

Hacia el mejoramiento de la productividad del algodón usando estrategias moleculares y nucleares

Arturo Olortegui¹ jaol_1@hotmail.com, Marco Espinoza¹ mespinoza@ipen.gob.pe,
Oswaldo Lezcano² aac@peru.com, Ricardo Balarezo² aac@peru.com,
Roberto Basilio² aac@peru.com, Ysabel Montoya¹

¹ Departamento de Producción y Desarrollo Tecnológico. Instituto Peruano de Energía Nuclear. Apartado Postal 1687. Lima, Perú

² Estación Experimental de Cañete. Asociación de Agricultores de Cañete. Km. 7.5 Carretera a Lunahuana. Lima, Perú

Resumen

Este es el primer trabajo de investigación que se realiza en el Perú, el cual permitirá conocer el grado de variabilidad genética que poseen 27 accesiones de algodón del Banco de Germoplasma de Cañete usando marcadores moleculares (AFLP). Dos de las nueve combinaciones de oligonucleótidos evaluados en la amplificación selectiva de AFLP (E1 M1 & E2 M2) fueron seleccionados por ser los más polimórficos. Estas dos combinaciones serían candidatos para la conformación de un panel de marcadores moleculares para la caracterización del algodón peruano. Asimismo, el desarrollo y las características morfo-productivas de plantas de algodón (CÑ-CPR-208-83) provenientes de 36,000 semillas que fueron previamente irradiadas con tres dosis de rayos gamma (150 Gy, 250 Gy & 350 Gy) será descrito. Las plantas mutantes en la primera generación (M1) presentaron variaciones morfológicas por efecto de la dosis de irradiación sin embargo la calidad de la fibra no se vio afectada. Todas las plantas M2 con signos de precocidad y/o rendimiento han sido seleccionadas y cosechadas. Durante la escritura de este artículo, las semillas M3 han sido colectadas para su posterior siembra y caracterización molecular usando SSR y AFLP.

Abstract

This is the first research performed in Peru with the objective of knowing the genetic variability among 27 cotton accessions belonging to the Cañete Germplasm Bank using molecular markers (AFLP). Two of out nine AFLP combinations (E1 M1 & E2 M2) were selected as candidates of a panel of molecular markers for the molecular characterization of Peruvian cotton. Moreover, 36,000 cotton Tangüis seeds were irradiated with γ -rays by using three doses: 150 Gy, 250 Gy & 350 Gy. Mutant plants belonging to the first generation (M1) showed morphological variations however the fiber of these plants kept their high quality. M2 plants with signs of early maturity and high yield were selected and harvested. During the writing of this article, M3 seeds were collected for their future sew and also their respective molecular characterization by using SSR and AFLP.

1. Introducción

El Perú es uno de los centros más importantes en diversidad biológica del algodón de fibra larga (Tangüis) y extralarga (Pima).

El algodón Tangüis es una especie tetraploide que contiene dos distintos genomas: A & D. El tamaño del genoma de algodón es de 2200 Mb/1C [1,2] y que con una longitud del mapa genético total aproximado de 5000 cM [3] es considerado grande en comparación a otros seres vivos. En la actualidad, el secuenciamiento del genoma del algodón continúa.

La diversidad genética en las plantas esta dada por la variación en la secuencia de ADN como resultado de las mutaciones

(espontáneas o inducidas por irradiaciones), recombinaciones y/o selecciones desarrolladas por los fitomejoradores. Todos estos eventos podrían causar cambios en los genes y ocasionar modificaciones en las características morfológicas.

En nuestro país, existen escasos y dispersos Bancos de Germoplasma de algodón desconociéndose las accesiones de algodón que poseen con el fin intercambiar accesiones y en la participación de las redes nacionales y mundiales de Bancos de Germoplasma existentes. El conocimiento de la variabilidad genética de una línea de algodón permitiría establecer un registro de genotipos en los Bancos de Germoplasma como control de calidad interno y servir de referencia nacional e internacional.

