

**UBICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA MEIOSIS EN *Brachiaria decumbens* Stapf., UNA
ESPECIE DE REPRODUCCIÓN APOMÍCTICA**

MARYAM CHAIB DE MARES



UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ARMENIA - QUINDÍO

2009

**UBICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA MEIOSIS EN *Brachiaria decumbens* Stapf., UNA
ESPECIE DE REPRODUCCIÓN APOMÍCTICA**

MARYAM CHAIB DE MARES

Trabajo de Grado para optar al título de Bióloga

DIRECTOR

JOSEPH TOHME, Ph.D

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

CODIRECTORES

CARLOS ALBERTO AGUDELO HENAO, Ph.D.

Universidad del Quindío

DIANA MARCELA BERNAL, Bióloga.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS

PROGRAMA DE BIOLOGÍA

ARMENIA

2009

Nota de aceptación:

El trabajo de grado titulado “**UBICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA MEIOSIS EN *Brachiaria decumbens* Stapf., UNA ESPECIE DE REPRODUCCIÓN APOMÍCTICA**”, presentado por la estudiante **MARYAM CHAIB DE MARES**, como requisito parcial para optar al título de Bióloga, fue revisado y calificado como:

APROBADO

DIRECTOR

JOSEPH TOHME, Ph.D

CO-DIRECTOR

CARLOS ALBERTO AGUDELO HENAO, Ph.D.

CO-DIRECTOR

DIANA MARCELA BERNAL, B.Sc

Armenia, Octubre 16 de 2009

Nota de Aprobación:

Nohra Cecilia Rodríguez, M.Sc.
Universidad del Quindío
Jurado

John W. Miles, Ph.D.
CIAT
Jurado

Gerardo Gallego Sánchez, Ph.D.
CIAT
Jurado

Armenia, Octubre 16 de 2009

DEDICATORIA

A mi mamá y a mi hermana

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Quindío, por las herramientas brindadas en mi proceso de formación como bióloga.

Al CIAT, por haberme brindado un espacio para desarrollar el proyecto de investigación y una nueva etapa de formación académica y profesional.

Al doctor Joe Tohme, director del proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología y de mi proyecto de grado, por haberme permitido un espacio dentro de su grupo de investigación para desarrollar este trabajo.

A Diana Bernal, por sus constantes aportes al trabajo, las ideas y su preocupación para que este estudio se llevara a cabo de la mejor manera.

Al doctor Carlos Alberto Agudelo, por su co-dirección y permanentes recomendaciones en la elaboración del trabajo.

Al doctor John Miles, por todo el tiempo dedicado a la valoración del manuscrito, por sus constantes consejos, recomendaciones, sugerencias y conversaciones que me hicieron crecer profesionalmente y como persona.

Al doctor Gerardo Gallego, y la docente Nohra Cecilia Rodríguez por sus correcciones, sugerencias y aportes al trabajo.

A Myriam Cristina Duque, por todo el tiempo dedicado a la asesoría en el análisis de los datos de este trabajo.

A Fausto Rodríguez, por su ayuda en la utilización de herramientas bioinformáticas para el tratamiento de los datos.

A todos los asistentes de investigación y estudiantes de tesis del CIAT que de alguna manera contribuyeron al trabajo, especialmente a Jaime Vargas por facilitarme datos de importancia en el

análisis y por su amistad; a Olga Ximena Giraldo por enseñarme a utilizar programas para analizar los datos, y a Yamid Sanabria por sus ideas y su valiosa amistad.

A Harold Suárez, por su amistad incondicional, por su acompañamiento en el laboratorio, sus consejos, los desayunos, las películas y los tintos que hicieron de esta labor algo más tranquilo.

A mis compañeros de clase, cuya grata compañía me ayudó varias veces a seguir adelante, y especialmente a Yaneth Cifuentes (la mona), Natalia Mejía y Paola Patiño, por estar siempre ahí para mí, aún en la distancia.

A Mario Ramírez Monard, por su compañía y cariño y por su entrega a mi familia.

A Alejandro Acosta, por todo el amor y la fuerza que me ha dado, por pensar siempre en mí y porque la vida a su lado es realmente feliz.

A mis hermanos, Kelly y Karim, que me ayudaron a ser una mejor persona, por toda la confianza que han depositado en mí y por todo el amor que me han dado.

A mi mami, Elsy De Mares, por traerme al mundo, por dedicar su vida a sus hijos, porque siempre ha hecho lo imposible por facilitarme las cosas, por su dedicación, entrega, constancia, valor y todo lo que me da, que han hecho de mí quien soy y por ser la mejor mamá del mundo.

Y a mi papá, Abdul Latif Chaib, que todos los logros que he alcanzado siempre han sido en su memoria.

