

# Biología molecular aplicada a la hortofruticultura

## LA TECNICA PCR

Por: J.L. Cenis, E. Sánchez-Escribano,  
J. García, J.J. Pérez y P. Guirao\*

### INTRODUCCION

La investigación biológica de la última década ha estado marcada, sin ninguna duda, por el desarrollo de la tecnología de ácidos nucleicos. Esta tecnología engloba un conjunto de técnicas que permiten manipular físicamente las moléculas de ADN y ARN portadoras de la información genética. Ello permite aislar, caracterizar, alterar y volver a introducir en un organismo las moléculas que codifican todo el funcionamiento del mismo y sus descendientes. Las posibilidades abiertas han sido tantas y el impacto tan grande que ha cambiado la forma de entender y estudiar a los seres vivos. Al mismo tiempo, los conceptos englobados bajo la denominación de Ingeniería Genética o Biotecnología han pasado al dominio de la cultura popular.

La investigación agraria no ha quedado al margen de esta revolución. En la actualidad ya se dispone de plantas transgénicas, en las que se han incorporado artificialmente genes que codifican caracteres deseables. Asimismo, se ha avanzado enormemente en la comprensión a nivel molecular de todo tipo de procesos biológicos implicados en el desarrollo, fisiología y patología de las plantas.

En el C.I.D.A. de Murcia, se inició en el año 1992, una línea de investigación dedicada a desarrollar aplicaciones de las técnicas biotecnológicas, a la investigación en hortofruticultura realizada en el Centro. A pesar de la imagen de estas técnicas como caras y complicadas, hay un conjunto de las mismas que se han simplificado de forma radical. El objetivo de la nueva línea de investigación no es el de realizar un trabajo de biología molecular de alto nivel, si-

no más bien aplicar técnicas de bajo coste que, en conjunción con los métodos de investigación habituales, producen un avance muy significativo de los conocimientos. Una técnica fundamental en este aspecto es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

### LA TÉCNICA PCR

La PCR consiste básicamente en reproducir *in vitro* un proceso fundamental en todas las células como es la duplicación del material genético. Esta duplicación se realiza mediante la acción de una enzima, la ADN polimerasa, cuya acción consiste en sintetizar una cadena sencilla de ADN complementaria a otra cadena sencilla que sirve como plantilla, reconstituyendo así la doble cadena de ADN que contiene la información genética de la célula. Este proceso, tal como ocurre en el núcleo de la célula es muy complejo y requiere la intervención de una serie de enzimas complementarias. Sin embargo, en la

PCR el proceso se ha simplificado hasta sus elementos más esenciales. Los elementos necesarios para que se verifique la reacción PCR son la enzima ADN-polimerasa, los cuatro nucleótidos (adenina, guanina, timina y citosina) que son los componentes que constituyen el ácido nucleico, una cantidad mínima del ADN del organismo con el que estamos trabajando y una solución tampón. Un último componente esencial son los cebadores, que son dos fragmentos muy cortos de ADN sintético de cadena sencilla que diseñamos previamente en función de la aplicación que queramos realizar. La función de los cebadores es la de unirse a zonas complementarias de la cadena ADN inicial, proporcionando un punto de anclaje para que la enzima comience a sintetizar una nueva cadena. La PCR tiene dos características que son la clave de su utilidad. a) La PCR es selectiva: El fragmento de ADN que se amplifica es únicamente el de la región comprendida entre los dos cebadores que se suministran a la reacción. b) La PCR es exponencial: La amplificación del ADN se realiza en un ciclo de tres etapas de temperatura. Un ciclo completo se realiza en minutos y puede repetirse tantas veces como se quiera. Cada nueva replicación se realiza sobre el ADN sintetizado en la replicación anterior, por lo que en cada ciclo de replicación obtenemos doble cantidad de ADN del que teníamos. Ello implica que partiendo de una única cadena de ADN podemos obtener más de un millón de ellas al cabo de 30 ciclos de replicación. La diferencia es que una cadena es totalmente invisible mientras que un millón es una cantidad que se puede visualizar fácilmente en un gel mediante una tinción específica.