Las técnicas más usadas para conocer la biodiversidad de plantas son las denominadas Repeticiones de Secuencias Simples o microsátélites [4,5] y el Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados conocido como AFLP [6]. En este artículo centraremos nuestra atención en AFLP

La principal ventaja de los AFLPs es que no requiere el conocimiento previo del genoma del algodón, nos ofrece un gran número de loci potencialmente polimórficos en pocos experimentos y además permite discriminar líneas de algodón relacionadas muy cercanamente [7,8]. Asimismo, AFLP esta siendo aplicado en el conocimiento de la variabilidad genética y resulta útil para los propósitos de cruzamiento en un amplio rango de especies cultivables [9,10,11].

AFLP esta basada en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción, producto de la digestión del ADN genómico usando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La presencia o ausencia de los fragmentos amplificados genera un patrón genético específico para cada línea de algodón, el cual es analizado por visualización directa o por el empleo de programas software, dándole un valor de uno a las bandas existentes y de cero a las no observadas. En la actualidad, aun se carece de un panel de marcadores moleculares estándar para la caracterización del algodón. Sin embargo múltiples esfuerzos están realizándose para su obtención.

2. Materiales y Métodos

Material biológico

Treinta seis mil semillas de algodón Tangüis de la variedad CN-CPR-208-83 perteneciente a la Estación Experimental de Cañete de la Asociación de Agricultura de Cañete (AACñ) fueron sometidas a tres dosis de irradiación gamma (γ) en el Departamento de Servicios Radiológicos del Instituto Peruano de Energía Nuclear el día 10 de Marzo del 2005. Estas semillas fueron denominadas M1. El primer grupo de semillas (n=12,000) denominado M1/150 recibió 150 Gy de rayos γ . El segundo grupo de semillas (n=12,000) denominadas M1/250 recibió 250 Gy y el tercer grupo de semillas (n=12,000) denominadas M1/350 recibió 350 Gy de rayos γ . La Tabla N° 1 detalla la relación de las 27 líneas de algodón usados en los estudios moleculares (AFLP).

Por otro lado, es importante resaltar que la fibra del algodón peruano viene sufriendo un deterioro genético, debido a la continua selección entre las mismas líneas de algodón generando una disminución en la calidad de fibra. Una manera de incrementar la diversidad genética es la inducción de mutaciones mediante la irradiación de rayos gamma a las semillas de algodón.

Durante los últimos 70 años, más de 2,252 variedades de plantas mutantes inducidas por mutaciones con rayos gamma han sido oficialmente liberados por FAO/OIEA [12] resaltando algunas variedades de algodón tal como NIAB-78 en Pakistán el cual adquirió precocidad y permitió duplicar la producción de algodón en dicho país. Asimismo, el algodón mutante NIAB-86 fue cruzado con una línea de algodón americana W83-29 obteniéndose un nuevo cultivar con mejor tolerancia al calor y con alto rendimiento [13].

Este trabajo presenta los avances obtenidos durante la evaluación de la biodiversidad genética de algunas líneas y cultivares de algodón así como también describe el desarrollo de plantas de algodón cuyas semillas fueron irradiadas con rayos gamma, esperando seleccionar algodones candidatos, con características mejoradas (disminución de período vegetativo, aumento de rendimiento) en generaciones posteriores.

Tabla 1. Semillas de Algodón incluidos en la tipificación molecular provenientes del Banco de Germoplasma de la AACñ de propiedad de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM); Asociación de Agricultores de Ica (AAI); Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA) y de la Ex Sociedad Nacional Agraria (Ex-SNA).

