

CONTRIBUCIONES

Bol. Soc. Esp. Briol. 9: 1-4 (1996)

LAS METODOS MOLECULARES Y SU UTILIZACION EN BRIOLOGIA

Olaf Werner & Rosa María Ros

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia,
30100-Murcia

Los métodos moleculares están en pleno auge en la sistemática, taxonomía y biogeografía de las plantas. En los briófitos la técnica más empleada por el momento es la caracterización de isoenzimas, que fue introducida a finales de los años setenta por el grupo de Sweykowski (Krzakowa & Sweykowski 1977a,b)

Los metodos basados en la caracterización de ADN hasta ahora se han utilizado menos y sobre todo por grupos compuestos por investigadores en biología molecular interesados en la sistemática a gran escala (Ashton et al. 1994; Capesius 1995). Estos métodos pueden ser muy útiles ya que aportan datos adicionales y bastante objetivos y en algunos casos ofrecen la única manera de resolver dudas que dejan los métodos clásicos. Pero hay que admitir, que la biología molecular no puede ser la panacea para todos los problemas que existen en la taxonomía y sistemática, si se piensa p.e. en formas muy variables que muchas veces van a mostrar la misma variabilidad, tanto a niveles morfológicos como moleculares.

A continuación se va a dar una descripción de las técnicas más representativas, los casos más típicos de su aplicación y algunas de las limitaciones que presentan.

La separación de enzimas en geles y su posterior tinción es una técnica que necesita un equipamiento de laboratorio relativamente modesto. En sus bases es un método simple: las proteínas tienen un peso molecular determinado y una carga eléctrica específica en un tampón con un pH dado. En un campo eléctrico, las proteínas más pequeñas y las de mayor carga eléctrica se mueven más rápidamente, así que podemos separar los enzimas en un gel de almidón o de poliacrilamida. Después de la separación

en el gel se procede a la tinción específica del enzima en cuestión por medio del acoplamiento de la reacción típica del enzima a otra que genera una sustancia de color fácilmente visible. De esta manera se detectan sin problemas cambios de la carga eléctrica o del peso. Los estudios más representativos con esta técnica se concentran en la genética y ecología de poblaciones, la taxonomía hasta nivel de especies congénéricas, la existencia de especies geográficas idénticas morfológicamente y la identificación de híbridos (Stoneburner et al. 1991).

De los métodos basados en ADN, uno de los más extendidos es la comparación de fragmentos de restricción, especialmente en el ADN cloroplastidial (Olmstead & Palmer 1994, Stein 1993). Como sabemos, una secuencia de ADN puede compararse con un texto escrito en una forma lineal y basado en sólo cuatro letras. De las bacterias se han aislado enzimas que cortan estas secuencias por lugares específicos, caracterizados generalmente por entre 4 y 6 pares de bases en un orden simétrico, p.e. GAATTC en el caso del enzima Eco RI (simétrico porque la cadena opuesta se lee también GAATTC). ¿Que pasa ahora si cortamos una secuencia de ADN con estos enzimas de restricción? pues obtenemos fragmentos de una longitud bien definida. Estos fragmentos pueden separarse en geles de agarosa y transferirse a membranas de nitrocelulosa o nylon porque éstas se dejan manipular mucho mejor. Para la identificación de fragmentos específicos se procede a la hibridización con fragmentos conocidos anteriormente. En el ejemplo de los cloroplastos existen bancos de clones completos de algunas especies.

De esta forma podemos comparar los fragmentos obtenidos a partir de las muestras, en las que generalmente encontraremos algunas diferencias debidas a mutaciones. Además estas diferencias van a ser más frecuentes en muestras más separadas sistemáticamente. En plantas muy alejadas (a nivel de orden) el método deja de ser válido, puesto que los fragmentos ya no se pueden comparar.

En los últimos años el uso de la técnica de PCR se ha extendido bastante. Pero tenemos que tener claro que no se trata de una técnica útil para fines taxonómicos por sí misma, sino que es simplemente un método para la amplificación específica de fragmentos de ADN, pudiendo partir de cantidades mínimas (de una copia en casos extremos). Estos fragmentos se pueden someter después a procedimientos con fines taxonómicos comparativos como secuenciación o mapeo con enzimas de restricción. Para PCR se necesita un par de cebadores (primers en inglés) de secuencias cortas de ADN (de unas 20 bases). Estos cebadores se unen a secuencias complementarias que encuentran en muestras de ADN y sirven para que los enzimas polimerasas, en la mezcla del ensayo, puedan empezar a sintetizar nuevas cadenas de ADN. Los cebadores tienen que reconocer secuencias en las cadenas opuestas de ADN a una distancia no demasiado lejos (ca. de 10.000 bases como mucho) e inducir la síntesis de ADN en dirección al otro cebador.

