

# CAPÍTULO VII

---

## HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN ALPISTE

W. John Rogers

VII.1- Isoenzimas

VII.2- Proteínas de reserva del grano

VII.3- Marcadores moleculares

VII.4- Metabolómica

VII.5- Referencias

---

### **VII.1- Isoenzimas**

Durante las últimas cuatro décadas aproximadamente, se han desarrollado herramientas bioquímicas dirigidas a estudiar la variación genética en los cultivos. Una de ellas es el uso de isoenzimas, las cuales son variantes, en términos de su secuencia de aminoácidos, de una enzima que cataliza una reacción química determinada. Las variantes podrían ser los productos del mismo gen, es decir, generadas por distintos alelos (estrictamente llamados aloenzimas en este caso), o de distintos genes, aunque siempre referidas a enzimas que catalizan la misma reacción. En general se detectan las distintas variantes a través de electroforesis en geles de almidón o de acrilamida en la que se logra separarlas con base en su punto isoeléctrico. Después de teñir el gel utilizando protocolos específicos para cada enzima, se visualizan las

distintas variantes como bandas que se localizan, de acuerdo con dicho punto, en distintas ubicaciones a lo largo del gel, el cual incluye un gradiente de pH, lo que permite así lograr la separación deseada. Hoy en día se pueden analizar varias docenas de distintas enzimas con esta metodología. Esta metodología ha sido aplicada al estudio de la variación en alpiste y en otras especies pertenecientes al género *Phalaris*. Por ejemplo, Poverene *et al.* (1994) encontraron que, a través del estudio de cinco isoenzimas, existió muy poca variación entre veintiuna poblaciones de alpiste de Argentina, pero que se observó considerable variación intrapoblacional, lo que fue confirmado a través de la selección, a partir de las poblaciones, de líneas que difirieron entre sí para la posición y la intensidad de ciertas bandas, correspondientes a la variación alélica y a la frecuencia relativa de los alelos (revelando heterogeneidad dentro de las selecciones), respectivamente. Además de las poblaciones, tres cultivares fueron incluidos en el estudio, y se demostró que dos de ellos (“Keet” y “Elías”) mostraron patrones de bandas distintos comparados con los de las poblaciones, mientras el otro (“Belga”) no mostró tales diferencias. En conclusión, no obstante la variación limitada observada entre las poblaciones, hubo indicaciones de que, a través de la selección, se podría transformar la variación intrapoblacional en variación interpoblacional, lo que podría tener aplicaciones como una herramienta en la producción de líneas endocriadas homogéneas.

Otros estudios han analizado las isoenzimas de una base de germoplasma más amplia. Por ejemplo, Matus y Hucl (1999) analizaron, utilizando ocho isoenzimas en geles de almidón, cinco especies del género *Phalaris* (*P. canariensis*, *P. brachystachys*, *P. minor*, *P. paradoxa* y *P. angusta*), incluyendo 49 accesiones provenientes de distintos países de *P. canariensis*. En total se observaron 62 bandas contemplando todas las especies, 19 de las cuales aparecieron en *P. canariensis*, aunque solamente seis de ellas fueron polimórficas. En todas las especies la variación observada dentro de las accesiones fue baja (lo que fue consistente con un estudio llevado a cabo en *P. brachystachys* y *P. minor* por Villarroya *et al.*, 1983) y la variación entre accesiones dentro de cada especie también resultó baja, con la excepción de *P. minor*. Esta última especie es un autotetraploide ( $2n = 4X = 28$ ) y su mayor variación probablemente esté asociada con esta condición.

*P. canariensis*, como se ha comentado con anterioridad, exhibe escasa variabilidad, lo cual ha dificultado su mejoramiento genético. Matus y Hucl (1999) plantearon que, enfrentado con baja variación intra-específica, una posible estrategia para incrementar dicha variación podría ser la utilización de hibridación inter-específica, y que la mejor candidata para hibridación con *P. canariensis* debería ser *P. brachystachys*, dado que ambas especies son diploides con el mismo número de cromosomas ( $2n = 2X = 12$ ), mientras que las otras dos especies diploides incluidas en su estudio (*P. paradoxa* y *P. angusta*) tienen 14 cromosomas. Asimismo, *P. canariensis* y *P. brachystachys* son similares en su contenido de ADN relativo y su longitud cromosómica total, y como consecuencia muestran esencialmente el mismo contenido de ADN por unidad de longitud (Kadir, 1974).

Con respecto al uso de isoenzimas para la caracterización de la variación genética de alpiste, se puede concluir que no se encontraron altos grados de variabilidad entre las accesiones estudiadas en la literatura.