N°	ALGODÓN	ESPECIE	PROCEDENCIA	PROPIEDAD
1	CÑ-601-51	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Cañete. Lima	AACñ
2	CÑ-221-52	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Cañete. Lima	AACñ
3	Cañete (HDA Hualcara)	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Cañete. Lima	AACñ
4	CÑ-CPR-198-74	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Cañete. Lima	AACñ
5	CÑ-W-339-67	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Cañete. Lima	AACñ
6	CÑ-CPR-208-83	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Cañete. Lima	AACñ
7	UNA 1	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Lima.	UNALM
8	ICA-757-60	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Ica	AAI
9	ICA-573-52	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Ica	AAI
10	ICA-1314-55	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Ica	AAI
11	Tangüis Virescente	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Moquegua	AACñ
12	LM.2-E (LM:12-40) 7-35	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Lima	INIA
13	LM-1737-60	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Lima	INIA
14	Tangüis Especial	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Pisco	AACñ
15	C.B. 24-38	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Huacho	AACñ
16	Algodón del país (CATIL)	<i>G. barbadense</i>	Moquegua	AACñ
17	Algodón del árbol	<i>G. barbadense</i>	Moquegua	AACñ
18	Semi aspero	<i>G. barbadense</i>	Huanuco	AACñ
19	SNA-5039	<i>G. barbadense</i> (Tangüis)	Lima.	ExSNA
20	(A-23-39) Pima-Direx-8	<i>G. barbadense</i> (Pima)	Piura	AACñ
21	Pima S-5 (Fundal) (a)	<i>G. barbadense</i> (Pima)	Arizona. USA	AACñ
22	CÑ-H. X 939-58 X	<i>G. barbadense</i>	Cañete. Lima	AACñ
23	T. Boza-Zarumilla	<i>G. darwinii</i>	Tumbes	AACñ
24	Sakha 7-37 X	<i>G. thurberri</i>	Cañete. Lima	AACñ
25	Coker-100-Star-1	<i>G. hirsutum</i>	USA	AACñ
26	Variedad punctatum	<i>G. hirsutum punctatum</i>	USA	AACñ
27	Del Cerro	<i>G. hirsutum</i>	Lambayeque	AACñ

Siembra y Cosecha

Las 36,000 semillas irradiadas de la variedad CÑ-CPR-208-83 fueron distribuidas en 6 parcelas por duplicado y en cada parcela se sembraron 3,000 semillas bajo la conducción de la AACñ en la ciudad de Casma el día 13 de marzo del 2005. En el estudio, 1,080 semillas testigo (sin irradiar) de la variedad CÑ-CPR-208-83 fueron incluidas.

El porcentaje de germinación de la generación M1 fue contado a los 12 días de siembra y el porcentaje Supervivencia de las plantas fue considerado a los 30 días después de la siembra. Los botones florales de la generación M1 fueron autofecundados. La cosecha de la generación M1 fue realizado el día 3 de Octubre del 2005.

Las nuevas semillas colectadas provenientes de los botones autofecundados fueron denominadas M2 y sembradas en la Estación Experimental de Cañete el día 8 de Octubre del 2005. La segunda generación, denominadas plantas M2 han sido

cosechadas obteniéndose las semillas M3 en Abril 2006.

Extracción y Restricción múltiple del ADN con las enzimas *EcoRI* y *MseI*

Las extracciones de ADN de algodón fueron realizadas usando el método de CTAB (14) a partir de 100 mg de hojas cotiledonarias. Posteriormente, 500 ng de ADN fue digerido con 10 U de la enzima *EcoRI* y 5 U de la enzima *MseI* e incubadas a 37°C. Transcurridas tres horas, las muestras biológicas fueron incubadas a 65°C durante 15 minutos (min) y almacenadas a 4°C hasta su uso.

AFLPs

La reacción de restricción múltiple obtenida en la etapa anterior, fue incubada con 3 U de T4 ADN ligasa; 50 pmol del Adaptador *MseI* y 5 pmol del adaptador *EcoRI* con el Buffer de ligación a 37°C durante 3 horas [6]. Los fragmentos de ADN digeridos y ligados con los adaptadores (20 ng) fueron amplificados

preseleccionados. Los oligonucleótidos cebadores usados para esta amplificación pre-selectiva [7] fueron EcoRI/A (5'-gac tgc gta cca att ca-3') y MseI / C (5'-gat gag tcc tga gta ac-3').