Lo que se hace es repetir esta reacción unas 35 ó 40 veces. Como en cada ciclo el número de fragmentos se duplica, se obtienen finalmente unos 2^{35} ó 2^{40} , o dicho de otro modo, 30.000.000.000-1.000.000.000.000. El problema que tiene esta técnica es que se necesita alguna información de antemano sobre las secuencias en cuestión. Pero muchas veces es fácil encontrar estas informaciones vía internet en los bancos de datos existentes. Una ventaja enorme es que este método permite la amplificación de ADN a partir de material de herbario después de muchos años de almacenamiento. Savolainen et al. (1995) fueron capaces de secuenciar genes obtenidos de muestras que habían estado más de 100 años en el herbario. Uno de los usos más frecuentes que se hace con los fragmentos amplificados es su secuenciación. Un factor importante es, lógicamente, la selección del fragmento a secuenciar, porque hay genes que tienen una evolución muy rápida (sobre todo fragmentos que no codifican ningún gen) y otros muy conservadores (el caso extremo es el de los genes para los ARNt, que nos dejan ver hasta los principios de la vida en la tierra). Secuencias muy empleadas a nivel de especie o de género son las ITS (Internal Transcribed Spacers), es decir los espaciadores que separan el gen del ARNr 5.8s de los genes del ARNr 26s y 18s (Baldwin et al. 1995). Son lo suficientemente variables y tienen la gran ventaja de que los genes para ARNr son muy conservadores, lo cual facilita enormemente el diseño de los cebadores, porque muchas veces es posible utilizar los publicados para otros grupos sistemáticos. Para estudios a nivel de familia u orden el gen más empleado es el de la subunidad pesada de RubP-carboxilasa, es decir el enzima responsable de la fijación del CO₂ en la fotosíntesis. Ultimamente han sido publicados algunos trabajos muy interesantes para los briólogos, basados en las secuencias para el ARNr 18s. Uno de ellos es el de Capesius (1995), según el cual las Jungermanniidas y los Antocerotas están más cerca de los musgos que de las Marchántidas. Los Esfágnidos y los Politricales se encuentran relativamente aislados de los demás musgos. Otro aspecto a tener en cuenta es que la secuenciación permite las estimaciones más fiables del tiempo de divergencia de táxones, puesto que se supone que un gen dado se caracteriza por un número característico de cambios de bases cada millón de años.

Un derivado de la PCR es la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente) (Williams et al. 1993; Martire Bowditch et al. 1993). En este caso se utilizan cebadores más cortos, de 9 a 10 bases de longitud, que se pueden obtener de diversas casas comerciales en kits de 20 unidades, de una secuencia plenamente aleatoria. Por ser cortos, estos cebadores reconocen muchas secuencias dentro del genoma y en algunos casos estas secuencias reconocidas se encontrarán en las cadenas opuestas a una distancia relativamente corta, permitiendo así la amplificación de un fragmento. Estos tienen una variabilidad que los hace óptimos para resolver problemas en táxones estrechamente emparentados (especies y subespecies). Esta técnica presenta una doble ventaja, por un lado es relativamente sencilla y por otro necesita un equipamiento de laboratorio modesto. En briófitos fue empleada por Ashton

et al. (1994) y Boisselier-Dubayle et al. (1995) y se pudo comprobar su utilidad a nivel de especies y subespecies.

Referencias

- Ashton NW, Antonyshin NA, Baker KE & Chapco W. 1994. *J. Hattori Bot. Lab.* 76: 41-57.,
Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell ChS & Donoghue MJ. 1995. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 247-277.
Boisselier-Dubayle MC, Jubier MF, Lejeune B & Bischler H. 1995. *Taxon* 44: 363-375.
Capesius I. 1995. *J. Plant Physiol.* 146: 59-63.
Krzakowa M & Sweykowski J. 1977a. *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Sci. Biol.* 25(3): 203-204.
Krzakowa M & Sweykowski J. 1977b. *Bull. Soc. Amis Sci. Lett. de Poznan, Sér. D* 17: 33-36.
Martire Bowditch B, Albright DG, Williams K & Braun MJ. 1993. *Methods in Enzymology* 224. 294-309.
Olmstead RG & Palmer JD. 1994. *Amer. J. Bot.* 81: 1205-1224
Savolainen V, Cuénoud P, Spichiger R, Martinez MDP, Crèvecoeur M & Manen J F. 1995. *Pl. Syst. Evol.* 197: 87-98.
Stein B. 1993. *Methods in Enzymology* 224: 153-167.
Stoneburner A, Wyatt R & Odrzykoski IJ. 1991. *Advances in Bryology* 4: 1-27.
Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA & Tingey SV. 1993. *Methods in Enzymology* 218: 704-740.

Bol. Soc. Esp. Briol. 9: 4 - 7 (1996)

EXTENSIÓN DEL ÁREAL CONOCIDO DE *ORTHOTRICHUM TORTIDONTIUM* Y SU ADAPTACIÓN AL AMBIENTE MEDITERRÁNEO.

F. Lara, R. Garilleti y V. Mazimpaka

Departamento de Biología (Botánica), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, C. U. Cantoblanco, 28049 Madrid.

Orthotrichum tortidontium Lara, Garilleti & Mazimpaka es una especie de muy reciente descripción (Lara et al. 1996), que apareció en unos cuantos bosques montanos de Marruecos y del extremo sur de España. Epífito sobre diversas coníferas y quercíneas,