## VII.2- Proteínas de reserva del grano

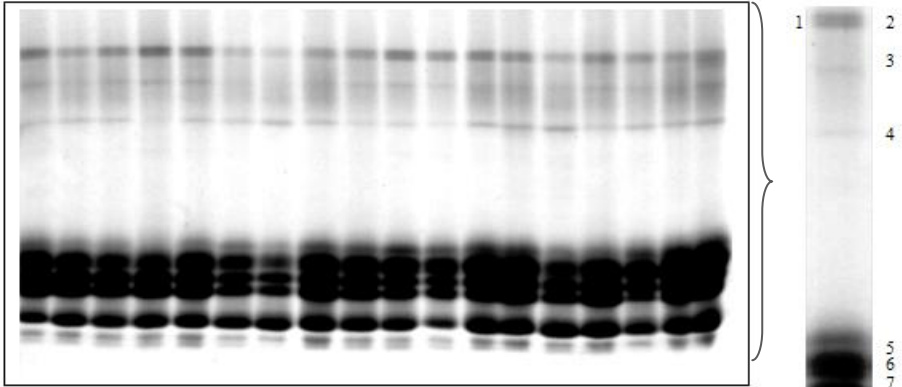
La constitución proteica de los granos, visualizada mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, ha sido ampliamente utilizada como herramienta experimental y para el seguimiento y control en la comercialización de cultivares en trigo y otras especies. Como antecedente, se puede citar el trabajo publicado por Poverene *et al.* (1994) en el cual se observaron patrones electroforéticos distintivos entre las poblaciones argentinas de alpiste y los cultivares de origen estadounidense "Keet" y "Elias". Estos resultados permiten especular sobre la utilidad potencial de dicha metodología para la correcta identificación genotípica.

De la misma manera, los patrones proteicos obtenidos por electroforesis, podrían resultar potenciales marcadores genéticos si se los puede asociar con determinados caracteres agronómicos. En tal sentido, Carrillo *et al.* (1990) determinaron las asociaciones entre bandas electroforéticas de ciertas variaciones alélicas de las gluteninas de alto peso molecular (HMW) con el rendimiento en grano y con la

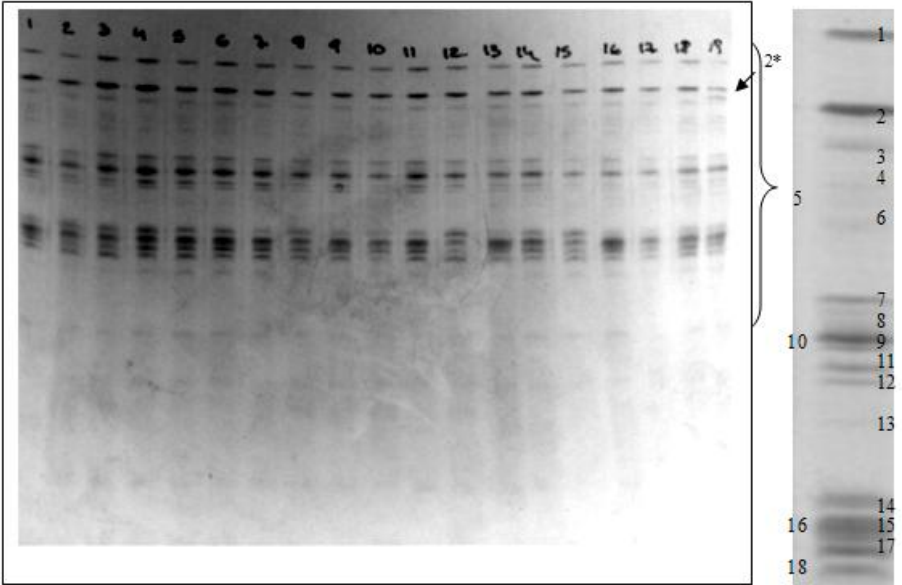
calidad industrial en trigo. Asimismo, Javornik *et al.* (1991) establecieron la asociación entre la resistencia a ciertas enfermedades de cultivares de trigo con la presencia de patrones electroforéticos pertenecientes a un grupo de secalinas, incorporados al genoma a través de la translocación 1BL.1RS, correspondiente al brazo corto del cromosoma 1R de centeno. Por último, se puede citar la utilización de patrones electroforéticos de las proteínas de reserva de los granos de trigo candeal (*Triticum durum*) para la identificación de cultivares y su asociación con la calidad industrial (Lerner *et al.* 2004).