CONTENIDO

pág.

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ANEXOS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

16

1. MARCO TEÓRICO

18

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Brachiaria*

18

1.2 CULTIVARES COMERCIALES DE *Brachiaria*

19

1.2.1 *Brachiaria decumbens* cv Basilik

19

1.2.2 *Brachiaria brizantha* cv Marandú

20

1.2.3 *Brachiaria ruziziensis* cv Kennedy

20

1.3 CITOGENÉTICA DE *Brachiaria*

20

1.4 APOMIXIS

21

1.4.1 Tipos de Apomixis

22

1.4.1.1 Apomixis Gametofítica

22

1.4.1.1.1 Diplosporía

23

1.4.1.1.2 Aposporía

23

1.4.1.2 Embrionía Adventicia

23

1.5 CONTROL GENÉTICO Y HERENCIA DE LA APOMIXIS

24

1.6 MEIOSIS EN PLANTAS SEXUALES Y APOMÍCTICAS

25

1.6.1	Desarrollo Meiótico de Megagametofitos	25
1.6.2	Desarrollo Ameiótico de Megagametofitos	26
1.7	MARCADORES MOLECULARES	26
1.7.1	Sitios de Secuencias Etiquetadas o STS	29
1.7.2	Polimorfismos de una Sola Base o SNPs	30
1.8	MAPEO GENÉTICO	31
1.8.1	Mapeo en Poliploides	32
1.8.2	Construcción del Mapa Genético de <i>Brachiaria</i>	35
1.9	ANTECEDENTES TEÓRICOS	37
2.	OBJETIVOS	40
2.1	OBJETIVO GENERAL	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1	MATERIAL VEGETAL	41
3.2	METODOLOGÍA	41
3.2.1	Amplificación de las Secuencias Relacionadas con la Meiosis (SRM)	42
3.2.1.1	Estandarización de las condiciones de PCR en parentales	43
3.2.1.2	Evaluación en la progenie de marcadores polimórficos entre parentales	47
3.2.1.3	Lectura y registro de los datos de la población segregante	47
3.2.2	Secuenciación de las bandas monomórficas resultantes	48
3.2.3	Detección y Estandarización de polimorfismos SNP	49
3.2.3.1	Metodología de Extensión de una Base	49

3.2.3.2	Reacción de Extensión de una Base (SBE)	51
3.2.3.3	Hibridación a microesferas, detección y cuantificación de las reacciones de extensión	52
3.2.4	Análisis de Segregación	53
3.2.5	Análisis de Ligamiento de los Marcadores	55
3.2.6	Comportamiento de Apareamiento Cromosómico en <i>Brachiaria decumbens</i>	58
4.	RESULTADOS	59
4.1	AMPLIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON LA MEIOSIS (SRM)	59
4.1.1	Evaluación en la progenie de marcadores polimórficos entre parentales	63
4.2	ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN	68
4.3	MAPEO GENÉTICO DE LAS SRM EN <i>B. decumbens</i> y <i>B. ruzizensis</i>	71
4.4	COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO CROMOSÓMICO	78
5.	DISCUSIÓN	80
5.1	AMPLIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON LA MEIOSIS (SRM)	80
5.2	ANÁLISIS DE SEGREGACIÓN	83
5.3	MAPEO GENÉTICO DE LAS SRM EN <i>B. decumbens</i> y <i>B. ruzizensis</i>	86
5.4	COMPORTAMIENTO DE APAREAMIENTO CROMOSÓMICO	91
6.	CONCLUSIONES	94
7.	RECOMENDACIONES	96
	BIBLIOGRAFÍA	97
	ANEXOS	111

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. STS evaluados en los parentales *B. decumbens* y *B. ruzizensis*.

Cuadro 2. Condiciones de PCR y perfiles de temperatura resultantes de la estandarización de cada marcador.

Cuadro 3. Cebadores diseñados para cada SNP identificado en las secuencias de STS.

Cuadro 4. Total de marcadores SNP estandarizados en los parentales *B. decumbens* (CIAT 606) y *B. ruzizensis* (Clon 44-02) además de once genotipos elegidos al azar a partir de la población híbrida.

Cuadro 5. Información acerca de los patrones de herencia observados para los marcadores codominantes, polimórficos entre parentales de dosis sencilla o doble para ambos parentales, discriminando por sistema codominante utilizado.

Cuadro 6. Fase de ligamiento de los loci de cada marcador perteneciente a los grupos de ligamiento generados de acuerdo con el prueba de Mather para *B. decumbens*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diluciones de ADN a 4 ng/ μ L de algunos individuos de la población híbrida CIAT 606 x CIAT 44-02 comparadas con patrones de tamaño molecular de ADN 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Figura 2. Reacción de Extensión de un Nucleótido y visualización de los alelos SNPs.

