

# Métodos para el Estudio de Flujo Genético en Plantas

---

Nora OLEAS

---

Centro de Investigación de la Biodiversidad  
y Cambio Climático, y Facultad de  
Ingeniería Industrial,  
Universidad Tecnológica Indoamérica  
noraoleas@uti.edu.ec

## RESUMEN

El flujo genético es un proceso que ocurre naturalmente vía dispersión de semillas, movimiento de polen o individuos, y su incorporación al acervo génico en una nueva localidad. El flujo genético depende de factores como la forma de dispersión, tiempo de viabilidad, distancia de dispersión, entre otros. El intercambio genético entre individuos es estudiado mediante la genética de poblaciones. El presente trabajo es una revisión en la que se discuten los factores que influyen en el flujo genético en plantas. Se detallan técnicas moleculares para estimar el flujo genético entre poblaciones, con ejemplos de investigaciones realizadas en Ecuador. Finalmente, se explican algunas aplicaciones para el control biológico mediante el uso de varias herramientas moleculares para identificar el flujo genético de organismos transgénicos.

## PALABRAS CLAVE

Biocontrol, flujo genético, microsatélites, organismos genéticamente modificados, técnicas moleculares.

## ABSTRACT

Gene flow is a naturally occurring process via seed dispersal, pollen movement or individuals, and their incorporation into the gene pool at a new location. Gene flow depends on factors like dispersion feasibility, dispersal distance, among others. Genetic exchange between individuals is studied with population genetics. The following review explains some of the factors that influence gene flow in plants. Several molecular techniques are described for estimating gene flow between populations, with examples from research conducted in Ecuador. Finally, some applications for biological control using molecular tools to identify gene flow from transgenic organisms, are explained.

## KEYWORDS

Biocontrol, geneflow, microsatellites, genetically modified organisms, molecular techniques.



El 6 y 7 de mayo de 2013 se llevó a cabo en Quito el Simposio titulado "Flujo genético en cultivos agrícolas y sus implicaciones para la Bioseguridad". El evento contó con el auspicio del Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente (UNEP, por sus siglas en inglés) y el Fondo para el Medio Ambiente Mundial (GEF, por sus siglas en inglés). Durante ese simposio, la autora presentó una visión introductoria sobre los métodos de estudio de flujo genético en plantas y su relación con el manejo de cultivos transgénicos. El presente trabajo es una extensión de esa exposición, con miras a un mejor entendimiento de los procesos biológicos detrás del flujo genético en plantas y sus posibles implicaciones para la bioseguridad. Más específicamente, se exponen conceptos básicos sobre los procesos implicados en el flujo genético en plantas, los métodos para la medición del flujo genético, algunos ejemplos de estudios de flujo genético en plantas, realizados en el país, y las implicaciones de flujo genético de transgénicos para la bioseguridad. Por último, se expone una perspectiva general sobre el futuro del control de flujo genético en presencia de transgénicos.

## Flujo genético en plantas

El flujo genético es el movimiento de gametos (polen), cigotos (semillas) y plantas desde un lugar a otro y su incorporación al acervo genético en una nueva localidad [1]. Este proceso ocurre naturalmente vía dispersión de semillas, movimiento de polen e individuos, o sus partes. El flujo genético, tanto para el polen como para las semillas, depende de factores como la forma de dispersión, tiempo de viabilidad, distancia de dispersión, entre otros. El flujo genético a través del polen también podría estar limitado debido a factores como la incompatibilidad. En el caso de las semillas, otro factor limitante es la especificidad de sustrato y clima. En el flujo genético, como resultado de la introducción de individuos, dependerá de la capacidad de los mismos para sobrevivir, reproducirse, y para que su prole sobreviva y se reproduzca [1].

