de marcadores SCAR y CAPS, las progenies de todas las plantas utilizadas como madre (tanto plantas con una sola banda o con dos bandas) pudieron ser evaluadas para detectar polinización cruzada. Las herramientas moleculares desarrolladas para determinar el sistema reproductivo de *L. bainesii* fueron efectivas y adecuadas para revelar alelos adicionales presentes en la progenie, además del alelo presente en la planta madre, lo cual demuestra altos niveles de alogamia.

Por todo lo expresado anteriormente, se concluye que el mejoramiento genético de *L. bainesii* debe ser llevado a cabo considerando a esta especie como alogama y los semilleros deben ser realizados en presencia de polinizadores (abejas).

9. Agradecimientos

Los autores desean agradecer a las diferentes personas de INIA que han contribuido a la realización del presente trabajo: M. Zarza, R. Mérola, A. Viana, E. Solares, M. B. Bonilla, M. Echenique, M.M. Albicette, L. Orrego y L. Gutierrez por su colaboración en invernáculo, campo experimental, labo-

ratorio, difusión y administración. A R. Zoppolo por su incesante colaboración bibliográfica y al Jefe del Programa de Pasturas D. F. Risso, al Coordinador de la Unidad de Biotecnología M. Francis - F. Capdevielle y a los directores de INIA Tacuarembó (E. J. Berretta) e INIA Las Brujas (C. Paolino y A. Rabuffetti).

Este trabajo fue apoyado por INIA y el Acuerdo de trabajo N° 308 entre INIA, Uruguay, y la Universidad de Florida, USA, y financiado por el Proyecto N° 3 INIA BIDII y el Fondo Clemente Estable N° 8151, DINACYT, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay.

10. Bibliografía

- Albertini, E.; Barcaccia, G.; Porceddu, A.; Sorbolini, S. and Falcinelli, M.** 2001. Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties. *Molecular Breeding* **7**: 293-300.
- Allard, R.W.** 1980. Principios de la mejora genética de plantas. Editorial OMEGA, S. A., Barcelona, España.
- Barrel, P.J.; Richardson, J.E. and Gardner, R.C.** 1997. Molecular markers and experimental pollinations reveal self-fertility and high levels of natural inbreeding in the New Zealand endemic tree *Vitex lucens* (puriri). *New Zealand Journal of Botany* **35**: 535-543.
- Bewley, J.D.; Hempel, F.D.; McCormick, S. and Zambryski, P.** 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, cap. 19. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists.
- Bonierbale, M.** 2000. Genetic mapping, molecular markers and transgenics. CIP course.
- Botstein, D.; White, R.L.; Skolnick, M. and Davis, R.W.** 1980. Construction of a genetic linkage map using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314-331.
- Bryan, G.J.; McLean, K.; Bradshaw, J.E.; De Jong, W.S.; Phillips, M.; Castelli, L. and Waugh, R.** 2002. Mapping QTLs for resistance to the cyst nematode *Globodera pallida* derived from the wild potato species *Solanum vernei*. *Theor Appl Genet* **105**: 68-77.
- Bullita, S.; Floris, R.; Hayward, M.D. and Veronesi, F.** 1993. The reproductive system of a *Lolium rigidum* Gaud. population from Sardinia and its implications for breeding. *Plant Breeding* **111**: 312-317.
- Byth, D.E.** 1964. Breeding system and

chromosome number in *Lotononis bainesii* Baker. *Nature* **202**, 830.

Caraway, V.; Carr G.D. and Morden C.W. 2001. Assessment of hybridization and introgression in lava-colonizing hawaiian *dubautia* (*Asteraceae: Madiinae*) using RAPD markers. *American Journal of Botany* **88**(9): 1688-1694.

Cole, C.T. and Kuchenreuther, M.A. 2001. **Molecular markers reveal little genetic differentiation among *Aconitum noveboracense* and *A. columbianum* (*Ranunculaceae*) populations.** *Am. J. Botany*. **88**: 337-347.

Dalla Rizza, M.; Real, D.; Quesenberry, K.H. and Albertini, E. 2004 Plant reproductive system determination under field conditions based on codominant markers (enviado a publicación, *Journal of Genetics&Breeding*).