Posteriormente, la amplificación selectiva se realizó usando la dilución 1/5 del producto de pre-amplificación; 200 μ M de dNTPs, 50 ng de oligonucleótidos cebadores y 1 U de Taq ADN Polimerasa; 3.5 mM de Cl_2Mg . El primer ciclo de denaturación fue realizado a 94°C durante 40 seg. El anillamiento fue efectuado a 65°C durante 30 seg y 72°C para la extensión durante 60 seg, seguidos de 12 ciclos de touchdown PCR, en el cual la temperatura de anillamiento fue decreciendo 0.2°C en cada ciclo hasta una temperatura de anillamiento touchdown, que fue alcanzada a 56°C. Posteriormente, se repitieron 20 ciclos. En esta amplificación selectiva se usaron seis nucleótidos cebadores [7] en sus nueve combinaciones posibles denominados E1 (5'-gac tgc gta cca att **caa g**3'); E2 (5'-gac tgc gta cca att **cac c**3'); E3 (5'-gac tgc gta cca att **cag c**3'); M1 (5'-gat gag tcc tga gta **act g**3'); M2 (5'-gat gag tcc tga gta **aca t**3') y M3 (5'-gat gag tcc tga gta **aca c**3').

Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones denaturantes a 1000 V. El gel fue teñido con nitrato de plata y los productos de amplificación fueron visualizados.

La presencia o ausencia de los fragmentos amplificados generaron un patrón genético o genotipo específico para cada línea de

algodón, el cual fue analizado por visualización directa, dándole un valor de uno a las bandas existentes y de cero a las no observadas.

3. Resultados y Conclusiones

La primera generación de la población de plantas CN-CPR-208-83 cuyas semillas recibieron la dosis de 150 Gy (M1/150) no presentaron notorios cambios en la morfología de las plantas, productividad ni en la calidad de fibra. La variabilidad existente parecería ser resultado del medio ambiente.

La generación M1 que recibieron la dosis de 250 Gy y 350 Gy produjeron efectos limitantes en la germinación y supervivencia. Las plantas M1/250 mostraron un crecimiento aletargado y altura de planta disminuida. Las plantas M1/350 presentaron un alto número de plantas defectuosas y el crecimiento de un escaso número de plantas. La Figura No. 1 muestra tres parcelas de plantas M1 con las tres dosis de irradiación usadas.

En la segunda generación, todas las plantas M2 se desarrollaron normalmente. Durante la escritura de este artículo, todas las plantas M2 con signos de precocidad y otra característica morfo-productiva con valor agregado (rendimiento) han sido seleccionadas y cosechadas para su caracterización molecular. Las semillas M3 seleccionadas serán sembradas durante cinco generaciones adicionales con el fin de estabilizar las mutaciones de las progenies con fines económicos.



Figura 1. Las plantas M1 que crecieron en la primera generación fueron afectadas morfológicamente de acuerdo a la dosis de irradiación que las semillas recibieron.

Efecto de la irradiación en las semillas M1 en la Germinación y Supervivencia

En la primera generación, la viabilidad y la supervivencia de las plantas M1/150 no fue

afectada por la dosis de irradiación recibida en contraste con la población M1/250 y M1/350 quienes fueron fuertemente afectadas negativamente (Tabla N° 2).

Tabla 2. Todas las semillas M1 sufrieron efectos por la irradiación de rayos gamma en la germinación y en el número de plantas M1 supervivientes.