Cogliatti (2009) analizó los patrones proteicos obtenidos por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de una colección de germoplasma de alpiste conformada por 57 materiales (47 poblaciones y 10 cultivares) originarias de 19 países (Argentina, Brasil, Canadá, Egipto, España, Estados Unidos, Holanda, Hungría, Irán, Italia, Jordania, Marruecos, México, Portugal, Rep. Checa, Siria, Suecia, Suiza y Turquía). Mediante el método de electroforesis (SDS-PAGE) se halló escasa variabilidad entre las introducciones debida a la constitución proteica de los granos, dado que se obtuvieron patrones electroforéticos semejantes tanto para las proteínas de reserva de los granos extractables en alcohol (Fig. 1), como para las no extractables en alcohol (Fig. 2). Para esta segunda técnica, se observó sólo una diferencia cualitativa entre una de las líneas (Nro. 19 en la Fig. 2) y las restantes: esta línea tuvo una banda denominada 2\* en lugar de la banda 3 presente en las otras. Para ambos métodos se observaron diferencias en la intensidad de las bandas, las cuales estuvieron asociadas con diferentes concentraciones de las distintas fracciones proteicas, probablemente provocadas por diferencias ambientales.

Dada la muy limitada variabilidad hallada en los patrones electroforéticos de las proteínas de los granos de alpiste, esta metodología no permitiría explorar potenciales asociaciones entre éstos y caracteres de interés agronómico.



**Figura 1:** Patrones electroforéticos de las proteínas de los granos de alpiste extractables en alcohol. A la derecha se muestra una imagen ampliada con las bandas enumeradas. (SDS-PAGE 17%). Cogliatti (2009)



**Figura 2:** Patrones electroforéticos de las proteínas de los granos de alpiste no extractables en alcohol. A la derecha se muestra una imagen ampliada con las bandas enumeradas. (SDS-PAGE 17%) Cogliatti (2009)

En las últimas dos décadas se ha desarrollado la tecnología de marcadores moleculares para el estudio de la variación genética en los cultivos, y recientemente se aplicó esta metodología al estudio de la variación presente en alpiste (Li *et al.*, 2010). En este estudio, se desarrollaron marcadores de tipo SSR (“simple sequence repeat”, también conocidos como micro-satélites) en una colección de cuarenta y ocho accesiones. De los treinta y siete micro-satélites polimórficos estudiados, el PIC (“polymorphic information content”) varió entre 0,08 y 0,73, con un promedio de 0,36. Se mostró que este nivel de polimorfismo fue suficiente como para permitir un análisis filogenético de las accesiones, permitiendo agruparlas en cinco grupos mayores (coeficiente de similaridad de 0,75), cuatro de los cuales incluyen dos a cuatro accesiones en cada uno, mientras el quinto grupo incluyó las treinta y cinco accesiones restantes. Dos de los pequeños grupos incluyeron accesiones provenientes de la misma región. Se observaron otros agrupamientos dentro de la colección, como por ejemplo un grupo a nivel de similaridad de 0,85 que contuvo la mayoría de las accesiones de Irán, mientras los cultivares norteamericanos “Elias” y “Togo” se encontraron agrupados juntos en un grupo a similaridad 0,79. Los cultivares “Katan” y “Daneh-Ghanari” mostraron una similaridad de 0,94, un reflejo de su pedigrí común. Fueron caracterizadas relaciones adicionales entre accesiones provenientes de distintas regiones, y se demostró que accesiones provenientes de regiones vecinales tendieron a mostrar similaridades entre sí. Sin embargo, accesiones de algunas regiones fueron distribuidas en distintos grupos, y en general no fue posible lograr agrupar las accesiones limpiamente por región.

En conclusión, la metodología de marcadores moleculares empleada en este estudio mostró ser una herramienta más poderosa para la identificación de variación genética que el análisis de isoenzimas.

