

## AMPLIFICACION DE GENES POR PCR Y SU APLICACION AL ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD

### PCR genes amplification and its utility in biodiversity studies

ROLANDO P. MONTOYA\*, PATRICIA I. GOMEZ\*\*, MARIELA A. GONZALEZ\*\*, MARIO HENRIQUEZ\*\*\* Y ARTURO CANDIA\*\*.

#### RESUMEN

En el presente trabajo se muestra la aplicación de la técnica de amplificación de genes por PCR en organismos procararióticos y eucarióticos. Como ejemplos, se amplifican genes conocidos (específicos), tales como el espaciador ribosomal y el gen *eae* involucrado en la patogenicidad de *Escherichia coli* y otros desconocidos, mediante la técnica de RAPD. Los organismos utilizados en el estudio correspondieron a 5 taxa del reino Monera, 2 taxa del reino Plantae y 1 taxa del reino Animal. En algunos casos, los patrones de amplificación permitieron diferenciar los organismos, a niveles genérico, específico y/o poblacional, demostrando la potencialidad de esta técnica molecular en estudios de biodiversidad orgánica y/o en la resolución de problemas taxonómicos puntuales.

#### ABSTRACT

The use of PCR to amplify known and unknown genes in prokaryotes and eukaryotes to infer relationships among taxa is shown. As examples, particular sequences such as the one in the ribosomal intergenic spacer and the gene *eae* involved in *Escherichia coli* pathogenesis and unknown genes applying the RAPD technique are included. The organisms used comprise 5 taxa of the kingdom Monera, 2 taxa of the kingdom Plantae and one taxa of the kingdom Animalia. In some cases, the amplification patterns allow differentiations at genera, species and/or populations level, demonstrating the potential use of this molecular technique in biodiversity studies and/or in the resolution of particular taxonomical problems.

KEYWORDS: PCR. ITS. RFLP. RAPD and biodiversity.

#### INTRODUCCION

El creciente desarrollo y simplificación experimentado por las técnicas de biología molecular ha facilitado su uso en áreas de las ciencias biológicas diferentes de las tradicionales; en la actualidad, el análisis de la molécula de ADN se considera una herramienta de gran potencialidad y resolución en

taxonomía y filogenia. Los atributos moleculares son una medida directa de cambios en el genotipo, por lo tanto, su utilización evita los problemas asociados a la plasticidad fenotípica que, como se sabe, está influenciada por el ambiente. Desde hace más o menos una década, los sistemáticos han comenzado a incluir data molecular en sus estudios tradicionales. Los resultados obtenidos han contribuido tanto a solucionar problemas sistemáticos irresolutos como a corregir algunos errores generados de la utilización de caracteres taxonómicos clásicos.

Las variaciones presentes en el genoma nuclear y organelar (mitocondrial y cloroplastidial) pueden

\*Depto. Biología Molecular,

\*\*\*Depto. Microbiología, Fac. de Cs. Biológicas;

\*\*Depto. Botánica, Fac. Cs. Nat. y Oceanográficas. Universidad de Concepción.

ser detectadas a través de variadas técnicas moleculares; entre ellas, el establecimiento de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs), la secuenciación, la hibridación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dadas las ventajas de esta última, su uso en estudios de la biodiversidad es cada vez más frecuente (Arnheim *et al.*, 1990; Coleman and Goff, 1991; González *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 1995).

La PCR desarrollada por Mullis y Faloona en 1987, es un método de amplificación enzimática *in vitro* de secuencias nucleotídicas específicas que proporciona grandes cantidades de copias de una secuencia blanco; de esta manera se supera el constante problema de la escasa disponibilidad y pureza del gen que se someterá a análisis (Taylor, 1991). Esta técnica ha sido aplicada a la identificación y caracterización genética de diversos organismos, tanto procarionóticos (Gannon *et al.*, 1993; Nowak *et al.*, 1995; Smith-Vaughan *et al.*, 1995) como eucarióticos (Bhattacharya *et al.*, 1991; Irwin *et al.*, 1991; Bird *et al.*, 1992; Sang *et al.*, 1995). Su utilización ha llegado incluso al análisis de organismos fijados y fosilizados (Pääbo, 1990). La técnica se basa en la unión y extensión de dos oligonucleótidos utilizados como partidores que flanquean la secuencia de ADN a amplificar. Entre los genes que han sido amplificados con fines comparativos se citan los genes de las subunidades mayor y menor de la enzima Rubisco y, cuando existe, el espaciador intergénico que los separa (Destombe and Douglas, 1991; Fujiwara *et al.*, 1994), el gen de citocromo b y la zona D-loop del ADN mitocondrial (Irwin *et al.*, 1991; Meyer, 1994a), los genes y espaciadores ribosomales (Hillis and Dixon, 1991), entre otros. La información obtenida de la amplificación de los genes que codifican para el ARNr ha sido intensamente utilizada en estudios taxonómicos de niveles jerárquicos superiores al específico, mientras que los espaciadores intra e intergénicos se han empleado en comparaciones a niveles inferiores (subespecífico, poblacional e individual) (Schaal and Learn, 1988; Hillis and Dixon, 1991; Meyer, 1994b; Sang *et al.*, 1995). Las secuencias amplificadas son comparadas en cuanto a tamaño y/o secuencia, por digestión con enzimas de restricción (RFLP) (Scholfield *et al.*, 1991; Adachi *et al.*, 1994) o secuenciando directamente el fragmento (Hillis and Dixon, 1991; Goff *et al.*, 1994; Manhart *et al.*, 1995; Sang *et al.*, 1995).