Dosis Irradiación (Gy)	Nº semillas germinadas	% de germinación	Nº de plantas sobrevivientes	% de supervivencia
Testigo	810	80	747	92
150	4315	73.4	3743	86.7
250	3756	64.2	2774	73.9
350	2961	50.8	1393	47

Características morfoproductivas de la generación M1

Las características morfoproductivas de las plantas M1/150 fueron muy similares a las plantas testigo. En contraste, la altura de las

plantas M1/250 se vio seriamente afectada llegando alcanzar únicamente 90 cm. Asimismo, el número de ramas fruteras (n=13), el número de órganos por planta (n=12) así como otras características morfológicas en relación con las plantas testigo fueron variadas (Tabla 3).

Tabla 3. Las características morfoproductivas de las plantas M1 no fueron afectadas seriamente excepto en las plantas M1/350.

Dosis de Irradiación	Altura de planta (m)	Posición Nudal	Nº de ramas vegetativas	Nº de ramas fruteras	Nº de órganos por planta
Testigo	1.82	8	3	26	22
150 Gy	1.68	8	3	24	25
250 Gy	1.45	7	4	19	18
350 Gy	0.98	7	4	13	12

Porcentaje de plantas M1 al final de la cosecha

Un mayor número de plantas M1/150 (n=3,676) fueron cosechadas en contraste con las plantas M1/250 (n=2,551) como se muestra en la Tabla 4.

La mortalidad de las plantas M1/350 continuo durante todo el desarrollo llegando a la cosecha únicamente el 4.9% de las plantas con poca productividad.

Tabla 4. El porcentaje de plantas M1/150 y M1/250 fue mayor al 90% no siendo así para las plantas M1/350.

Dosis de Irradiación (Gy)	Nº de plantas M1 cosechadas	Porcentaje de plantas M1 cosechadas (%)
Testigo	739	98.9
150	3,676	98.2
250	2,551	91.9
350	68	4.9

Todas las plantas M1 conservaron la calidad de su fibra

Es importante mencionar que la calidad de la fibra no se vio afectada ni presentó variación de consideración por efecto de dosis de irradiación. La ligera variabilidad observada se debería al medio ambiente y el muestreo (Data no mostrado).

Las plantas M2 han sido cosechadas

Todas las semillas M2 colectadas (22,448) provenientes de las plantas M1/150 fueron

sembradas así como las 1,174 semillas provenientes de las plantas M1/250. y todas las semillas M2 (n=999) provenientes de las plantas M1/350. Ninguna de ellas mostraron variaciones morfológicas negativas ni disminución en el tamaño de manera resaltante. Algunas plantas M1 y M2 mostraron un mayor número de ramas (indicador de mayor rendimiento) así como el inicio de botones y el inicio de floración han sido reducidos a un menor tiempo (indicadores de precocidad).



Figura 2. La mayoría de las plantas M2 (M2/150, M2/250 y M2/350) están creciendo morfológicamente similar a las plantas testigo.

Identificación de dos marcadores moleculares polimórficos

Dos combinaciones de oligonucleótidos de segunda selección denominadas E1M1 y E2M2 fueron seleccionadas por ser las más polimórficas de las nueve combinaciones de oligonucleótidos evaluadas de segunda selección.

Ambas combinaciones de oligonucleótidos son candidatos para tipificar el algodón peruano desde que están en el tamaño y rango esperado (aproximadamente 25-50 bandas). Sin embargo, debe mencionarse que los AFLP generados del ADN genómico de algodón muestran mayor polimorfismo con el marcador E2M2 que con el marcador E1M1.

Las figuras 3 & 4 muestran el perfil genético de las 27 líneas de algodón incluidos en este estudio incluyendo el cultivar CÑ-CPR-208-83, antes de recibir la irradiación gama.

Es importante señalar que un mayor número de combinaciones de marcadores están siendo evaluadas con el fin de obtener un patrón genético específico para cada algodón y preservar los derechos del obtentor de las semillas así como proteger nuestra biodiversidad de la biopiratería.

Un árbol filogenético será construido con las 27 líneas de algodón después de analizar un mayor número de marcadores moleculares así como se establecerá la distancia genética existente entre ellos.

