

## DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *LEMNA* (LEMNACEAE) UTILIZANDO FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPDS)

Frank Solano Campos<sup>1</sup> y Elizabeth Salas Zúñiga<sup>2</sup>.

Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica.  
Corel: <sup>1</sup>omegatherion66@yahoo.com; <sup>2</sup>elisalasz@gmail.com

### RESUMEN

La similitud genética entre *Lemna aequinoctialis* y *Lemna valdiviana* fue determinada utilizando el análisis de fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs). Un total de 26 de los 60 iniciadores (10 nucleótidos) monitoreados fueron capaces de amplificar ADN, generando 143 bandas desde 200pb hasta 1500pb, de las cuales 109 son polimórficas (76,2%), con una media de 4.19 bandas polimórficas por iniciador. De estas solo 18 fueron específicas de *L. aequinoctialis*, mientras que 91 bandas fueron específicas para *L. valdiviana*. Las distancias genéticas se estimaron por medio del coeficiente de similitud Jaccard. Con base en las distancias genéticas, se construyó un dendrograma mediante el método UPGMA, usando el programa BioDiversityPro. Se concluye de este estudio que hay claras diferencias (alta diversidad genética) entre *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*, y que el uso de marcadores RAPD es muy eficiente en la identificación de estas especies.

**Palabras claves:** Similitud genética, RAPDs, Lemnaceae, ADN, polimorfismo.

### ABSTRACT

*Lemna aequinoctialis* and *Lemna valdiviana* were tested for genetic similarity by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. Of 60 primers (10-mer) tested, 26 generated polymorphic products. 143 bands were found from 200bp up to 1500bp, 109 were polymorphic (76.2%), with an average of 4.19. Of these, only 18 were specific of *L. aequinoctialis*, while 91 bands were specific for *L. valdiviana*. Data were used to generate Jaccard's similarity coefficients and to construct a dendrogram using UPGMA method in the BiodiversityPro statistical package. It is concluded from this

study that there were clear differences (high genetic diversity) between *L. aequinoctialis* and *L. valdiviana* and that RAPD results are comparable with those obtained from studies on morphology. It is a practical method to assess the relationships between these species.

**Keywords:** Genetic similarity, RAPDs, Lemnaceae, ADN, Polymorphism.

### INTRODUCCIÓN

La familia Lemnaceae contiene un grupo distintivo de monocotiledóneas acuáticas minúsculas, cuya reducción extrema, miniaturización de órganos y distribución cosmopolita contribuyen a su difícil sistemática y taxonomía. Algunos individuos solamente logran alcanzar una extensión de 0.3 mm en la madurez (Landolt, 1986). Su reducida y modificada morfología requiere una consideración cuidadosa de caracteres técnicos para una adecuada identificación de especies. La independencia de la información molecular fue vista como una gran ventaja, debido a que las relaciones en este grupo problemático de plantas podrían ser evaluadas independientemente de su morfología, la cual no fue vista particularmente informativa (Les *et al.*, 2002).

El potencial de la familia Lemnaceae para el tratamiento de aguas de desecho se realizó por primera vez en los años 50 en Asia. Desde entonces, los sistemas basados en esta familia han sido adoptados alrededor del mundo por la eficiencia y bajo

costo del tratamiento de aguas de desecho domésticas (Alaerts *et al.*, 1996).

La velocidad, especificidad y sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además de la facilidad con la cual puede ser llevada a cabo y su versatilidad, la hacen idealmente apropiada para su aplicación en muchos problemas de biología, en campos como biología molecular, genética humana, inmunología, ciencias forenses, evolución, ecología y poblaciones biológicas (Arnheim y Erlich, 1992).

Las tecnologías basadas en el empleo de marcadores moleculares son de utilidad no solo en la caracterización de genotipos sino también en estudios de similitud o distancia genética, que permiten obtener una clasificación de estos en diferentes grupos. Los marcadores moleculares permiten analizar un número casi ilimitado de *loci* génicos y detectar elevados niveles de polimorfismos (Bonamico *et al.*, 2004).

La técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico se ha convertido en una herramienta usada frecuentemente en genética evolutiva y poblacional, debido a que no es necesario un conocimiento previo de la estructura o secuencia del genoma (Van de Zande y Bijlsma, 1995). También es ampliamente utilizada tanto para el mapeo genético como para estudios taxonómicos y filogenéticos de muchos organismos (Danylchenko y Sorochinsky, 2005). Los resultados de los RAPDs son comparables a los obtenidos a partir de estudios en morfología y citología. Es un método adicional muy útil para evaluar las relaciones entre géneros y especies (Yong-Hong, 2000).

Esta técnica se basa en la amplificación de segmentos aleatorios de ADN utilizando iniciadores individuales con una secuencia de nucleótidos al azar. El oligonucleótido (10 pares de bases) se utiliza en la PCR a bajas temperaturas de alineamiento. Cuando el primero hibridiza con las dos bandas de ADN en sitios dentro de una distancia apropiada uno del otro, la región de ADN delimitada por estos dos sitios será amplificada. Pequeños cambios de nucleótidos (polimorfismos) en uno de los dos sitios puede evitar la hibridización del primero y así evitar también la amplificación del ADN (Williams *et al.*, 1990).

Este estudio se llevó a cabo con el fin de caracterizar y determinar la diversidad genética entre *Lemna aequinoctialis* y *Lemna valdiviana*, además de evaluar la utilidad de la técnica de polimorfismos de ADN amplificadas al azar (RAPDs) y de esta manera establecer un método práctico para distinguir entre ambas especies.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se recolectaron muestras de *Lemna aequinoctialis* y *Lemna valdiviana* de las locaciones (Río Tibás en San José y San Rafael de Heredia) y fueron trasladadas a estanques con un sustrato apropiado, cultivadas bajo las mismas condiciones de crecimiento.

### Extracción de ADN

El ADN total se extrajo de aproximadamente 300 mg de material vegetal macerado con nitrógeno líquido. Se agregaron 600  $\mu$ l de buffer de extracción (Cenis, 1992) y se agitó en vortex. Se realizó un paso de incubación a 4°C por tres horas. La fase acuosa fue extraída con 500  $\mu$ l de fenol:cloroformo:alcoholisoamílico (PCI 25:24:1), agitando por inmersión y centrifugando a 12000 rpm por diez minutos, a 4°C. El sobrenadante acuoso se combinó con 200  $\mu$ l de acetato de sodio 3M (pH 5.2) y con 500  $\mu$ l de etanol 100% frío, se agitó por inmersión. Otro paso de incubación a -21°C se llevó a cabo por 30 minutos. Un precipitado de ADN se obtuvo luego de una centrifugación a 14000 rpm por diez minutos, a 4°C. El sobrenadante fue desechado y se lavó el precipitado con 150  $\mu$ l de etanol al 70%, centrifugando a 12000 rpm por diez minutos, a 4°C. El sobrenadante fue nuevamente desechado y el precipitado se dejó secar al aire en forma invertida durante dos horas. El ADN fue resuspendido en buffer TE (1 mM Tris/HCl pH 7.8; 0.1 mM EDTA) y 1  $\mu$ l de ARNasa (Fermentas) e incubado a 37°C por 30 minutos. Se almacenó a 4°C para su uso inmediato y a -20°C para almacenamiento prolongado. La eficacia de la extracción se determinó mediante la electroforesis de una alícuota de ADN sobre un gel de agarosa al 1% p/v, teñido con 1  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) en buffer TBE (1X), durante cinco minutos a 95 V y luego diez minutos a 72 V. Para cuantificar y

determinar la calidad del ADN extraído se recurrió a lecturas espectrofotométricas a 260/280 nm.