Devey, M.E.; Delfino-Mix, A.; Kinloch, B.B.J., and Neale, D.B. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 2066-2070.

Dorado, G. 2001. Marcadores moleculares. *Fruticultura Profesional* **120**: 82 – 87.

Edwards, K.; Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*. **19**: 1349.

FAO. On Line Database. 2003. Grassland and Pasture Crops, Grassland Index, *Lotononis bainesii* Baker 'http://www.fao.org/ag/ AGP/ AGPC/ doc/ GBASE/ Data/ pf000048.HTM'.

Ferguson, J.M. and Grabe, D.F. 1986. Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. *Crop Science*. **26**: 170-176.

Ferreira, M. and Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa, Brasilia.

Galussi, A.A.; Cavedo, A.; Reinoso, P.D. and Moya, M.E. 1997. Caracterización de cultivares de *Lolium perenne* L. y *Lolium multiflorum* Lam. por electroforesis de las proteínas de las semillas. *Agriscientia*. **14**: 25-29.

García-Mas, J.; Graziano, E.; Aranzana, M.J.; Monforte, A.; Oliver, M.; Ballester, J.; Viruel, M.A. and Arús, P. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, cap 3. F. Nuez, J.M. Carrillo, Eds. Sociedad Española de Genética, Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Universidad Politécnica de Valencia.

Gardiner, S.E.; Forde, M.B. and Slack, C.R. 1986. Grass cultivar identification by sodium dodecylsulphate gel electrophoresis. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. **29**: 193-206.

Heidenreich, S.C. and Kruse, M. 1999. Verification of perennial ryegrass blends (*Lolium perenne* L.) using bulk seed storage protein

electrophoresis. *Plant Varieties and Seeds*. **12**: 1-9.

Hutton, E.M. 1960. Flowering and Pollination in *Indigofera spicata*, *Phaseolus lathyroides*, *Desmodium uncinatum*, and some other tropical pasture legumes. *Empire Journ. of Exper. Agric.* **28** (111): 235-243.

Kittelson, P.M. and Maron, J.L. 2000. Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* **87** (5): 652-660.

Kollmann, J.; Steinger T. and Roy B. 2000 Evidence of sexuality in european *Rubus* (*Rosaceae*) species based on AFLP and allozyme analysis. *American Journal of Botany* **87**(11): 1592-1598

Kongkiatngam, P.; Waterway, M.J.; Coulman, B.E. and Fortin, M.G. 1996. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica* **89**: 355-361.

Konieczny, A. and Ausubel, F. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* **4**(2): 403-410.

Macaulay, M.; Ramsay, L.; Powell, W. and Waugh, R. 2001. A representative, highly informative "genotyping set" of barley SSRs. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 801-809.

Martínez, E. J. y Quarán, C. L. 2000. Dos marcadores moleculares específicos de la apomixis en *Paspalum notatum*. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000*, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

Michelmore, R.W.; Paran, J. and Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 9828-9832.

Möller, M. and Spoor, W. 1993. Discrimination and identification of *Lolium* species and cultivars by rapid SDS-PAGE electrophoresis of seed storage proteins. *Seed Sci. d Technol.* **21**: 213-223.

Murray, B.G. and Hammett, K.R.W. 1992. Seed set and breeding system in the pepino *Solanum muricatum* Ait., Solanaceae. *Scientia Horticulturae* **49**(1-2): 83-92.

Olfelt, J.P.; Furnier, G.R. and Luby, J.J. 2001. What data determine whether a plant taxon is distinct enough to merit legal protection?. A case study of *Sedum integrifolium* (Crassulaceae). *Am. J. of Botany*. **88**: 401-410.

Olson, M.; Hood, L.; Cantor, C. and Botstein, D. 1989. *Science*. **245**: 1434-1435.

Oram, R.N. 1990. *Register of Australian Herbage Plant Cultivars*. Third edition, CSIRO.

Parchment Press, Melbourne, Australia.

Paran, I. and Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 985-993.