En 1990, Williams *et al.* y Welsh y McClelland reportaron separadamente una modificación de la

técnica de PCR clásica que permite la detección de polimorfismo genético, denominada ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD); en este caso, se utiliza un solo partidor de secuencia arbitraria, con un contenido de GC superior al 50%. Este método ha sido usado en la caracterización de bacterias, hongos, algas, plantas vasculares y animales (Welsh and McClelland, 1990, 1991; Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Mazurier *et al.*, 1992; Waugh and Powell, 1992; Patwary *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1993, González *et al.*, 1996).

El polimorfismo generado con estas técnicas, se manifiesta por la presencia o ausencia de un trozo de ADN producido por PCR y/o su fragmentación con enzimas de restricción que luego se visualiza en un gel de agarosa. En el análisis de la data se debe tener en cuenta: la calidad del ADN, la digestión completa o parcial del ADN, las condiciones de separación electroforética, la intensidad de las bandas y la presencia o ausencia de bandas comigrantes. Para el procesamiento de la data se cuenta con variados métodos disponibles en paquetes computacionales (Romesburg, 1984; Patwary *et al.*, 1993; Olmstead & Palmer, 1994). En nuestro laboratorio hemos utilizado el paquete computacional NTSYS-pe versión 1.60. Para la comparación de diferentes taxa, se prepara una matriz basada en la presencia o ausencia de bandas; a partir de ella se calcula un coeficiente de similitud para cada par de taxa, en este caso "simple matching" ( $C_{jk} = a+d/a+b+c+d$ ;  $0.0 < C_{jk} < 1.0$ ) y se genera una matriz de similitud de la cual se construye un fenograma aplicando el agrupamiento UPGMA (Rohlf, 1988).

El objetivo de este trabajo es entregar información sobre la potencialidad de la técnica de amplificación por PCR de genes específicos (ITS, gen *eae*) y desconocidos (RAPD) para la caracterización genética de individuos, poblaciones, especies y géneros.

## MATERIALES Y METODOS

**MATERIAL BIOLÓGICO:** Talos de *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan & Oliveira provenientes de praderas naturales (2 a 4 morfotipos), fueron recolectados en Caleta Lenga (36°46'S; 73°10'W), Isla Santa María (37°03'S; 73°30'W) y Maullín (41°36'S; 73°38'W). El ADN nuclear de *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory) Dawson, Acleto & Foldvik de California, USA, fue proporcionado por la Dra. Lynda Goff (Universidad de California, Santa Cruz, USA). Cepas bacterianas de

*Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Escherichia coli* enteropatógenas y *Yersinia enterocolitica*, fueron aisladas de deposiciones de humanos de Concepción, VIII Región, excepto una cepa de *E. coli* proveniente de Canadá. Cepas de *Yersinia ruckeri* fueron aisladas desde peces cultivados en la X Región. Ejemplares de *Merluccius gayi* Guichenot (merluza) fueron capturados en el Golfo de Arauco, VIII Región.

**AISLAMIENTO DE ADN:** El ADN nuclear de *G. chilensis* fue obtenido por ultracentrifugación en gradientes de CsCl-Hoechst, siguiendo el protocolo descrito por Rice y Bird en 1990. El ADN genómico de bacterias se obtuvo por ebullición de las bacterias previamente resuspendidas en agua destilada, según la metodología de Mazurier *et al.*, 1992. El ADN genómico de merluza se extrajo por homogenización del tejido en presencia de la resina Chelex 100, proporcionada en el kit de aislamiento de ADN InstaGene matrix (BioRad).

**AMPLIFICACION DE GENES:** Los programas de amplificación fueron realizados en un termociclador Perkin Elmer 480. Los reactivos utilizados en las reacciones de PCR, excepto los partidores, fueron adquiridos en Perkin Elmer. Los partidores fueron sintetizados por el Centro de Síntesis y Análisis de Biomoléculas de la Universidad de Chile.

