



Curso de verano
Universidad de Salamanca

ENFERMEDADES FÚNGICAS
DE CULTIVOS DE LAS REGIONES
CASTELLANO - LEONESA Y TRANSMONTANA



Organizadores: Dra. M. Carmen López y Dr. Angel Dominguez

Excmo. Vicerrector de Investigación Dr. Arturo Pérez Esclava

Dr. Altino Branco Chalupina

Dr. Jose María Díaz Minguez

Dr. F. Javier Fernández Díez

Dr. Pablo García Benavides

Dra. Rosa Hermosa Prieto

Dra. María Eugenia Madureira Gouv

Dra. María Teresa Martín Villalobos

Dra. Paloma Melgarejo Narviz

Dr. Enrique Monte Vazquez

Dr. Ernesto Pérez Benito

Dra. Belén Suárez Fernández

Dr. Irigo Zabalgoitia González

Escuela Politécnica Superior de Zamora

Fecha: 11-13, julio, 2005

Nº créditos 2. Horas 20

<http://www3.usal.es/~cverano/990.htm>

<http://www.esa.ipb.pt/cambofinta/>

Marcadores moleculares para la caracterización de *Phytophthora*

Prof. Dr. Altino Branco Choupina

Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, Campus Santa Apolónia,

Apartado 1172, 5301-855 Bragança - Portugal

En la actualidad se dispone de varias técnicas que permiten revelar variabilidades a nivel de DNA. Características del DNA que diferencian dos o más individuos y que se heredan genéticamente, son conocidas como marcadores moleculares.

Los principales tipos de marcadores moleculares pueden ser clasificados en dos grupos, según la metodología utilizada para identificarlos: Hibridación o amplificación del DNA. Entre los identificados por hibridación están los marcadores RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") y Minisatélites o locus VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats"). Aquellos revelados por amplificación incluyen los marcadores del tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"); SCAR ("Sequence Characterized Amplified Regions") o ASA (Amplified Specific Amplicon); Microsatélites (o SSR - "Simple Sequence Repeats"); y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Las tecnologías de los marcadores moleculares están evolucionando rápidamente y ya existen modificaciones para algunas de las técnicas anteriormente mencionadas. Con todo, los tipos de marcadores aquí listados son los que están siendo utilizados para la caracterización de cultivos. Puede encontrarse la descripción de cada uno de los tipos de marcadores mencionados en Milach (1998a) e Ferreira & Grattapaglia (1995).

La técnica de RFLP es laboriosa, emplea más tiempo para la obtención de resultados que otras técnicas, el coste es relativamente alto y pone de manifiesto un grado de polimorfismo de intermedio a bajo, según la especie. A pesar de ello, los RFLPs han sido utilizados en un gran número de estudios de caracterización (Gebhardt *et al.*, 1989; O'Donoghue *et al.*, 1994; Autrique *et al.*, 1996). Todo ello debido principalmente a su alta fiabilidad y reproductibilidad en la obtención de resultados.

Los minisatélites o locus VNTR son secuencias repetidas de DNA, adyacentes en número variable (Jeffreys *et al.*, 1985). Esta técnica es similar a la de RFLP, variando básicamente en el tipo de sonda utilizada y presentando las ventajas y desventajas de la técnica anterior. Una ventaja adicional de los minisatélites es el alto grado de polimorfismo presentado, dependiendo de la variación de la distribución de los sitios de restricción, de las sondas utilizadas, y del número y tipos de secuencias repetidas. De hecho, utilizando una única sonda de minisatélites, Nybom y colaboradores (1990) caracterizaron cuatro cultivos de *Malus sp.*, cuatro de *Prunus serotina* y ocho de *Rubus sp.*

Entre las técnicas presentadas, la RAPD es la de menor costo, número de etapas y tiempo de obtención de resultados, y es fácil de implementar. Aún con todo, una de las desventajas es su baja reproductibilidad y poca fiabilidad de un laboratorio a otro, lo que dificulta la comparación de datos obtenidos en diferentes zonas. Así mismo deben de tomarse precauciones para la caracterización de los cultivos. El nivel de polimorfismo obtenido con RAPDs varía mucho con la especie en cuestión y ha sido utilizada con éxito para la caracterización de variedades de cebada (Tinker *et al.*, 1993; Penner *et al.*, 1998) y arroz (MacKill, 1995), entre otras.

Los marcadores SCAR son amplificados con "primers" específicos, diseñados en base a secuencias ya mapeadas o caracterizadas (Paran & Michelmore, 1993).