### **VII.3- Marcadores moleculares**

En las últimas dos décadas se ha desarrollado la tecnología de marcadores moleculares para el estudio de la variación genética en los cultivos, y recientemente se aplicó esta metodología al estudio de la variación presente en alpiste (Li *et al.*, 2010). En este estudio, se

desarrollaron marcadores de tipo SSR (–simple sequence repeat”, también conocidos como micro-satélites) en una colección de cuarenta y ocho accesiones. De los treinta y siete micro-satélites polimórficos estudiados, el PIC (–polymorphic information content”) varió entre 0,08 y 0,73, con un promedio de 0,36. Se mostró que este nivel de polimorfismo fue suficiente como para permitir un análisis filogenético de las accesiones, permitiendo agruparlas en cinco grupos mayores (coeficiente de similaridad de 0,75), cuatro de los cuales incluyen dos a cuatro accesiones en cada uno, mientras el quinto grupo incluyó las treinta y cinco accesiones restantes. Dos de los pequeños grupos incluyeron accesiones provenientes de la misma región. Se observaron otros agrupamientos dentro de la colección, como por ejemplo un grupo a nivel de similaridad de 0,85 que contuvo la mayoría de las accesiones de Irán, mientras los cultivares norteamericanos –Elias” y –Fogo” se encontraron agrupados juntos en un grupo a similaridad 0,79. Los cultivares –Katan” y –Daneh-Ghanari” mostraron una similaridad de 0,94, un reflejo de su pedigrí común. Fueron caracterizadas relaciones adicionales entre accesiones provenientes de distintas regiones, y se demostró que accesiones provenientes de regiones vecinales tendieron a mostrar similaridades entre sí. Sin embargo, accesiones de algunas regiones fueron distribuidas en distintos grupos, y en general no fue posible lograr agrupar las accesiones limpiamente por región.

En conclusión, la metodología de marcadores moleculares empleada en este estudio mostró ser una herramienta más poderosa para la identificación de variación genética que el análisis de isoenzimas.

## VII.4- Metabolómica

Durante años aún más recientes, se ha desarrollado una disciplina adicional, denominada “metabolómica”, la que se puede definir como una disciplina que permite la detección, cuantificación y el estudio del conjunto de metabolitos de una célula, tejido u órgano (Roessner, 2009).

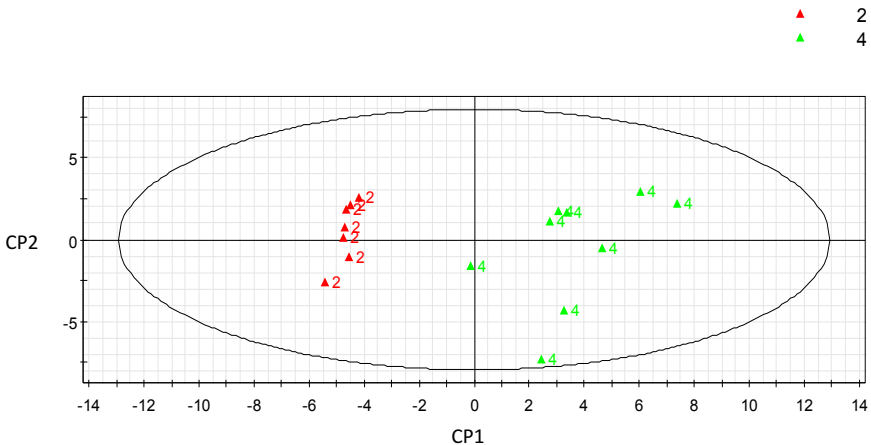
Dado que dichos metabolitos son moléculas pequeñas producidas por el metabolismo de un organismo, el cual generalmente es muy dependiente de su actividad génica, la metabolómica constituye una herramienta potencialmente valiosa para la caracterización de la variabilidad genética presente en una colección de germoplasma. Esta tecnología fue aplicada por primera vez al estudio de alpiste por Cogliatti *et al.* (2011) y Rogers *et al.* (2012). En este análisis, se determinaron los perfiles metabólicos en treinta y tres accesiones de alpiste por “electrospray ionization - mass spectrometry” (ESI-MS; ionización por “electrospray” - espectrometría de masa), a través de la extracción de los metabolitos en los granos por solventes basados en metanol y cloroformo. Subsecuentemente, a través de una serie de análisis de componentes principales (PCA) aplicados a las composiciones de metabolitos de cada accesión, clasificada de acuerdo con su región geográfica de origen, se pudo lograr discriminar la mayoría de las regiones entre sí. Por ejemplo, en un análisis inicial de los datos, en el cual se incluyeron todas las regiones, se pudo distinguir las accesiones provenientes de Irán y Suecia de las restantes, y además las accesiones provenientes de Marruecos-Egipto-Jordania, las cuales en este caso se superpusieron entre sí. Subsecuentemente se excluyeron los datos correspondientes a estas regiones y se repitió el análisis; como resultado se pudieron distinguir las regiones de Brasil, México y Turquía de las restantes. En un tercer análisis, se lograron distinguir las regiones de Italia, Portugal, Suiza y EEUU de las restantes. Finalmente, de un cuarto análisis, se lograron discriminar las demás regiones, aunque con mayor grado de superposición entre sí.