## 1. Específicos:

a) Espaciador ribosomal eucariote: Las mezclas de amplificación contenían tampón de reacción 1X, 1.5 mM de  $MgSO_4$ , 200  $\mu M$  de cada dNTP, 0.4  $\mu M$  del partidor TW-81, 0.4  $\mu M$  del partidor AB-28 (Tabla I), 1 U de Taq ADN polimerasa y 50 ng de ADN nuclear, en un volumen de 50  $\mu l$ . El programa de PCR tuvo las siguientes etapas: 5 min a 95°C; 5 ciclos de 1 min a 92°C, 2 min a 90°C y 1 min a 72°C; 30 ciclos de 1 min a 90°C, 1 min a 60°C y 1 min a 72°C; 10 min a 72°C. (Coleman, Com. pers.).

b) Espaciador ribosomal procarionte: Las mezclas de amplificación contenían tampón de reacción 1X, 1.5 mM de  $MgSO_4$ , 100  $\mu M$  de cada dNTP, 0.1  $\mu M$  del partidor SP-1, 0.1  $\mu M$  del partidor SP-2 (Tabla I), 1 U de Taq ADN polimerasa y 60 ng de ADN genómico bacteriano, en un volumen de 50  $\mu l$ . El programa de PCR tuvo las siguientes etapas: 7 min a 94°C; 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 46°C y 2 min a 72°C; 6 min a 72°C. (Nowak *et al.*, 1995)

c) Gen *aeae*: Las mezclas de amplificación contenían tampón de reacción 1X, 1.5 mM de  $MgSO_4$ ,

200  $\mu M$  de cada dNTP, 1  $\mu M$  del partidor EC-1, 1  $\mu M$  del partidor EC-2 (Tabla I), 1 U de Taq ADN polimerasa y 20 ng de ADN genómico bacteriano, en un volumen de 50  $\mu l$ . El programa de PCR tuvo las siguientes etapas: 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C; 5 min a 72°C (Gannon *et al.*, 1993).

Digestión del gen *aeae* amplificado: 10  $\mu l$  de ADN amplificado por PCR fueron digeridos independientemente con 10 U de las endonucleasas de restricción Dpn II, Hha I, Hpa II, Msp I, Rsa I y Taq I, cuyas secuencias de reconocimiento son de 4 nucleótidos. Las condiciones de reacción para cada enzima fueron ajustadas a las indicaciones del proveedor (BioLabs).

## 2. Inespecíficos (RAPD)

Con el objeto de establecer las condiciones óptimas de amplificación por RAPD (presencia, nitidez y reproducibilidad de las bandas) se ensayó el efecto de distintas variables como son las concentraciones de  $Mg^{2+}$ , de Taq ADN polimerasa, de partidor, de ADN molde y la temperatura de unión de los partidores. La mezcla de amplificación contenía: tampón de reacción 1X, 1.5 mM de  $MgSO_4$ , 100  $\mu M$  de cada dNTP, 0.2  $\mu M$  de partidor (Tabla I), 1 U de Taq ADN polimerasa y 60 ng de ADN nuclear (*G. chilensis*, *G. lemaneiformis*) o total (bacterias y peces), en un volumen de 25  $\mu l$ . El programa de PCR tuvo las siguientes etapas: 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 42°C y 2 min a 72°C.

**ANALISIS ELECTROFORETICO:** Los fragmentos resultantes de la amplificación por PCR y de la digestión del gen *aeae* fueron separados por electroforesis en geles de agarosa sumergidos en tampón TAE, al 2% y al 4% respectivamente. La separación electroforética se realizó a 60 V durante 60-90 min, los geles fueron teñidos en bromuro de etidio 0.5  $\mu g/ml$  por 30 min, visualizados bajo luz UV y fotografiados con cámara Polaroid y película 667.

## RESULTADOS

### Amplificación y digestión de genes específicos

En la Fig. 1A se muestra el análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del fragmento ITS de 4 morfotipos de *G. chilensis* y de *G. lemaneiformis*. El tamaño del fragmento para los

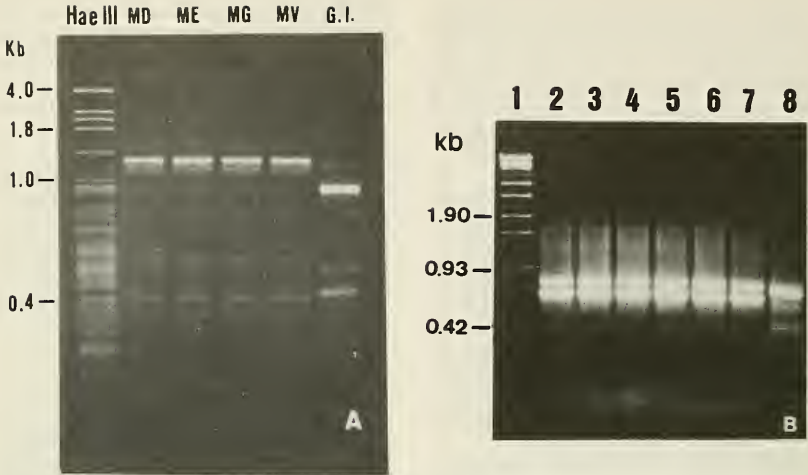


FIGURA 1: Amplificación del espaciador ribosomal de morfotipos MD, ME, MG y MV de *G. chilensis* y *G. lemaneiformis* (A) y de cepas de *Y. ruckeri* (ranuras 2 a 7) y *Y. enterocolitica* (ranura 8) (B). Marcador de pesos moleculares (ranura 1). Electroforesis en geles de agarosa al 2%.