### Amplificación RAPD-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl, cuyos componentes fueron: 12,5 µl de 2X PCR Master Mix (Fermentas), que contiene una mezcla de 0.05 U/µl Taq Polimerasa (recombinante), buffer de PCR, MgCl<sub>2</sub> (4 mM) y dNTPs (0.4 mM), 1 µl (25 µM) de cada iniciador, 1.5 µl de ADN y 10 µl de agua. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción fue amplificada a través del siguiente perfil de temperaturas: desnaturalización inicial a 94°C por 1.5 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, hibridación a 35°C por 30 segundos y extensión por un minuto a 72°C, y una extensión final por tres minutos a 72°C. Los 60 oligonucleótidos (10 pares de bases) fueron adquiridos de Operon Technologies, Inc. (Alameda, California, EE. UU.), correspondientes a las series OPA, OPB y OPF. Se colocó una alícuota de 10 µl del producto de la reacción RAPD-PCR más 2 µl de buffer de montaje (5X) sobre un gel de agarosa al 1.2% p/v, teñido con 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). La corrida electroforética se realizó por cinco minutos a 93 V y por una hora a 46 V en buffer TBE (1X). Para un estándar de tamaño, se incluyó un marcador de peso molecular (GeneRuler 1Kb DNA Ladder, Fermentas). Después de la electroforesis, las bandas fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz U.V. (312 nm).

### Análisis de datos RAPD

Los datos RAPD fueron tratados como un marcador dominante, en el cual cada banda es considerada como un único locus con dos alelos, de los cuales solo uno es amplificado (Geleta *et al.*, 2007). Las bandas fueron registradas como un conjunto de datos discretos, en el cual la presencia de una banda es denotada como un "1" y la ausencia de una banda como "0", este criterio se utilizó para generar una matriz binaria. La relación, expresada de manera cuantitativa a través de la similitud genética entre ellas, fue estimada por medio del índice de Jaccard (Jaccard, 1908), incluido en el

paquete estadístico BioDiversityPro (Pielou, 1984). Este coeficiente de asociación mide las similitudes o diferencias en los estados de los caracteres entre las unidades taxonómicas o genotipos. El resumen de las relaciones entre ambas especies se representó gráficamente por medio de un dendrograma, aplicando el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Averages).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis RAPD

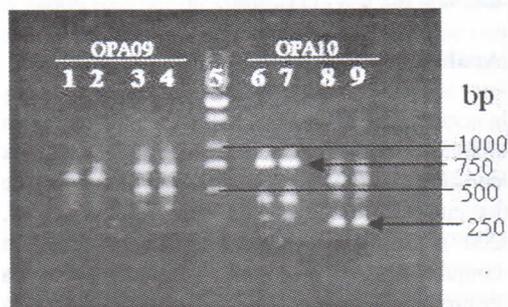
De los 60 iniciadores monitoreados, 26 fueron seleccionados por generar productos de amplificación (Cuadro 1). Un total de 143 bandas de ADN fueron amplificadas, de las cuales el 76,2% fueron polimórficas, reflejando la diversidad genética en *Lemna*. De estas bandas, solo 18 fueron específicas de *Lemna aequinoctialis*, mientras que 91 lo fueron para *Lemna valdiviana* (Figs. 1-5). El número de bandas del primero varió de dos (OPA 2, OPA 6 y OPF 16) a 12 (OPB 10). En promedio 4.19 bandas polimórficas fueron amplificadas por iniciador. La escasa similitud en la presencia de bandas indica que la mayoría de los marcadores RAPD utilizados no son regiones conservadas (Van de Zande y Bijlsma, 1995). Este polimorfismo puede derivarse de la sustitución de un nucleótido por otro o de la inserción y delección de secuencias de ADN.

La comparación de patrones alélicos, mediante coeficientes de similitud, permite establecer grupos de individuos con características genéticas similares (Pejic *et al.*, 1998). Las bandas polimórficas de RAPD permitieron diferenciar las dos especies de la familia Lemnaceae, lo que se verificó haciendo un dendrograma (Figura 5). Esta representación gráfica permite estimar las relaciones genéticas entre ambos genotipos, formando un grupo relacionado entre sí, con un porcentaje de similitud del 13,49%.