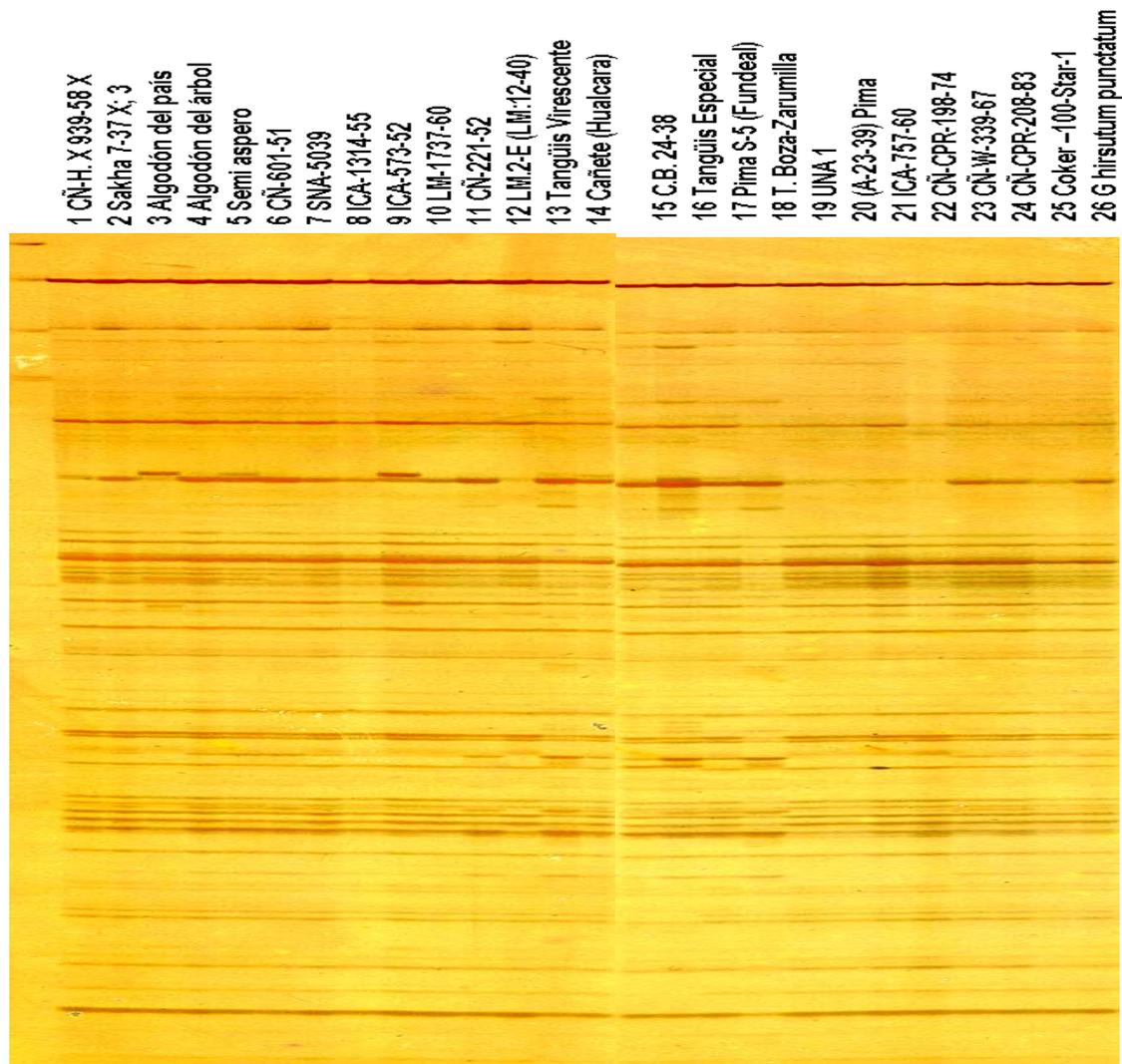


Figura 3. AFLPs generados del ADN genómico de algodón usando las combinaciones de oligonucleótidos E1M1.