TABLA 1: Secuencia y % de GC de los partidores utilizados en las amplificaciones por PCR de genes específicos e inespecíficos (RAPD).

Partidor	Secuencia	GC (%)
TW-81	5'-GGGATCCITTTCCGTAGGTGAACCTGT-3'	58
AB-28	5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'	50
SP-1	5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'	47
SP-2	5'-CAAGCCATCCACCGT-3'	60
AE-13	5'-GTGGCGAATACTGGCGAGACT-3'	57
AE-14	5'-CCCCATTCTTTTCACCGTCG-3'	52
P-1	5'-ACGTATCTGC-3'	50
P-2	5'-ACAACTGCTC-3'	50
P-3	5'-TGACTGACGC-3'	60
P-4	5'-AGCAGCCTGC-3'	70
P-5	5'-GCATATTCCG-3'	50
P-10	5'-GCGATCCCCA-3'	70
P-17	5'-CCTGGGCCTC-3'	80
P-30	5'-CCGGCCTTAG-3'	70
P-50	5'-TTCCCCGCGC-3'	80
P-61	5'-TTCCCCGACC-3'	70
P-100	5'-ATCGGGTCCG-3'	70
D-1	5'-ACCGCGAAGG-3'	70
D-2	5'-GGACCAACC-3'	70
OPA-2	5'-TGCGGAGCTG-3'	70
OPA-3	5'-AGTCAGCCAC-5'	60
OPA-4	5'-AATCGGGCTG-3'	60
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	70
M-13	5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'	67



morfos de *G. chilensis* fue de 1400 pb y de 950 pb para *G. lemnaeiformis*. Las bandas tenues observadas en todos los casos se deberían a amplificaciones inespecíficas.

En las 6 cepas de *Y. ruckeri* se obtuvo la amplificación de 2 espaciadores ribosomales cuyos tamaños fueron de 700 y 800 pb mientras que en *Y. enterocolitica* se amplificó un solo espaciador de 750 pb (Fig. 1B).

La amplificación del gen *eae* en *E. coli* enteropatógenos generó un producto de 890 pb, cuya digestión con las endonucleasas Dpn II, Rsa I, y Taq I produjo patrones de restricción idénticos para las dos cepas de *E. coli* (Chile y Canadá). Por otro lado, se obtuvo patrones de restricción diferentes para ambas cepas con las endonucleasas Hha I, Hpa II y Msp I (estas dos últimas son isosquisómeros ya que reconocen la misma secuencia de corte) (Fig. 2).

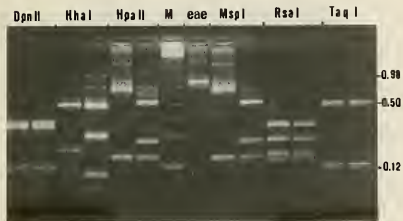


FIGURA 2: Digestión de un fragmento del gen *eae* amplificado previamente por PCR en dos cepas de *E. coli* (una de Chile y otra de Canadá). Las enzimas de restricción usadas son Dpn II, Hha I, Hpa II y su isosquisómero Msp I, Rsa I y Taq I. Marcador de pesos moleculares ranura M y en *eae*, el fragmento no digerido. Electroforesis en gels de agarosa al 4%.

### Amplificación de genes inespecíficos (RAPD)

#### Normalización de las condiciones de amplificación por RAPD:

En la Fig. 3 se observa el efecto de la concentración de  $Mg^{2+}$  (A), enzima Taq ADN polimerasa (B), partidor (C) y ADN molde (D) así como la temperatura de unión del partidor (E) en la amplificación por RAPD. Estos ensayos nos permitieron elegir las condiciones óptimas de amplificación: 1.5 mM de  $Mg^{2+}$ , 0.04 U de Taq ADN polimerasa/ul, 0.2 uM de partidor, más de 2.4 ng/ul de ADN molde y 42°C como temperatura de unión del partidor.

La Fig. 3F muestra los perfiles de amplificación de *G. chilensis* con partidores de diferente secuencia y contenido de GC, en las condiciones óptimas señaladas. Con los partidores P-1, P-5 y P-61 se

obtuvo una amplificación débil o nula, por lo cual estos partidores no son apropiados para caracterizar *G. chilensis*. Por el contrario, con los partidores restantes: P-2, P-3, P-4, P-6, P-17, P-30, P-50 y P-100, se obtienen perfiles de amplificación apropiados en número, longitud y cantidad de fragmentos.

