

MARCADORES MOLECULARES AFLP DE PLANTAS DONADORAS DE ALISO *Alnus acuminata* H.B.K.

RESUMEN

El aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.) es un recurso forestal de gran potencial, debido a su rápido crecimiento, a su asociación con fijadores de nitrógeno y a sus ventajas ecológicas. El Grupo de Biodiversidad y Biotecnología (Facultad de Ciencias Ambientales) de la U.T.P. logró la embriogénesis somática de esta especie, pero era necesario verificar la estabilidad genética de los materiales embriogénicos. En este trabajo se muestra la obtención de marcadores moleculares AFLP de plántulas de aliso donadoras de hojas para el proceso de embriogénesis somática, lo que permitirá realizar estudios de estabilidad genética de los callos embriogénicos y los embriones somáticos o bien de caracterización molecular de la especie.

PALABRAS CLAVES: aliso, *Alnus*, embriogénesis somática, estabilidad genética, marcadores moleculares, AFLP.

ABSTRACT

The alder tree (*Alnus acuminata* H.B.K) is a woody forest resource that show enormous potential given its rapid growth, its association with nitrogen fixers, and its ecological advantages. Biodiversity and Biotechnology Group (Faculty of Environmental Science) from U.T.P. obtained somatic embryogenesis in this specie but it was necessary to verify the genetic stability of the embryogenic materials. In this work it show the obtaining of molecular markers AFLP from plantlet donors of alder leaves for the process of somatic embryogenesis, which will allow to make the study of genetic stability of embryogenic calluses and somatic embryos or molecular characterization of this species.

KEYWORDS: alder tree, *Alnus*, somatic embryogenesis, genetic stability, molecular markers, AFLP.

1. INTRODUCCION

Alnus acuminata (perteneciente a la familia Betulaceae) es el árbol de uso múltiple, de más rápido crecimiento en la zona de alta montaña de los Andes (1), de tal manera que los bosques de aliso juegan un importante papel en la protección de las cuencas hidrográficas, en el control de la erosión, al tiempo que son empleados en sistemas agroforestales (2) (3). Debido a estas características, ha sido introducido en países africanos (4), así como también en Nueva Zelanda (5). En Colombia se encuentra de forma natural en los bosques secos, húmedos y muy húmedos del montano y montano bajo (1400 a 3200 m), en especial en las provincias de Caldas, Risaralda, Quindío y Huila, con temperaturas entre 7°-17° C, precipitaciones anuales de 1.000 a 2.500 milímetros y alta humedad relativa.

Una característica sobresaliente de esta especie, son sus raíces superficiales con nódulos fijadores de nitrógeno

atmosférico por simbiosis con el actinomicete *Frankia* spp (1), por lo que resulta muy adecuada para el mejoramiento de suelos, pues se ha estimado que la acumulación de nitrógeno en el suelo oscila entre 60 y 209 kilogramos por hectárea. Por esta razón se emplea en sistemas agroforestales, asociado con cultivos tales como pasturas y café principalmente (6). Además crece a pleno sol e invade los sitios expuestos. A menudo, se encuentra en las riberas de los ríos y en laderas de pendientes pronunciadas. Su rápido crecimiento y gran plasticidad para crecer en múltiples condiciones ambientales, al igual que la fácil descomposición de la hojarasca y producción de materia orgánica, hacen del aliso una especie recomendable para plantaciones protectoras productoras en cuencas hidrográficas (3).

En *Alnus acuminata* H.B.K spp *acuminata* se han publicado escasos estudios en toda América Latina enfocados a la conservación de la especie utilizando biotecnología, sobresalen los trabajos en la

LUIS GONZAGA GUTIERREZ

Biólogo Ph.D

Profesor asociado

Laboratorio de Biotecnología Vegetal

Grupo de Biodiversidad y

Biotecnología

Facultad de Ciencias Ambientales

Universidad Tecnológica de Pereira

micropropagación por organogénesis de la especie: Hodson et. al. (7); Badilla et al. (8); González y Vilca (9); Enrico (10). En cuanto a la caracterización molecular del aliso se conocen sólo los trabajos sobre genética de poblaciones con isoenzimas realizados en Centroamérica con *Alnus acuminata* H.B.K. spp *arguta* (11) y los trabajos realizados por nuestro grupo en la obtención de embriogénesis somática (12) (14). y la caracterización molecular de poblaciones y progenies del eje cafetero (15) (16).