La técnica PCR tiene un coste relativamente bajo y es de realización sencilla. Sin embargo tiene un rango de aplicaciones

- Técnica sencilla y económica
- Identificación de variedades
- Detección de virus
- Mejora genética

(\*C.I.D.A. Murcia. Dept. Protección de los Cultivos

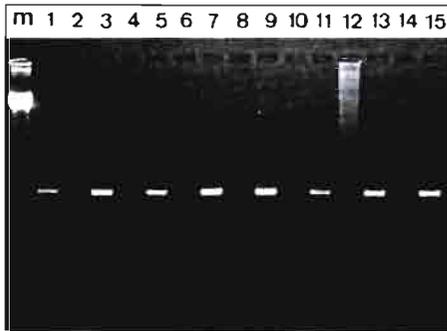


Fig. 1. Reacción PCR con cebadores específicos para la detección del virus de la "hoja en cuchara" del tomate (TYLCV). Carril m: Marcador de peso molecular. Carriles 1,3,5,7,9,11,13,15: Plantas de tomate con síntomas del virus. Carriles 2,4,6,8,10,12,14: Plantas de tomate sin síntomas. La banda observada, de 670 pares de bases, es un fragmento de ADN.

enorme en numerosos campos de la investigación agraria. De estas aplicaciones, podemos mencionar algunas.

#### - Identificación y diagnóstico de microorganismos patógenos y plagas.

La utilidad de la PCR en la identificación de virus, bacterias y hongos presentes en el tejido de una planta infectada nace de su especificidad. Si se realiza una PCR del tejido infectado añadiendo como cebadores dos cortas secuencias de ADN complementarias con el ADN del microorganismo, se amplificará exclusivamente un fragmento de ADN del microorganismo y su presencia se revelará mediante una banda de un tamaño definido. Ello exige, lógicamente, un conocimiento previo de la secuencia nucleotídica de una región del genoma del microorganismo a fin de dise-

ñar los cebadores complementarios a la misma.

Esta aplicación se realiza en el C.I.D.A. con el objeto de detectar la presencia del virus de la "hoja en cuchara" del tomate (TYLCV), tanto en hojas de plantas infectadas como en individuos del insecto vector *Bemisia tabaci*. Resulta muy interesante por cuanto no se dispone de métodos serológicos satisfactorios para detectar el virus. A partir de su detección, se pueden aplicar medidas de control del mismo, así como perfeccionar su seguimiento epidemiológico. El resultado de un experimento de detección del virus en plantas puede apreciarse en la (Figura 1). Para hacerse idea del poder resolutivo de esta detección basta saber que, en ciertas condiciones, el virus puede llegar a detectarse en un extracto de insecto virulífero diluido en la proporción de uno a mil millones.

#### - Identificación de variedades de plantas

Cambiando las condiciones de trabajo de la PCR podemos obtener una modalidad diferente de PCR, denominada RAPD, que permite una clase de aplicaciones diferentes. Utilizando un tipo especial de cebador, muy corto y de secuencia nucleotídica arbitraria y cambiando una de las temperaturas de la reacción, podemos lograr que el cebador se una a zonas de ADN de secuencia complementaria y distribuidas al azar por todo el genoma del organismo estudiado. De esta forma se amplifican numerosos fragmentos de ADN de secuencia y localización desconocida pero diferentes de una especie a otra. Separando los fragmentos por su tamaño en un gel se obtiene una pauta de bandas como la observada en la (Figura 2). La comparación de dicha pauta permite establecer diferencias al nivel tacaonómico de especie e

incluso subespecie, biotipos o razas, de toda clase de organismos. Las aplicaciones de la RAPD son muy numerosas para los temas relacionados con la identificación de variedades de plantas, biotipos de insectos, cepas y razas de hongos y bacterias, etc. También es posible detectar con gran precisión la variabilidad del germoplasma de cualquier especie, tanto en colección como en estado salvaje, con las implicaciones beneficiosas que ello tiene en mejora genética.