Figura 3. Estandarización de las condiciones de amplificación para algunos Sitios de Secuencia Etiquetada (STS). Gel de Agarosa 2%.

Figura 4. Estandarización de las condiciones de amplificación para algunos Sitios de Secuencia Etiquetada (STS). Gel de Acrilamida 6%.

Figura 5. Cebador 27 en algunos individuos de la población híbrida entre *B. decumbens* y *B. ruziziensis*.

Figura 6. Cebadores polimórficos amplificados en algunos individuos de la población híbrida entre *B. decumbens* y *B. ruziziensis*.

Figura 7. Limpieza de productos de PCR para secuencia.

Figura 8. Visualización de SNPs utilizando BioEdit 7.0.9.0.

Figura 9. Distribución de las proporciones de segregación de marcadores en la progenie F₁ de *B. decumbens* (CIAT 606) y *B. ruziziensis* (Clon 44-02).

Figura 10. Mapa de Ligamiento de la especie *Brachiaria decumbens* con el programa Mapmaker 3.0 con un puntaje LOD de 8.0 y una distancia máxima entre marcadores de 25 cM.

Figura 11. Mapa de Ligamiento de la especie *Brachiaria ruziziensis* generado por el programa TetraploidMap con 61 marcadores.

Figura 12. Mapa de Ligamiento de la especie *Brachiaria decumbens* con TetraploidMap.

Figura 13. Grupo de Ligamiento 16, al cual pertenece el SCAR N14, con 10 marcadores y cubriendo un total de 34,8 cM generado con Mapmaker 3.0

Figura 14. Grupo de homología 8, al cual pertenece el SCAR N14, y sus respectivos grupos de ligamiento con 19 marcadores y cubriendo 179 cM, generado con TetraploidMap.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Protocolo de extracción de ADN de *Brachiaria*.

Anexo B. Preparación de geles de agarosa.

Anexo C. Secuencias de expresión diferencial entre el parental apomítico y el sexual.

Anexo D. Preparación de reactivos stock de uso general.

Anexo E. Preparación del gel de poliacrilamida.

Anexo F. Electroforesis del gel de poliacrilamida y tinción con Nitrato de Plata.

Anexo G. Preparación de reactivos para geles de acrilamida y tinción con Nitrato de Plata.

Anexo H. Protocolo de limpieza de producto de PCR basado en PEG.

Anexo I. Protocolo de limpieza de reacciones de secuencia.

Anexo J. Grupos de ligamiento con marcadores en fase de acoplamiento y repulsión de la especie *Brachiaria ruziziensis* generados con el software TetraploidMap.

Anexo K. Grupos de ligamiento con marcadores en fase de acoplamiento y repulsión de la especie *Brachiaria decumbens* generados con el software TetraploidMap.

RESUMEN

La apomixis es un fenómeno de importancia evolutiva y económica que se define como reproducción asexual por semillas. Varias accesiones poliploides de especies del género *Brachiaria* son pastos forrajeros valiosos en Suramérica, que se reproducen a través de apomixis apospórica facultativa. En este trabajo se pretendió ubicar genes relacionados con la meiosis en el mapa existente de *Brachiaria decumbens*, realizando una aproximación hacia la constitución genómica de la especie. Se mapearon en total 117 fragmentos en dosis sencilla distribuidos en 20 grupos de ligamiento con un LOD de 8, cubriendo un total de 688.7 cM, con un promedio de 5,9 marcadores por grupo, y una distancia promedio entre marcadores de 5,8 cM. Para *B. decumbens*, se obtuvieron 256 bandas amplificadas, siendo 173 AFLPs, 45 microsatélites y 21 ESTs relacionados con características agronómicas de interés. Se aportaron al mapa 35 *loci*: 28 STS, 6 SNPs y una delección de una base. Los rangos más representados de segregación de los marcadores estuvieron entre 0,75 y 1,75, correspondiendo con lo esperado para marcadores que segregan en una sola dosis, con un promedio de 1,57 para *B. decumbens* y 1,86 para *B. ruziziensis*. Sin embargo, también hubo porcentajes importantes de segregación desviados para ambas especies, con una desviación en el 54,3% y 43,75% de los casos, respectivamente. Del análisis de los grupos cosegregacionales de *B. decumbens*, existen evidencias que corroborarían apareamiento cromosómico mixto, con formación de bivalentes en mayor proporción, aunque con un porcentaje de apareamientos con diferente configuración no despreciable, típico de especies con aloploidía segmental.

Palabras Clave: Poliploidía, Marcadores Moleculares, Mapeo Genético, Constitución Genómica, *Brachiaria*.