Teniendo en cuenta la importancia de este recurso forestal de rápido crecimiento, fijador de nitrógeno y clave en la reforestación de cuencas hidrográficas, el Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira ha realizado varios estudios en el aliso, con el apoyo de COLCIENCIAS y la U.T.P., con miras a su conservación y aprovechamiento, logrando resultados como la embriogénesis somática de la especie, que apunta a su propagación masiva. A raíz de la obtención de callos embriogénicos y embriones somáticos, se planteó el problema de la estabilidad genética de los materiales micropropagados, ya que según (18), puede existir variabilidad genética que surge como consecuencia del cultivo *in vitro*. Este fenómeno ocurre en todos los sistemas de regeneración que incluyan una fase de callo, tanto si la morfogénesis se verifica por organogénesis adventicia o a través de embriogénesis somática (19). Por tanto era necesario, ante el potencial de la embriogénesis como método de propagación masiva de material seleccionado, caracterizar primero plántulas de vivero que serían las donadoras de hojas para el proceso de callogénesis. Así se fijó el objetivo de obtener marcadores moleculares AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) estudiando plántulas de aliso provenientes de vivero, de semillas recolectadas en diferentes sitios de la zona cafetera, con el fin de verificar la aplicabilidad y funcionalidad de este tipo de marcadores al germoplasma de *Alnus acuminata* Humboldt, Bonpland & Kunth spp *acuminata*. Y poder evaluar en un posterior estudio, la estabilidad genética de los callos embriogénicos y los embriones somáticos obtenidos mediante la embriogénesis somática o bien la caracterización molecular de la especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Este estudio de obtención de marcadores moleculares polimórficos AFLP se realizó utilizando un total de 15 plantas de vivero de un año y medio provenientes de semillas recolectadas en diferentes sitios de la zona cafetera colombiana.

2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN, de hojas de plantas de *Alnus acuminata*, se realizó con el compuesto tiocianato de

guanidina (DNAzol®), con el que se obtuvieron concentraciones de 50-300 µg de ADN por gramo de tejido foliar o callo, que se llevaron a soluciones entre 0.1 y 0.3 µg/µl. La calidad del ADN extraído con este compuesto permitió la amplificación del 99% de todas las muestras.

2.3 Cuantificación de ADN

La determinación de la concentración y pureza del ADN de *Alnus acuminata* extraído mediante tiocianato de guanidina, se realizó por espectrofotometría UV (espectrofotómetro 552, Perkin Elmer) empleando la relación de lectura de OD 260/280 nm (20). Se calcula la concentración de ADN asumiendo que la concentración de ADN de 50 µg/ml equivale a una OD de 1 a 260 nm.

2.4 Técnica de los AFLP

Los AFLP (21) se realizaron con el conjunto de reactivos AFLP® *Analysis System I* y *AFLP Starter Primer Kit* de *Life Technologies – GIBCO BRL Products*, el cual suministra ADN de tomate como control. La separación de los productos de amplificación fue hecha en geles de acrilamida de 38 x 50 cm y en un secuenciador *Sequigen Systems* de Biorad®. Se utilizaron dos enzimas de restricción, *EcoR I* y *Mse I*, y once combinaciones de cebadores, provenientes de las enzimas de restricción, de los cuales cinco correspondían a cebadores PCR +3+3; cuatro cebadores PCR +2+3; uno a cebadores PCR +2+1 y uno a cebadores PCR +1+3.

Las amplificaciones PCR se obtuvieron en termociclador MJ Research. Se utilizaron marcadores de peso molecular de 10-300 bp. (con las cuales se compararon las lecturas de las bandas obtenidas) En total se corrieron 18 muestras consistentes en los ADN de las 15 plantas adultas, dos controles positivos y un blanco.

2.5 Tinción con plata

Para el revelado de los geles se realizó tinción con plata de los geles de acrilamida (22) de 38 x 50 cm, se llevó a cabo con el conjunto de reactivos “DNA Silver Staining System” de Promega Corporation. Para los procedimientos de fijación, enjuagues y revelado se emplea un agitador orbital donde se alojan las bandejas de tinción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las once combinaciones ensayadas, nueve amplificaron el 99% de los 15 individuos. Las combinaciones de los cebadores PCR +3+3 mostraron una pobre calidad informativa (Tabla 1). En todos ellos se obtuvieron menos de 50 bandas, cuando normalmente se logra la coamplificación de 50 a 100 fragmentos en cada reacción de AFLP (21). Las combinaciones de

cebadores PCR +2+3 fueron las que mayor número de bandas produjeron (Tabla 1). De nueve de las once combinaciones de iniciadores se obtuvieron un total de 348 bandas, de las que 195 resultaron polimórficas, es decir un 56% de los fragmentos de restricción (Tabla 1).