### Aplicaciones de RAPD en organismos eucarióticos y procarióticos:

En la Fig. 4 se muestra la amplificación del ADN total de merluza con diferentes partidores. Con algunos (D-1, D-2, M-13, OPA-3, OPA-4 y OPA-13), se obtuvo patrones de amplificación de intensidad apropiada para estudios comparativos.

En la Fig. 5, se muestran los patrones de amplificación de morfotipos de *G. chilensis* con el partidor P-17. Se observan diferencias respecto al patrón común para uno de los morfos de Maullín (ranura 6) y uno de los morfos de Isla Santa María (ranura 10).

En la Fig. 6A se muestra la amplificación de ADN genómico de *Yersinia* con el partidor M-13. En las 6 cepas de *Y. ruckeri* analizadas se obtuvo un patrón de amplificación idéntico (ranuras 2 a 7) y diferente al presentado por *Y. enterocolitica* (ranura 8). Por otro lado, en la Fig. 6B se observa que el partidor M-13 generó patrones de amplificación diferenciales para las cepas de *S. flexneri* y *S. sonnei* analizadas.

## DISCUSION

Los genes que codifican para el ADN ribosomal, en procariontes y eucariontes, se organizan en una región que se repite en el genoma. Esta región contiene zonas relativamente conservadas, que codifican para los distintos tipos de ARNr y regiones altamente variables, que corresponden a espaciadores intra e intergénicos (Schaal and Learn, 1988; Smith-Vaughan *et al.*, 1995). Las secuencias codificantes, por su carácter conservativo, proporcionan información útil en el establecimiento de relaciones taxonómicas en niveles jerárquicos superiores al específico; las regiones no codificantes en cambio, por ser más variables, permiten su utilización en estudios de variaciones a nivel inferior al específico llegando incluso al individual (Schaal and Learn, 1988; Bhattacharya *et al.*, 1991; Bird *et al.*, 1992; Nowak *et al.*, 1995).