Además, consideramos que los marcadores moleculares seleccionados (E1M1 & E2M2) formaran parte de un panel de marcadores que serán útiles herramientas para discriminar genéticamente las accesiones del Banco de Germoplasma de Algodón de la AACñ.

Estos resultados son los avances iniciales de este estudio con el que se espera construir dendrogramas que permitirán establecer las bases del conocimiento de la biodiversidad genética, la distancia genética y sus relaciones intra-específicas.

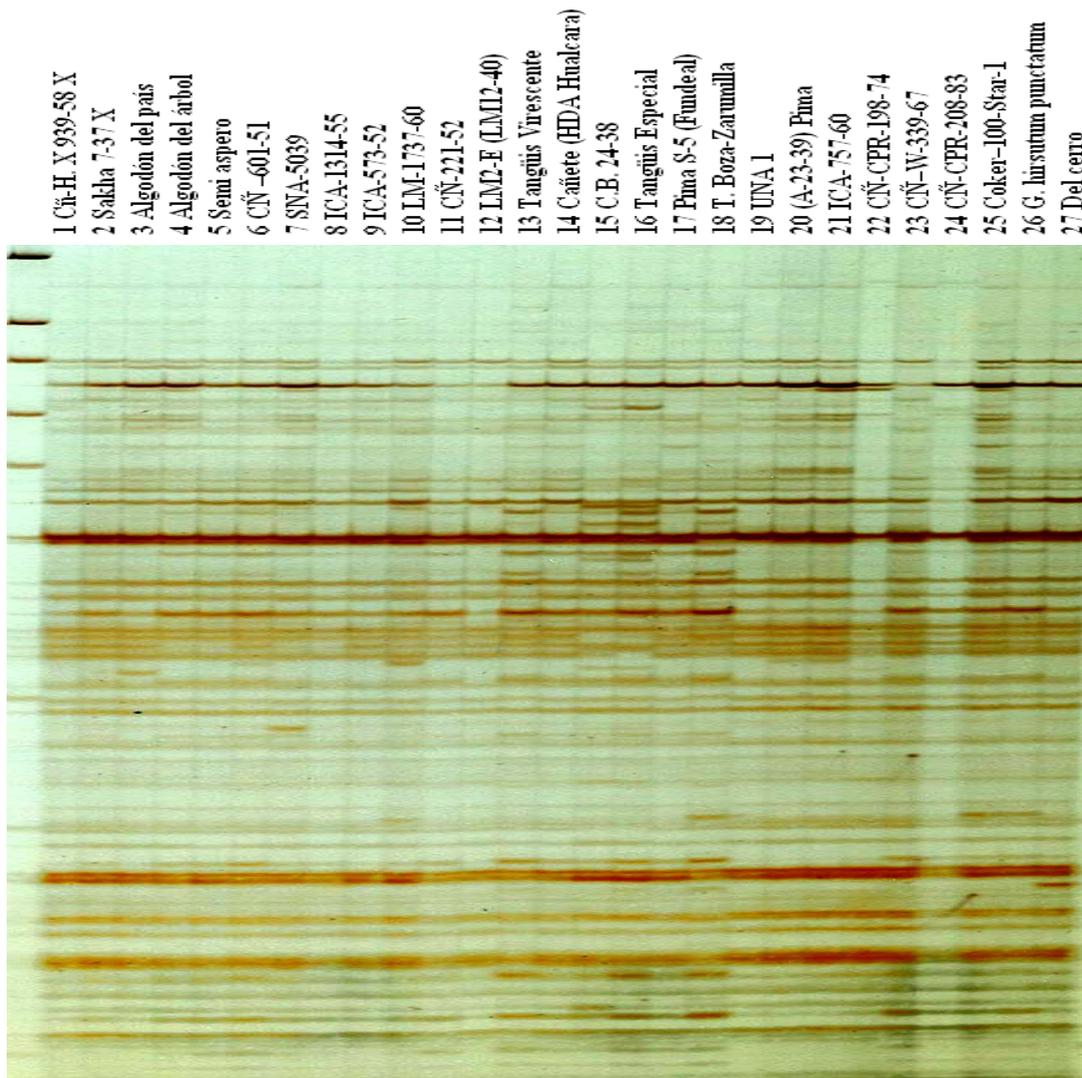


Figura 4. AFLPs generados del ADN genómico de algodón usando las combinaciones de oligonucleótidos E2M2.

4. Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Concejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONCYTEC) y al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el apoyo financiero recibido para la ejecución de este trabajo de investigación.

Asimismo, agradecemos al Ing. Marco Linares, Ing. Johnny Vargas y al Ing. Jorge Condori, del Departamento de Servicios Radiológicos del Instituto Peruano de Energía Nuclear por su esmerado cuidado en el proceso de la irradiación de las semillas de algodón.

5. Bibliografía

- [1] Arumuganathan K., E.D. Earle. Nuclear DNA Content of Some Important Plant Species. *Plant Molecular Biology Reproductive*. (1991) 9:208-218.
- [2] Michaelson M.J., H.J. Price, J.R. Ellison, J.S. Johnston. *Comparison of Plant DNA Contents determined by Feulgen Microspectrophotometry and Laser Flow Cytometry*. *American Journal of Botany*. (1991) 78(2):183-188.
- [3] Patterson A. H. & Smith R. H. *Future horizons: biotechnology for cotton Improvement*. In: C.W. Smith and J.T. Cothen (ed) *Cotton*. John Wiley & Sons, Inc., NY. (1999) 415-432.
- [4] Gutiérrez, O., S. Basu, S. Saha, JN. Jenkins, D.B. Shoemaker, CL. Cheathan and J.C: McCarty, Jr. *Genetic Distance among Selected Cotton Genotypes and Its*