La obtención de marcadores moleculares polimórficos AFLP en aliso permiten confirmar la aplicabilidad de esta técnica molecular al estudio de estabilidad genética de los materiales embriogénicos. Y concuerdan con el estudio previo realizado por nuestro laboratorio con RAPD (15) en el cual de 21 cebadores utilizados para el estudio, 10 de ellos resultaron polimórficos, originando un número total de 43 bandas, de las cuales 26 resultaron polimórficas, es decir 60% de polimorfismos.

Según (23), los microsatélites, y los AFLPs pueden ser los marcadores más adecuados para el análisis de estabilidad genética. Otros investigadores han emprendido estudios de estabilidad genética utilizando marcadores AFLP, así (24) demostraron el potencial de los AFLP para detectar las diferencias genéticas y

variantes somaclonales en *Musa spp.* (25) evaluaron la aplicabilidad de los AFLP para estimar la variabilidad genética de los embriones somáticos de pecan (*Carya illinoensis*) y realizaron comparaciones entre líneas celulares identificando 368 loci polimórficos. Encontraron además que, si bien la mayoría de los embriones somáticos de la misma línea se agrupaban juntos, unos pocos embriones exhibieron altos niveles de polimorfismos y no se agrupaban con los restantes. (26) determinaron la variación somaclonal en plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de *Coffea arabica*, utilizando AFLP, y analizaron la similitud en algunas plantas obtenidas a partir de embriones somáticos encontrando que era aproximadamente del 98%. (27) compararon huellas digitales mediante AFLP de embriones somáticos, plantas regeneradas y plantas de campo de lúpulo, encontrando un 67% de polimorfismos que permitieron la detección de variantes somaclonales, así como una evaluación la influencia del periodo de cultivo de los callos sobre la variación somaclonal.

Combinación de cebadores	Nº de Bandas	Nº Bandas polimórficas
E-AGC X M-CAC	17	10
E-AAC X M-CTT	47	27
E-AGG X M-CAG	23	5
E-ACT X M-CTG	15	10
E-ACC X M-CAA	0	0
E-AC X M-CAT	38	29
E-AA X M-CTC	57	20
E-AC X M-CTC	70	47
E-AC X M-CTA	48	31
E-AA X M-C	33	16
E-A X M-CTT	0	0
Total	348	195

Tabla 1. Combinaciones de cebadores *EcoR I* / *Mse I*, número de fragmentos de restricción y bandas polimórficas obtenidas en los AFLP de plantas de vivero provenientes de semillas de *Alnus acuminata* H.B.K.

4. CONCLUSIONES

Se realizó un estudio con marcadores moleculares AFLP con el fin de obtener marcadores polimórficos de plantas de vivero cuyas semillas provenían de diferentes sitios de recolección.

Se emplearon dos enzimas de restricción, *EcoR I* y *Mse I*, y once combinaciones de cebadores, provenientes de las enzimas de restricción, de los cuales cinco correspondían a cebadores PCR +3+3; cuatro cebadores PCR +2+3; uno a cebadores PCR +2+1 y uno a cebadores PCR +1+3. De las once combinaciones ensayadas, nueve amplificaron el 99% de los individuos. Las combinaciones de los cebadores PCR +3+3 mostraron

una pobre calidad informativa. Las combinaciones de cebadores PCR +2+3 fueron las que mayor número de bandas produjeron

De nueve de las once combinaciones de iniciadores se obtuvieron un total de 348 bandas, de las que 195 resultaron polimórficas, es decir un 56% de los fragmentos de restricción