Piepho, H.P. and Koch, G. 2000. Codominant analysis of banding data from a dominant marker system by normal mixtures. *Genetics*. **155**: 1459-1468.

Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* **9**: 275-280.

Rallo, P.; Dorado, G. and Martín, A. 2001. Aplicación de microsatélites en pruebas de paternidad. *Fruticultura Profesional*. **120**: 92 – 94.

Real, D.; Dalla Rizza, M.; Quesenberry, K.H. and Echenique, M. 2004. Reproductive and molecular evidence for allogamy in *Lotononis bainesii* Baker. *Crop Science* (aceptado para publicación, Vol. 44 N°2).

Rivas, M. 2001. Sistema reproductivo y estructura genética de poblaciones de *Bromus auleticus* Trinus Ex-Nees (Poaceae). Estudio mediante isoenzimas. *Agrociencia*, Vol. V **1**, 32-40.

Rozen, S. and Skaletsky, H.J. 1998. Primer 3. Code available at http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html.

Seaney, R.R. 1964. Cross and self seed set in birdsfoot trefoil plants selected for self-fertility. *Crop Science*, **40** (4): 440-441.

Skerman, P.J.; Cameron, D.G. and Riveros, F. 1991. *Tropical Forage Legumes*. FAO Rome, Italy.

Smith, W.K. and Gorz, H.J. 1965. Sweetclover Improvement. *Advances in Agronomy*. **17**: 163-231.

Struss, D.; Boritzki, M.; Glozer, K. and Southwick, S.M. 2001. Detection of genetic diversity among populations of sweet cherry (*Prunus avium* L.) by AFLPs. *J. Hort. Sci. & Biot.* **76**: 362-367.

Stuber, C.W.; Lincoln, S.E.; Wolf, D.W.; Helentjaris, T. and Lander, E.S. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in an hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*. **132**: 823-839.

Tixier M.H.; Sourdille P.; Röder M.; Leroy P. and Bernard M. 1997. Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver-nitrate staining method. *J. Genet. Breed.* **51**: 175-177.

Tragoonrung, S.; Kanizin, V.; Hayes, P.M. and Blake, T.K. 1992. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor. Appl. Genet.* **84**, 1002-1008.

Van Wyk, B-E. 1990. Studies in the genus *Lotononis* (Crotalaria, Fabaceae). 13. Two new

species and notes on the occurrence of cleistogamy in the section *Leptis*. *Bothalia* **20** (1): 17-22.

Van Wyk, B-E. 1991. *A Synopsis of the Genus Lotononis* (Fabaceae: Crotalarieae). Contributions from the Bolus Herbarium N° **14**. Rustica Press (PTY), Wynberg, Cape, South Africa.

Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijtens, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407-4414.

Watson, D.J.; Gilman M.; Witkowski J. and Zoller M. 1994. DNA ricombinante. Zanichelli editore S.p.A., Bologna.

Welsch, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**: 7213-7218.

Wendt, T.; Ferreira Canela, M.B.; Gelli de Faria, A.P. and Iglesias Rios, R. 2001. Reproductive biology and natural hybridisation between two endemic species of *Pitcarnia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **88** (10): 1760-1767.

Weng, C.; Kubisiak, T.L. and Stine, M. 1998. SCAR markers in a longleaf pine x slash pine F₁ family. *Forest Genetics* **5**(4): 239-247.

Williams, J.G.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

11. Lista de abreviaturas

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

APS: Ammonium persulfato

CAPS: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

DNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

EDTA: Ethylenedinitrilo tetraacetic acid

LB broth (Luria-Bertani Broth): 1% Bactotryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl

MAS: Marker Assisted Selection

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SCAR: Sequenced Characterized Ampified Regions

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

TAE: Tris acetate EDTA

Taq: *Thermophilus aquaticus*

TBE: Tris Boric acid EDTA

TE: Tris EDTA

TEMED: N,N,N,N'-tetramethylenediamine

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D galactosidase

Impreso en Diciembre de 2003 en
PRONTOGRÁFICA S.A.
Cerro Largo 850 - Tel.: 902 31 72
E-mail: pgrafica@adinet.com.uy
Dep. Leg. 331.696/04