Los marcadores moleculares reconocen directamente las diferencias genéticas entre individuos, obteniéndose un "perfil molecular" característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas (Morell *et al.*,

**Cuadro 1.** Iniciadores, número total de bandas amplificadas y número y proporción de bandas polimórficas.

Secuencia (5' - 3')	Número total de bandas	Bandas polimórficas	
		Número	Proporción (%)
CAGGCCCTTC	6	4	66,7
TGCCGAGCTG	2	2	100,0
AGTCAGCCAC	3	3	100,0
AATCGGGCTG	5	3	60,0
AGGGGTCTTG	7	3	42,9
GGTCCCTGAC	2	2	100,0
GAAACGGGTG	7	5	71,4
GTGACGTAGG	4	2	50,0
GGGTAACGCC	4	4	100,0
GTGATCGCAG	6	6	100,0
CAGCACCCAC	7	5	71,4
GTTTCGCTCC	5	5	100,0
CATCCCCTG	6	6	100,0
GGACTGGAGT	7	7	100,0
TGCGCCCTTC	5	5	100,0
TGCTCTGCCC	5	5	100,0
GGTGACGCAG	4	4	100,0
GTCCACACGG	11	7	63,6
TGGGGGACTC	6	6	100,0
CTGCTGGGAC	12	4	33,3
GTAGACCCGT	9	5	55,6
CCTTGACGCA	7	7	100,0
ACGGATCCTG	4	2	50,0
CCTGATCACC	3	3	100,0
GGAGTACTGG	2	2	100,0
CCTCTAGACC	4	2	50,0
Total	143	109	
Polimorfismo			76,2

**Fig. 1.** Patrones RAPD-PCR de *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*. Línea 5: marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb DNA Ladder). Líneas 1, 2, 6 y 7 *L. aequinoctialis*, líneas 3, 4, 8 y 9 *L. valdiviana*.**Fig. 2.** Patrones RAPD-PCR de *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*. Línea 5: marcador de peso molecular. Líneas 1, 2, 6 y 7 *L. aequinoctialis*, líneas 3, 4, 8 y 9 *L. valdiviana*.

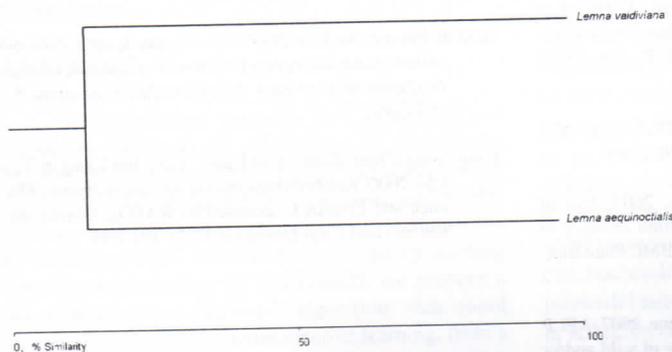


**Fig. 3.** Patrones RAPD-PCR de *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*. Línea 1: marcador de peso molecular, líneas 2, 3, 6, 7, 10 y 11 *L. aequinoctialis*, líneas 4, 5, 8, 9, 12 y 13 *L. valdiviana*.



**Fig. 4.** Patrones RAPD-PCR de *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*. Línea 1: marcador de peso molecular (1 kb), líneas 2, 3, 6, 7, 10 y 11 *L. aequinoctialis*, líneas 4, 5, 8, 9, 12 y 13 *L. valdiviana*.

Jaccard Cluster Analysis (Group Average Link)



**Fig. 5.** Dendrograma de *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*, a partir de los datos obtenidos de los 26 iniciadores estudiados. El eje horizontal expresa la similitud genética (13,49%).

1995). Además, permiten obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada (Johns *et al.*, 1997).

## CONCLUSIONES

Se han establecido relaciones genéticas (similitud genética) entre *Lemna valdiviana* y *Lemna aequinoctialis*, potenciales progenitores a usarse en un programa de biorremediación. Estos marcadores podrán ser usados para asistir el proceso de identificación analizando directamente su ADN e independientemente de su morfología.

La metodología que se empleó identificó diferencias entre dos genotipos que corresponden, en última instancia, a cambios en la secuencia del ADN. Estas diferencias se manifiestan como la presencia o ausencia de una determinada banda de ADN, dada por la posibilidad de unión de un iniciador al ADN genómico de la planta. Estos polimorfismos se deben a mutaciones puntuales o alteraciones estructurales como inserciones, deleciones o transposiciones que ocurren al azar en una especie y no en la otra (Danylchenko y Sorochinsky, 2005).