Además de los análisis generales, se realizaron análisis comparando pares contrastantes de regiones geográficas. Como resultado, se pudieron identificar las masas de mayor influencia en las separaciones,

lo que se hizo sobre la base de las cargas (loadings) generadas por los PCA. Como ejemplo, en la Figura 3 se muestra la separación entre las accesiones provenientes de México y las de Irán, donde se puede discernir una clara discriminación entre las dos regiones geográficas (datos no publicados).

De este análisis, se concluye que ESI-MS permite de manera promisoría discriminar el germoplasma de alpiste de distintas regiones geográficas, información valiosa en programas de mejoramiento genético, dado que la base de la discriminación fue principalmente la variación genética. Queda para identificar en el futuro los metabolitos específicos responsables de las diferencias, a fin de explorar su relación con el comportamiento agronómico.

Se prevé que la combinación de esta técnica con la de los marcadores moleculares resultaría en una poderosa metodología para la discriminación de distintos materiales de alpiste.



**Figura 3:** Separación por componentes principales (CP) 1 y 2 de las accesiones de México (código 2) e Irán (código 4)

## VII.5- Referencias

Carrillo, J.M.; Rouset, M.; Qualsen, C.O. and Kasandra, D.D. (1990). Use of recombinant inbred lines of wheat for study of association of high-molecular-weight glutenin alleles to quantitative traits. 1. Grain yield y quality prediction tests. *Theor. Appl. Genet.* 79: 321-330.

Cogliatti, M.; Bongiorno, F.; Dalla Valle, H. and Rogers, W.J. (2011). Canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) accessions from nineteen countries show useful genetic variation for agronomic traits. *Journal of Plant Science* 91: 1-12.

Cogliatti, M. (2009). Variabilidad genética en alpiste como base para su mejoramiento. Trabajo de tesis de Magister Sc. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Bs. As. Argentina. 67 pp

Jvornik, B.; Sinkovic, T.; Vapa, L.; Koebner, R.M.D. and Rogers, W.J. (1991). A comparison of methods for identifying and surveying the presence of 1BL.1RS translocations in bread wheat. *Euphytica* 54: 45-53.

Kadir, Z.B.A. (1974). DNA values in the genus *Phalaris* (Graminea). *Chromosoma* 45: 379-386.

Lerner S.E.; Cogliatti, M.; Ponzio N.R.; Seghezzo M.L.; Molfese E.R. y Rogers W.J. (2004). Genetic variation for grain protein components and industrial quality of durum wheat cultivars sown in Argentina. *Journal of Cereal Science* 40: 161-166.

Li J.; Båga, M.; Hucl, P. and Chibbar, R.N. (2011). Development of microsatellite markers in canary seed (*Phalaris canariensis* L.). *Molecular Breeding* 28: 611-621.

Matus-Cádiz M. and Hucl, P. (1999). Isoenzyme variation within and among accessions of

annual *Phalaris* species in North America Germplasm Collections. *Crop Science* 39: 1222-1228.

Poverene, A.M.; Carrera, A.; Marincioni, M.C. y Bodega, J.L. (1994). Variación isoenzimática en una colección de alpiste. III Congreso Nacional de Trigo y I Simposio Nacional de Cereales de Siembra Otoño-Invernal, Bahía Blanca. Libro de actas pp 279-280.

Roessner U. and Bacic, A. (2009). Metabolomics in plant research. *Australian Biochemist* 40: 9-11 and 20.

Rogers, W. J., Cogliatti, M.; Burrell, M. M.; Steels, C.; Kallenberg, F.; Bongiorno, F. y Dalla Valle, H. (2012). Mejoramiento y metabolómica del cultivo de alpiste (*Phalaris canariensis*). En “Cereales de Invierno: la investigación científico-técnica” desarrollada por el INBA, (CONICET/FAUBA), el BIOLAB AZUL (CIC-PBA/FIBA/FAUNCPBA), la Facultad de Agronomía - UBA y la Facultad de Agronomía - UNCPBA. Compilado por SA Stenglein, MV Moreno, M Cogliatti, WJ Rogers, MA Carmona y RS Lavado. 1ra ed. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Bs. As., 2012. ISBN 978-950-658-301-9, pp: 147-153.

Villarroya, M.; Cadahia, E. y Garcia-Baudin, J.M. (1983). Variabilidad isoenzimática en *Phalaris minor* Retz. y *P. brachystachys* Link. Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola 23: 85-95. Madrid, España.