- Relationship with F2 Performance.* Crop Science. (2002) 42: 1841-1847.
- [5] Kohel R.J. & Yu J. *Molecular characterization of Gossypium germplasm for cotton improvement.* In: Managing Plant Genetic Diversity. Eds J.M.M. Engels, V. Ramanatha Rao, A.H.D. Brown & M.T. Jackson. (2002). pp 67- 75
- [6] Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Fijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.* Nucleic Acids Research. (1995). 23:4407-4414.
- [7] Abdalla AM, Reddy OUK, El-Zik KM, Pepper AE. *Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP.* Theoretical and Applied Genetics. (2001). 102: 222-229.
- [8] Pillay M, Myers G.O. *Genetic Diversity in Cotton Assessed By Variation in Ribosomal RNA Genes and AFLP Markers.* Crop Science. (1999) 39: 1881-1886.
- [9] Mba C, Tohme J. *Use of AFLP markers in surveys of plant diversity.* Methods in Enzymology. (2005) 395:177-201.
- [10] Laborda PR, Oliveira KM, Garcia AA, Paterniani ME, de Souza AP. *Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers?* Theoretical Applied Genetic. (2005) Nov; 111 (7):1288-99.
- [11] Besse P, Taylor G, Carroll B, Berding N, Burner D, McIntyre CL. *Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis.* Genetica. (1998) Oct; 104(2):143-53.
- [12] Maluszynski, M., K. Nichterlein, L. van Zanten & B.S. Ahloowalia,. *Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA Database.* Mutation Breeding Review. (2000). 12: 1–84.
- [13] Ahloowalia B.S; Maluszynski M. & Nichterlein. *Global impact of mutation-derived varieties.* Euphytica. (2004) 135: 187-204.
- [14] Patterson A.H.; Brubaker C.L. & Wendel J.F. *A rapid method for extraction of cotton (Gossypium spp) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis.* Plant Molecular. Biology Reproductive. (1993) 11(2): 122-127.