Los RAPDs son una técnica rápida, simple y precisa, que resultan apropiados para la caracterización de diferentes especies, así como para estimar las relaciones y distancias genéticas entre ellas (Xena de Enrech, 2000).

Debido a que los patrones RAPD evolucionan con rapidez y tienden a ser altamente polimórficos, la técnica parece proveer una herramienta muy útil para el reconocimiento de especies (Van de Zande y Bijlsma, 1995).

El dendrograma generado, basado en RAPD, está de acuerdo con estudios filogenéticos realizados en la familia Lemnaceae a partir de información obtenida de flavonoides, aloenzimas y secuencias de ADN cloroplasmático, y estos mostraron resultados consistentes con estudios previos, basados solamente en características morfológicas hechas por botánicos meticulosos. En ellos *L. aequinoctialis* forma un grupo monofilético con *L. perspusilla* (Sección Alatae), mientras que

*L. valdiviana* forma un grupo monofilético con *L. yungensis* y *minuta* (Sección Uninerves) (Les *et al.*, 2002).

Los datos obtenidos indican que la técnica RAPD-PCR permite una confiable y rápida diferenciación entre las especies *L. valdiviana* y *L. aequinoctialis*, aun cuando presentan morfologías muy semejantes. Además se demostró que el presente grupo de iniciadores es suficiente para interpretar las diferencias entre las dos especies.

Se concluye que hay claras diferencias (alta diversidad genética) entre *L. aequinoctialis* y *L. valdiviana*, y que el uso de marcadores RAPD es muy eficiente y útil en la identificación de estas especies.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Máster Jorge A. Madriz por su colaboración brindada en la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Alaerts, G. J., M. R. Mahbubar & P. Kelderman. 1996. Performance of a full scale duckweed covered sewage lagoon. *Wat. Res.* 30: 843-852.
- Arnheim, N. & H. Erlich. 1992. Polymerase Chain Reaction Strategy. *Annual Review of Biochemistry* 61: 131-156.
- Bonamico, N., J. Aiassa, M. Ibáñez, M. Di Renzo, D. Díaz & J. Salerno. 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. *RIA*. 33(2): 129-144.
- Cenis, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA using PCR amplification. *Nucleic. Acids. Res.* 20(9): 2380.
- Danylchenko, Oksana & Boris Sorochinsky. 2005. Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and  $\gamma$ -rays. *BMC Plant Biol.* 2005; 5(Suppl 1): S9.
- Geleta, M., T. Bryngelsson, E. Bekele & K. Dagne. 2007. AFLP and RAPD analyses of genetic diversity of wild and/or weedy *Guizotia* (Asteraceae) from Ethiopia. *Hereditas* 144: 53-62.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 44: 223-270.
- Johns, M. A., P. Skroch, J. Nienhuis, P. Hinrichsen, G. Bascur & C. Muñoz. 1997. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. *Crop Science* 37: 605-613.
- Landolt, E. 1986. *Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)*, volume 2. *The family of Lemnaceae—a monographic study*, volume 1. Zurich: Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rubel, in Zurich (71 Heft).
- Les, D. H., D. J. Crawford, E. Landolt, J. D. Gabel & R. T. Kimball. 2002. "Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family". *Systematic Botany* 27(2): 221-240.
- Morell, M. K., R. Peakall, R. Appels, L. R. Preston & H. L. Lloyd. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. *Aust. J. Exp. Agric.* 35: 807-819.
- Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino & M. Motto. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among inbred maize lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor Appl Genet* 97: 1248-1255.
- Pielou, E. C. 1984. *The interpretation of Ecological Data*. Wiley, New York. BioDiversity. 1997. The Natural History Museum/Scottish Association for Marine Science.
- Van de Zande, Lohis & R. Bijlsma. 1995. Limitations of the RAPD technique in phylogeny reconstruction in *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 8: 645-656.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski & S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Xena de Enrech, Nereida. 2000. Una década de aplicación del método rapd: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. *Acta Científica Venezolana* 51: 197-206.
- Yong-Hong, Zhou, Zheng You-Liang, Yang Jun-Liang & Yen Chi. 2000. Relationships among species of *Hystrix Moench* and *Elymus L.* assessed by RAPDs. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(2): 191-196.