Una aplicación concreta que se está llevando a cabo en el C.I.D.A. es la identificación genética de variedades de uva de mesa. Mediante la reacción RAPD sobre el ADN de vid extraído de hojas jóvenes, se puede llegar a obtener una pauta de bandas de ADN específica para cada variedad (Figura 2). Ello es útil para complementar el proceso de registro y certificación de variedades, basado en la ampelografía y muy lento en la actualidad. Al mismo tiempo, la rapidez y precisión del método permite un mejor control de calidad y una mejor detección de fraudes en la comercialización de material de propagación.

#### - Marcado y localización de genes de interés en planes de mejora genética.

La técnica RAPD tiene, además de la anterior, una aplicación muy útil en mejora genética. Las bandas de ADN amplificado se heredan de forma mendeliana. Mediante análisis de recombinación, las distintas bandas pueden localizarse en un mapa genético y, sobre todo, puede determinarse su grado de ligamiento con caracteres de interés en mejora genética. Pueden utilizarse por tanto como marcadores moleculares. Mediante una estrategia denominada "análisis de bloques segregantes", es posible encontrar una banda de ADN obtenida en una reacción RAPD que esté

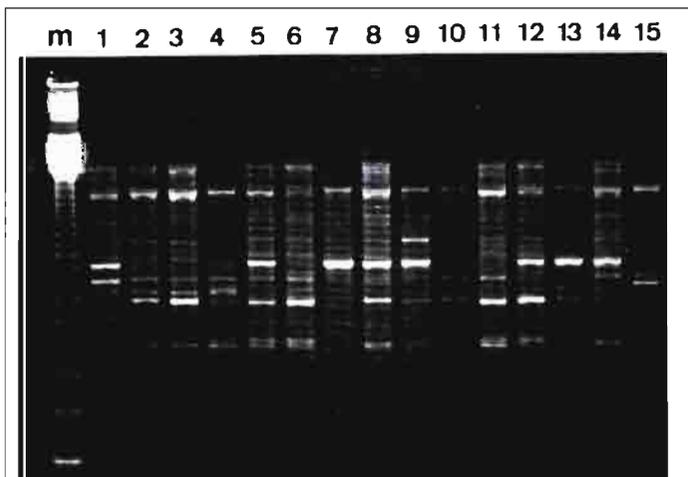


Fig. 2. Aspecto de las bandas de ADN amplificadas en una reacción RAPD y separadas por tamaño en un gel de agarosa. Los carriles corresponden a diversas variedades de uva de mesa. Carril m: Marcador de peso molecular.

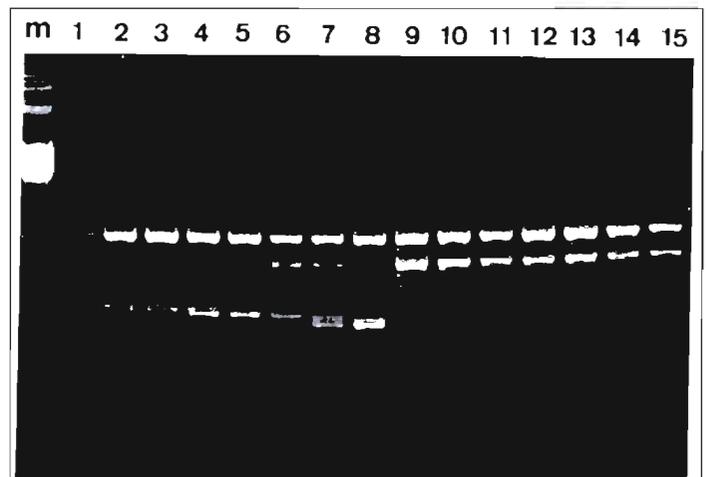


Fig. 3. Bandas de ADN amplificado en una reacción RAPD de un conjunto de variedades de uva de mesa. Carril m: Marcador de peso molecular. Carriles 1 a 8: variedades sin semilla. Carriles 9 a 15: Variedades con semilla. Se observa que estas variedades presentan un banda adicional.