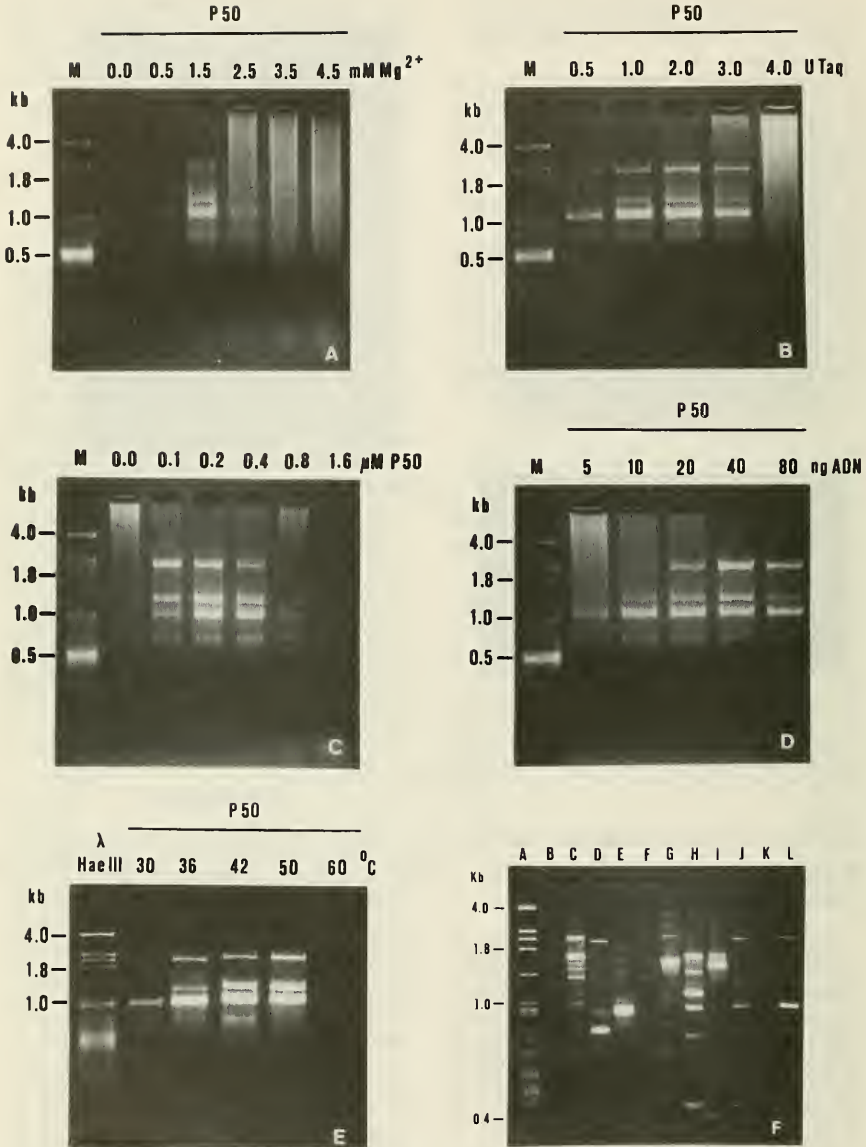


FIGURA 3: Estandarización de la amplificación por PCR-RAPD. Variaciones de la concentración de  $Mg^{2+}$  (A), de la enzima Taq ADN Polimerasa (B), del partidor P-50 (C), del ADN molde (D) y de la temperatura de unión del partidor P-50 (E). En F se observan patrones de amplificación de *G. chilensis* con diferentes partidores: P-1 (B), P-2 (C), P-3 (D), P-4 (E), P-5 (F), P-6 (G), P-17 (H), P-30 (I), P-50 (J), P-61 (K) y P-100 (L). Electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Como se muestra en la Fig. 1A, la amplificación de la región ITS (espaciadores internos transcritos ITS-1 e ITS-2 más gen 5.8S del ARNr) generó un fragmento de 1400 pb para los morfos de *G. chilensis*



FIGURA 4: Amplificación por PCR-RAPD para el ADN de *M. gayi* con partidores de las series P, D, M y OPA. Separación de los fragmentos amplificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

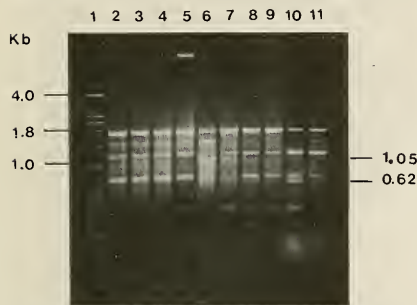


FIGURA 5: Amplificación por PCR-RAPD con el partidor P-17 para el ADN de morfotipos de *G. chilensis* de Lengua (ranuras 2 a 5), Maullín (ranuras 6 a 9) e Isla Santa María (ranuras 10 y 11). Marcador de pesos moleculares (ranura 1). Electroforesis en geles de agarosa 2%.



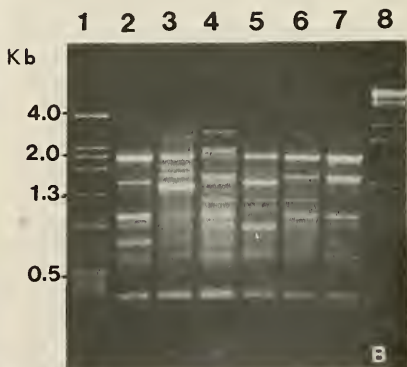
FIGURA 6: Amplificación por PCR-RAPD con el partidor M-13 para el ADN de cepas de *Y. ruckeri* (ranuras 2 a 7) y *Y. enterocolitica* (ranura 8) (A) y cepas de *S. flexneri* (ranuras 2 a 4) y *S. sonnei* (ranuras 5 a 7) (B). Marcador de pesos moleculares en A (ranura 1) y en B (ranuras 1 y 8). Electroforesis en geles de agarosa 2%.

y de un tamaño considerablemente menor (950 pb) para *G. lemaneiformis*; la diferencia en longitud de esta región en ambos géneros es el reflejo de mutaciones ocurridas durante su divergencia taxonómica. Por otro lado, la ausencia de variación en la longitud de la región ITS de los morfos de *G. chilensis* se debería a su estrecha relación taxonómica (intraespecífica).

A la fecha no se han encontrado diferencias en los patrones de restricción de la región ITS en los morfos de *G. chilensis* (manuscrito en preparación), lo que no descarta su existencia, la cual podría ser determinada mediante RFLP con otras enzimas de restricción o bien por secuenciación directa del fragmento.

Al igual que en eucariontes, los espaciadores ribosomales bacterianos constituyen un buen atributo taxonómico. En el caso de las cepas de *Y. ruckeri* se obtuvo 2 espaciadores ribosomales cuyos tamaños fluctuaron entre 700 y 800 pb a diferencia del único fragmento de 750 pb amplificado en cepas de *Y. enterocolitica* (Fig. 1B). En otras especies y cepas bacterianas, el número de espaciadores ribosomales puede ser superior a dos y su tamaño fluctuar entre 400 a 2000 pb. Sin embargo, estos caracteres se mantienen constantes para un taxón determinado (resultados no mostrados).

El gen *eae*, relacionado con la enteropatogenicidad de *E. coli*, tiene una longitud aproximada de 5000 pb y dentro de él se han descrito varias parejas de partidores que permiten amplificar distintas regiones del gen (Gannon *et al.*, 1993); una de éstas es la acotada por los partidores AE-13 y AE-14 utilizados en este trabajo. La amplificación del gen *eae*



en 2 cepas de *E. coli* enteropatógenos, una de ellas aislada en Chile y la otra en Canadá, produjo un fragmento de igual tamaño, pero la digestión del fragmento con algunas endonucleasas de restricción (Hha I, Hpa II y Msp I) permitió revelar diferencias en las secuencias internas de este gen (Fig. 2). Estos resultados indican la existencia, en algunos casos, de variación en la secuencia de regiones codificantes en niveles jerárquicos inferiores al específico.