Con los marcadores polimórficos obtenidos es posible emprender un estudio que permita verificar la estabilidad genética de los materiales producto de la embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K. lograda en el laboratorio de Biología Vegetal de la U.T.P o bien la caracterización molecular de la especie.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] RESTREPO-URIBE, G., BELLEFLEUR, P., RESTREPO, G. 1996. L'aulne des Andes de Colombie: ecologie et identification. Bois et Forest des Tropiques. 247, 53-68.
- [2] IDROBO, L. 1992. El verdor de los Andes. Arboles y arbustos nativos para el desarrollo forestal altoandino. FAO. p.217
- [3] MURCIA, C. 1997. Evaluation of Andean alder as a catalyst for recovery of tropical cloud forest in Colombia. Forestry Ecology and Management 99, 163-170.
- [4] PEDEN, D., BYENKA, S. WAJJA-MUSUKWE, S., OKORIO, J., COR, R. 1993 Increased crop production with *Alnus acuminata* in Uganda. Agroforestry Today. 5: 4, 5-10.
- [5] LEDGARD, N. y HALLOY, S. 1991. The Andean alder (*Alnus acuminata*) in New Zeland. New Zealand Forestry. 36:1,17-18.
- [6] BUDOWSKI, G. y RUSSO, R. 1997. Nitrogen fixing trees and nitrogen fixation in sustainable agriculture: research challenges. Soil Biology and Biochemistry. 29: 5-6, 767-770.
- [7] HODSON, E., RODRIGUEZ, C.A. & CHEMAS, A. 1988. Propagación Vegetativa de *Alnus acuminata* H.B.K. por Cultivo de Tejidos Vegetales. Revista Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 1(2): 67-77
- [8] BADILLA, M.M.V., HIDALGO D., N., GUEVARA B.E. & MURILLO, G. O. 1992. Cultivo In Vitro de Plántulas de Jaúl (*Alnus acuminata*). Tecnología en Marcha. 11(3): 3-9.
- [9] GONZALEZ, C, VILCA, J. 1998. Micropropagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*). Asociación civil para la investigación y desarrollo forestal ADEFOR. Cajamarca. Perú. p. 40.
- [10] ENRICO, R. J. 1998. Citocininas en la producción de múltiples vástagos en el cultivo in vitro de epicótilos de *Alnus acuminata*. Memorias III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana. p.93-94
- [11] MURILLO-O; HATTEMER-H-H. 1997. Inheritance of isozyme variants of *Alnus acuminata* ssp. arguta (Schlectendal) Furlow. Silvae Genetica 46(1): 51-55
- [12] GUTIERREZ, L.G. 2001a. El jaúl (*Alnus acuminata*) un forestal con gran respuesta a la embriogénesis somática. Tecnología en marcha 14(2): 114-121. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- [13] GUTIERREZ, L.G. 2002. Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K. y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. 180 pp.
- [14] GUTIÉRREZ, L.G. 2001. Obtención de marcadores moleculares para la caracterización del germoplasma de aliso cerezo (*Alnus acuminata* H.B.K.). Scientia et Technica. N°15 : 145-149. Universidad Tecnológica de Pereira.
- [15] MARULANDA, M.L., MARQUEZ, P., CLAROS, J. 2004. "Caracterización molecular y morfológica de tres especies forestales (*Tabebuia rosea*, *Alnus acuminata* y *Cordia alliodora*) mediante la técnica AFLPs" Informe de avance. Centro Nacional de Investigaciones en Café (CENICAFE) programas: ETIA y Mejoramiento Genético
- [16] MARULANDA M.L., y MARQUÉZ, P. 2002. Evaluación de la estabilidad genética de vitroplantas de *Rubus glaucus* mediante marcadores moleculares (RAPD). Actualidades Biológicas, Medellín - Antioquia, v. 24, n. 76, p. 31-36
- [17] LARKIN, P.J. y SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures from plant improvement. Theor Appl Genet. 60:197-214.
- [18] LINDSEY, K. y JONES M.G.K. 1989. Biotecnología vegetal agrícola. Acibia. Zaragoza. p.276.
- [19] MANIATIS, T., FRITSCH, E:F. y SAMBROOK, J. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [20] VOS, P., HODGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS. M., VAN DE LEE, Y., HORNES, M., FRIJTRS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Oxford University Press EN: Nucleic Acids Research. 23 (21): 4407-4414.
- [21] BASSAM, B.J. CAETANO-ANOLLES, G y GRESSHOFF, P.M.1991. Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. Annual. Biochem. 196: 80-83.
- [22] GUPTA, P.K. y VARSHNEY, R.K. 1999. Molecular markers for genetic fidelity during micropropagation and germplasm conservation. Current-Science. 76: 10, 1308-1310.

[23] ENGELBORGHES, I., SWENNEN, R., CAMPENHOUT, S.; VAN-CAMPENHOUT, S. 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp. Infomusa. 7: 2, 3-6

[24] VENDRAME, W., KOCHERT, G., WETZSTEIN, H. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. Plant-Cell-Reports. 18: 10, 853-857.

[25] SÁNCHEZ-TEYER, L.P., LOYOLA-VARGAS, V.M., INFANTE-HERRERA, D. 1998. Determinación de variación somaclonal en plantas regeneradas a partir de embriones somáticos de *Coffea arabica*. Internet: <http://www.geocities.com/frlongo/proyectocorregido1.doc>.

[26] MAGADÁN, J. A., MARTÍNEZ, D., JÍMENEZ J. M., ARROYO R., MARTÍNEZ-ZAPATER J.M. AND REVILLA M. A. 2001. Evaluation of somaclonal variation in hops by AFLPs. Internet: www.stmlf.bayern.de/lbp/info/ho/ihb/poster4.pdf