ligada a un gen determinado. Para ello, basta con agrupar los individuos segregantes de una F2 en dos bloques: uno constituido por los individuos que manifiestan el carácter que estamos seleccionando y otro con aquellos individuos que no lo manifiestan. A continuación se mezcla el ADN de los individuos de cada bloque y se realizan reacciones RAPD. Al mezclar el ADN de los individuos, todas las diferencias genéticas entre ellos se homogenizan, excepto la diferencia debida a la presencia o ausencia del gen que se quiere seleccionar. Por tanto, aunque la mayoría de las reacciones RAPD con distintos cebadores darán pautas de bandas idénticas, habrá algunas bandas ligadas al gen que aparecerán en uno de los bloques y no en el otro. Esta banda, una vez verificado su ligamiento mediante un análisis de la F3, será un marcador genético del gen en cuestión. La utilidad de este marcador es evidente. La presencia del marcador en una planta es prácticamente equivalente a la presencia del gen, con la diferencia de que la banda RAPD es muy fácil de detec-

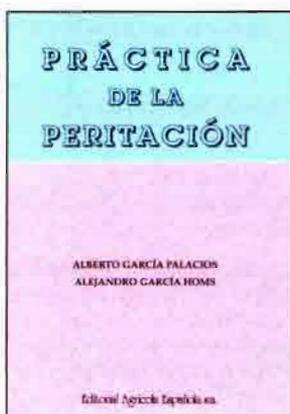
tar incluso en un fragmento de semilla. Pensemos por ejemplo en la mejora para resistencia a una enfermedad o para un carácter del fruto en una planta leñosa. Si encontramos un marcador RAPD para el gen implicado, no sería necesario recurrir a inoculaciones o esperar la fructificación de la planta para evaluar el resultado de los cruzamientos sino tan sólo hacer una reacción RAPD de la plántula.

En el C.I.D.A se están realizando diversos experimentos en esta línea. Se está buscando un marcador para la resistencia de pimiento al virus del "bronceado" (TSWV). Para ello, se está analizando la descendencia de los cruzamientos del germoplasma resistente y sensible dentro del proceso de mejora clásica que se lleva a cabo en el Centro. También se está buscando un marcador para el carácter de ausencia de semilla en uva de mesa. En la (Figura 3) se observa un grupo de variedades de uva de mesa en las que las variedades con semilla presentan una banda ausente en las variedades sin semilla.

Las aplicaciones y las líneas de investi-

gación descritas son sólo una mínima muestra de lo que se está haciendo con una técnica sencilla como la PCR. Para valorar mejor su interés hay que considerar que el coste de montaje de un laboratorio para hacer PCR no sobrepasa los tres millones de pesetas y que una persona no experta puede aprender la técnica en dos semanas. La experiencia obtenida en el C.I.D.A. demuestra que algunas técnicas de biología molecular, en especial la PCR, ofrecen una herramienta muy poderosa y eficiente en el marco de una investigación hortofrutícola tradicional. Los marcadores moleculares, tanto en selección como en identificación no sustituyen sino que refuerzan y simplifican el proceso clásico de obtención de variedades. Y las posibilidades de detección de patógenos, con una precisión sin comparación con técnicas anteriores, permiten perfeccionar el control de la sanidad del material vegetal. Es evidente por tanto el interés de profundizar en esta línea de trabajo.

## NOVEDAD EDITORIAL



### "PRÁCTICA DE LA PERITACIÓN"

García Palacios A. y García Homs A.

264 pp. 1996 - 3.800 PTA

PRÓLOGO de Puignaire Hernández J.M.

Secretario de Gobierno del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña.

Colaboración de Díaz Valcárcel L.M. Magistrado del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña y otros peritos judiciales.