Comparado con otros métodos de análisis de ADN la detección y uso de marcadores de RAPD es relativamente rápida, sencilla y sensible. Otra gran ventaja de la técnica es que no se requiere información previa de las secuencias que serán amplificadas, ya que los partidores utilizados son diseñados arbitrariamente y un mismo set de ellos puede ser empleado para analizar un amplia variedad de organismos. Estos partidores se distribuyen al azar por todo el genoma, reconocen regiones anónimas del mismo e hibridan con ellas estableciendo así los puntos de inicio de la amplificación. Una desventaja importante del análisis de RAPD es su alta sensibilidad a las condiciones de PCR empleadas. Para asegurar la eficiencia y reproducibilidad de la reacción, resulta imprescindible la optimización previa de las concentraciones individuales de los componentes de la reacción así como de los perfiles de temperatura y tiempo; esto último especialmente en la etapa de unión del partidor, la cual confiere especificidad a la reacción (Adams and Demeke, 1993; Sardelli, 1993; Skibinski, 1994). Es así como las condiciones óptimas de amplificación por RAPD obtenidas en este trabajo (Fig. 3) difieren levemente de las informadas por Williams *et al.*, 1993 y Patwary *et al.*, 1993, tanto en lo relativo a las concentraciones de Mg<sup>2+</sup>, ADN patrón, partidor y Taq ADN polimerasa, como a las temperaturas de unión a los partidores utilizadas. De aquí la importancia que cada laboratorio establezca las condiciones ideales para caracterizar un taxón mediante RAPD.

El análisis de RAPD aplicado a la detección de polimorfismo genético en los morfotipos de *G. chilensis* de Lenga, Isla Santa María y Maullín, no reveló diferencias con más de 20 partidores ensayados. Sin embargo, el partidor P-17 diferenció uno de los morfos de Maullín y otro de Isla Santa María (Fig. 5). Recientemente, ensayos con otros partidores han revelado diferencias en los patrones de amplificación de los morfos de Lenga vs. los de Maullín (manuscrito en preparación); dadas las características de la técnica, se concluye que ensayos de este tipo deben realizarse con un gran número de

partidores para aumentar la probabilidad de encontrar diferencias entre los taxa sometidos a estudio.

En procariontes, el RAPD con el partidor M-13 no diferenció a las cepas de *Y. ruckeri* a pesar de ser aisladas en tiempos y lugares distintos. Se observa sin embargo, un patrón de amplificación claramente diferente del obtenido para otra especie del género *Yersinia* (Fig. 6A). Por otro lado, los ensayos con este mismo partidor señalaron diferencias a nivel intraespecífico en la especie *S. flexneri*, cuyas cepas son serotípicamente distintas (Fig. 6B, ranuras 2 a 4); asimismo, 18 cepas de *S. sonnei* pertenecientes al mismo serotipo e idénticas en cuanto a otros partidores, sólo fueron diferenciadas con M-13, obteniéndose para todas ellas alguno de los tres perfiles de amplificación mostrados en la Fig. 6B (ranuras 5 a 7).

Si bien no existe consenso acerca del nivel taxonómico en el cual el RAPD mostraría su máxima utilidad, la técnica ha demostrado grandes ventajas en estudios de sistemática molecular debido a la versatilidad de su aplicación (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Welsh and McClelland, 1991; Williams *et al.*, 1990). El uso de múltiples partidores es imprescindible para llegar a obtener patrones de amplificación que pueden ser utilizados a niveles genéricos, específicos o intraespecíficos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración del laborante Sr. José L. Vera en el desarrollo de los experimentos de amplificación por PCR. Este trabajo fue financiado a través de los proyectos FONDECYT 193/0428, DIUC 93.35.17-1 y DIUC 95.31.64-1.

## BIBLIOGRAFIA

- Adachi, M., Sako, Y. and Y. Ishida (1994). Restriction fragment length polymorphism of the ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *J. Phycol.* 30:857-863.
- Adams, R.P. and T. Demeke (1993). Systematic relationships in *Juniperus* based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *Taxon* 42:553-571.
- Arnheim, N., White, T. and W.E. Rainey (1990). Application of PCR: organismal and population biology. *BioScience* 40(3): 174-182.
- Bhattacharya, D., Mayes, C. and L.D. Druehl (1991). Restriction endonuclease analysis of ribosomal DNA sequence variation in *Laminaria* (Phaeophyta). *J. Phycol.* 27(5): 624-628.
- Bird, C.J., Rice, E.L., Murphy, C.A. and M.A. Ragan (1992). Phylogenetic relationships in the Gracilariales (Rhodophyta)