Muchos de los "primers" se obtienen de la conversión de marcadores RAPD en SCAR. Esta transformación, en general resulta en la disminución del nivel de polimorfismos obtenidos por SCAR. Con todo, esto puede atenuarse con la digestión de

enzimas de restricción de los productos amplificados, y con la secuenciación de las bandas monomórficas y subsecuente diseño de "primers" que amplifiquen secuencias más variables entre los genotipos. La técnica de SCAR es muy semejante a la de RAPD, con la ventaja de ser más fiable y con la desventaja de implicar la utilización de "primers" de elevado coste.

Los microsatélites implican el diseño de "primers" específicos, lo cual es un proceso laborioso y caro. Pero una vez que se disponga de estos, el costo de esta técnica se asemeja a la de RAPD, con la excepción de que los geles para separar los fragmentos de DNA deben de ser de poliacrilamida, los cuales son de elevado costo. La gran ventaja de esta técnica es el alto polimorfismo revelado, que le vuelve una de las mejores opciones para el uso de la caracterización de cultivos, principalmente en germoplasma emparentado y de baja variabilidad.

Por fin, la técnica de AFLP posee una gran capacidad para la detección de variabilidad genética y para la caracterización de cultivos. De hecho, ha sido utilizada con éxito para esta finalidad (Hongtrakul *et al.*, 1997). Entre las ventajas de su uso, está el alto grado de polimorfismo y el alto número de marcadores detectados por gel analizado. AFLP es la técnica más laboriosa entre las técnicas de PCR, necesita geles de poliacrilamida para la separación de los fragmentos y está protegida por patente.

Algunas de estas técnicas han sido utilizadas con éxito para la identificación y caracterización de especies de *Phytophthora*, un hongo de interés fitopatógeno. Los métodos moleculares de identificación de *Phytophthora* basados en la amplificación por PCR de la región del genoma que codifica para los rRNAs, y concretamente, las regiones ITS1, 5.8S y ITS2, han permitido la identificación objetiva de especies de este género (Cook *et. al.*, 2000).

En la Escola Superior Agrária de Bragança, y en colaboración con la Universidad de Salamanca hemos puesto a punto un SCAR capaz de identificar *Phytophthora cinnamomi* con DNA obtenido a partir de muestras de distintos sustratos.

Bibliografía

- CAG, D., OARD, J.H. 1997. Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. *Crop Sci.*, 37:1620-1635.
- COOK, D. E. L., Drenth, A., Dacan, J. M., Wagels, G. & Brasier, C. M. (2000) A molecular Phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal genetics and Biology*, 30:17-32
- GEBHARDT, C.; BLOMENDAHL, C.; SCHACHTSCHABEL, U.; DEBENER, T.; SALAMINI, F.; RITTER, E. 1989. Identification of 2n breeding lines and 4n varieties of potato (*Solanum tuberosum*, ssp. *tuberosum*) with RFLP-fingerprints. *Theor. Appl. Genet.* 78:16-22.
- HONGTRAKUL, V., HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed bred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 95:400-407.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. 1985. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 316:76-79.
- LEE, M.; RUSSELL, W.A.; MELCHINGER, A.E.; WOODMAN, W.L. 1990. On the origin of the inbred line B52. *Maize Genet. Coop. Newsl.*, 64:21.
- MACKILL, D.J. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci.*, 35:889-894.
- MILACH, S.C.K.; RINES, H.W.; PHILLIPS, R.L. 1997. Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. *Theor. Appl. Genet.*, 95:783-790.
- NYBOM, H.; ROGSTAD, S.H.; SCHAAL, B.A. 1990. Genetic variation detected by use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). *Theor. Appl. Genet.* 79:153-156.
- O'DONOUGHUE, L.S.; SOUZA, E.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. 1994. Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.*, 34:1251-
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85:985-995.
- PECCHIONI, N.; FACCIOLI, P.; MONETTI, A.; STANCA, A.M.; TERZI, V. 1996. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. *J. Genet. Breed.*, 50:203-219.
- PRABHU, R.R.; WEBB, D.; JESSEN, H.; LUK, S.; SMITH, S.; GRESSHOFF, P.M. 1997. Genetic relatedness among soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and Pedigree. *Crop Sci.*, 37:1590-1595.
- SMITH, J.S.C.; SMITH, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy*, 47:85-140.
- TINKER, N.A.; FORTIN, M.G.; MATHER, D.E. 1993. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.*, 85:976-984.
- ZHOU, Z.; GUSTAFSON, J.P. 1995. Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 91:481-488.