**Contenido.** Prólogo. Introducción. La Prueba de Peritos vista por el Juez. Dictámenes Periciales: La Valoración a lo largo del tiempo. Deslinde. Daños causados a una finca ribereña por obras hidráulicas. Expropiación Forzosa de una Finca Agrícola. Expropiación en el caso de paso de Líneas Eléctricas. Retasación en caso de Expropiación Forzosa. Responsabilidad Patrimonial de la Administración. Seguro. Impuestos Municipales. La Valoración a efectos fiscales.

Legislación, Comentarios y Sentencias referentes a cada Dictamen. Bibliografía. Índice de Materias.

**Obra dirigida a los Abogados y Peritos Judiciales, Ingenieros, Arquitectos, Agentes de la Propiedad Inmobiliaria y estudiantes de las Facultades de Derecho y Escuelas Técnicas.**

**Comentario.** Como se dice en su Prólogo, "PRÁCTICA DE LA PERITACIÓN" constituye, en su aspecto jurídico, una aportación novedosa al campo del Derecho, al tratar la Prueba de Peritos desde la óptica de estos últimos.

Sin ser un libro de Valoración, stricto sensu, está inmerso en el campo de la Estimación del Valor, utilizando métodos, alguno de ellos originales, pero siempre acordes con la **Jurisprudencia del Tribunal Supremo**. En este sentido llena un vacío de la literatura referente a la Praxis de la Peritación y, por consiguiente, de la **Prueba de Peritos**.

El libro está estructurado de manera razonable. El propio Prólogo es de por sí un corto ensayo jurídico de profundidad sobre la prueba pericial. Continúa, en el capítulo redactado por un Magistrado del Tribunal Superior de Justicia de Cataluña, con una pragmática exposición de cómo el Juez aprecia la Prueba de Peritos, y como ésta debe adecuarse al papel que tiene asignado en el pleito.

En los capítulos posteriores, en los cuales el **Dictamen del Perito** es el eje expositivo, se hace referencia al marco legal en el que se desarrolla el Pleito (**Leyes Civiles, Penales, Administrativas, Mercantiles y Fiscales**) para seguir con el Dictamen del Perito propiamente dicho. Con posterioridad se comentan los métodos empleados, justificándolos y contrastándolos con Sentencias del Tribunal Supremo, las fuentes utilizadas y se realiza una **sana crítica** de los Dictámenes de los Peritos de Parte, de los de la Administración y de los Vocales de los Jurados de Expropiación. Finalizan los capítulos, en general, con una transcripción de las Sentencias en que Jueces y Magistrados aprecian en qué medida el Dictamen del Perito ha sido útil para el fin que fue solicitado.

Nos encontramos ante un libro que sigue la tradición italiana de tratadistas eminentes como **Medici y Famulario** y la americana de **Mc. Michael y del Appraisal Institute**, cuya originalidad en lengua castellana radica en la inexistencia de tratados de este género.

Si se nos permite una reflexión sobre los destinatarios de **Práctica de la Peritación** mencionaríamos, en primer lugar, a los Abogados. La proposición de la prueba es ciertamente un arte, del que no es pequeña parte conocer las posibilidades de los Peritos para elaborar y emitir su Dictamen. Por parte de los Peritos Judiciales, Ingenieros, Arquitectos, Agentes de la Propiedad Inmobiliaria, el uso de las fuentes y la utilización de métodos de valoración contrastados con las Sentencias del Tribunal Supremo y el conocimiento de las disposiciones legales en cuyo ámbito se mueve el Dictamen que se solicita, resulta de vital importancia para que el mismo sirva para el fin último a que va destinado dentro del período de Prueba.

La obra es, finalmente, multidisciplinar y ello le da un sentido didáctico que esperamos le impulse al fin último a que va destinada que no es otro que el hacer más eficaz la Prueba de Peritos y más científica y pragmática, a la vez, la **Práctica de la Peritación**.

# Agricultura

EDITORIAL AGRÍCOLA ESPAÑOLA, S.A.

Caballero de Gracia, 24, 3º izqda. - Teléfono: 521 16 33 - FAX: 522 48 72. Madrid-28013