- as determined by 18S rDNA sequences. *Phycologia* 31(6): 510-522.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. and P.M. Gresshoff (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technol.* 9: 553-557.
- Coleman, A.W. and L.J. Goff (1991). DNA analysis of eukaryotic algal species. *J. Phycol.* 27(4): 463-473.
- Destombe, C. and S.E. Douglas (1991). Rubisco spacer sequence divergence in rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Curr. Genet.* 19: 395-398.
- Fujiwara, S., Sawada, M., Someya, J., Minaka, N., Kawachi, M. and I. Inouye (1994). Molecular phylogenetic analysis of rbcL in the Prymnesiophyta. *J. Phycol.* 30(5): 863-871.
- Gannon, V.P.J., Rashed, M., King, R.K. and E.J. Golsteyn Thomas (1993). Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31(5): 1268-1274.
- Goff, L.J., Moon, D.A. and A.W. Coleman (1994). Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *J. Phycol.* 30: 521-537.
- González, M., Montoya, R. and A. Candia (1995). Organellar DNA restriction analysis of four morphotypes of *Gracilaria* from Lenga, VIIIth Region, Chile. *Biol. Res.* 28: 177-184.
- González, M., Montoya, R., Candia, A., Gómez, P. and M. Cisternas (1996). Organellar DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) and nuclear random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of morphotypes of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta) from Chile. *Hydrobiologia* 326/327: 229-234.
- Hillis, D.M. and M.T. Dixon (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quart. Rev. Biol.* 66(4): 411-453.
- Irwin, D.M., Koehler, T.D. and A.C. Wilson (1991). Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* 32: 128-144.
- Manhart, J.R., Fryxell, G.A., Villac, M.C. and L.Y. Segura (1995). *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae): nuclear ribosomal DNAs and species differences. *J. Phycol.* 31: 421-427.
- Mazurier, S., Van de Giessen, A., Heuvelman, K. and K. Wernars (1992). RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 260-262.
- Meyer, A. 1994a. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Tree* 9 (8): 278-280.
- Meyer, A. 1994b. DNA technology and phylogeny of fish: 219-249. In Beaumont A. R. ed., *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall. London. 539 págs.
- Mullis, K. and F. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350.
- Nowak, A., Burkiewicz, A. and J. Kur (1995). PCR differentiation of seventeen genospecies of *Acinetobacter*. *FEMS Microbiol. Letters* 126: 181-188.
- Olmstead, R.G. and J.D. Palmer (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Am. J. Bot.* 81(9): 1205-1224.
- Pääbo S. (1990). Amplifying ancient DNA: 159-166. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and T.J. White eds., *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, California. 482 págs.
- Patwary, M. U., MacKay, R. M. and J. P. Van der Meer (1993). Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J. Phycol.* 29: 216-222.
- Rice, E.L. and C.J. Bird (1990). Relationships among geographically populations of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta) and related species. *Phycologia* 29(4): 501-510.
- Rohlf, F.J. (1988). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software. Applied Biostatistics Inc.
- Romesburg, H.C. (1984). Cluster analysis for researchers. Lifetime Learning Publications. 333 págs.
- Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F. and M. Silva (1995). ITS sequences and phylogeny of the genus *Robinsonia* (Asteraceae). *System. Bot.* 20(1): 55-64.
- Sardelli A. D. (1993). Analizando las limitaciones del PCR: El efecto meseta. *Noticiero de Biología* 1: 9-12.
- Schaal, B.A. and G.H. Learn (1988). Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Ann. Missouri Bot. Garden* 75(4): 1207-1216.
- Scholfeld, C., Gacesa, P., Price, J.H., Russell, S.T. and R. Bhoday (1991). Restriction fragment length polymorphisms of enzymically-amplified small-subunit rRNA-coding regions from *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Rhodophyta)-a rapid method for assessing species "limits". *J. Appl. Phycol.* 3:329-334.
- Skibinski D. O. F. (1994). DNA technology and genetics of aquatic invertebrates: 177-199. In Beaumont A. R. ed., *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London 539 págs.
- Smith-Vaughan, H. C., Sriprakash, K. S., Mathews J. D. and D. J. Kemp (1995). Long PCR-ribotyping on nontypeable *Haemophilus influenzae* J. *Clin. Microbiol.* 33(5): 1192-1195.
- Taylor, G.R. (1991). Polymerase chain reaction: basic principles and automatization: 1-14. In McPherson, M.J., Quirke, P. and G.R. Taylor eds., *PCR a practical approach*. IRL Press, Oxford, New York. 253 págs.
- Waugh, R. and W. Powell (1992). Using RAPD markers for crop improvement. *Focus* 10: 186-191.
- Weising, K., Nybon, H., Wolff, K. and W. Meyer (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Florida, USA. 322 págs.
- Welsh, J. and M. McClelland (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18(24): 7213-7218.
- Welsh, J. and M. McClelland (1991). Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucl. Acids Res.* 19(19): 5275-5279.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18(22): 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and S.V. Tingey (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218: 704-741.