El flujo genético en angiospermas está estrechamente ligado a los diferentes tipos de flores, frutos y semillas. Existe un sinnúmero de formas y colores en flores para atraer polinizadores y transferir el polen a otras flores. Así mismo los frutos y se-

millas tienen adaptaciones para dispersión por animales, viento, agua, entre otros [2]. Todos estos mecanismos son importantes para entender la dispersión en angiospermas y por ende el flujo genético. El fruto de las angiospermas es una fuente de información del origen materno, ya que el pericarpio se desarrolla a partir de estructuras florales maternales. Las semillas dentro del fruto, en cambio, cuentan con información biparental. Por lo general el ADN nuclear es heredado en forma biparental, en cambio el ADN de las organelas (mitocondria y cloroplasto) por lo general es heredado de forma uniparental [3].

El intercambio genético entre individuos es estudiado mediante la genética de poblaciones. Cuando una población está en equilibrio, las frecuencias de los alelos y las frecuencias genotípicas tienden a permanecer sin cambios por generaciones — lo que es conocido como equilibrio Hardy-Weinberg [4]. Los cambios de las frecuencias de alelos y/o genotipos a través del tiempo son el resultado de migración, flujo genético, mutación, deriva génica, endogamia (combinación no aleatoria de alelos) y selección natural [1].

La migración evita la divergencia genética entre poblaciones. El índice de fijación  $F_{ST}$  ha sido utilizado tradicionalmente como una medida de diferenciación genética [5]. Además este índice ha sido empleado como un método indirecto para estimar flujo genético [6]. En este sentido cuando  $F_{ST}$  es igual a 1, significa que no hay migración. El valor de  $F_{ST} = 0,50$  representa a un migrante por cada cuatro generaciones. Si  $F_{ST} = 0,33$  existe un migrante por cada segunda generación [6]. Recientemente se publicó un estudio que exploró las limitaciones de  $F_{ST}$  y otros índices derivados del mismo principio, porque en presencia de múltiples alelos raros, el valor de  $F_{ST}$  no refleja diferenciación genética [7]. En la actualidad la mayoría de los estudios reportan  $D$  [7] en lugar o además de  $F_{ST}$ . Al igual que  $F_{ST}$ , el valor de  $D$  asume que mientras más cercano a 1, menor es el grado de migración entre las poblaciones.

## Métodos moleculares para estimar flujo genético

Para estudiar el flujo genético y su origen en plantas, se pueden utilizar diferentes marcadores diseñados para identificar herencia biparental o

uniparental. Existen múltiples tipos de marcadores moleculares que permiten estudiar el flujo genético. Entre los más utilizados están los microsatélites, los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs por sus siglas en inglés) y los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs). Los microsatélites son una de las técnicas más utilizadas para el estudio de la genética de poblaciones y del flujo genético [8, 9]. Estos marcadores moleculares son repeticiones de dos a seis nucleótidos en tándem. La popularidad de esta técnica se debe en gran parte a la alta variabilidad de alelos, que permite incluso identificar individuos. Además, como los microsatélites se amplifican por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se requiere poco ADN, lo cual es también una característica deseable para estudios genéticos. Otros de los factores que han favorecido al uso de los microsatélites, es que son usualmente heredados en forma mendeliana y son codominantes, lo que permite distinguir heterocigotos (lo que no es posible con otras técnicas como los AFLPs). Finalmente, son marcadores neutrales - lo que significa que sus frecuencias no son determinadas por selección natural [10]. Hasta hace poco una de las mayores desventajas de esta técnica, era que los cebadores para extraer microsatélites tenían que ser diseñados específicamente para cada especie, a un costo considerable. Gracias al desarrollo de la nueva generación de técnicas de secuenciación, ahora es posible obtener gran cantidad de datos genómicos, a un costo mucho más bajo que en décadas anteriores [11]. Se ha calculado que para estudios de genética de poblaciones, 20 loci de microsatélites polimórficos proveen con la variabilidad necesaria para investigaciones a nivel poblacional [12].

### Ejemplos de estudios de flujo genético en el Ecuador

A nivel poblacional, los estudios con marcadores moleculares pueden dar información sobre los aspectos reproductivos de las especies, la distancia de dispersión de las semillas, e incluso permiten realizar análisis de paternidad e identificar el origen de los individuos. Un ejemplo de este tipo de aplicaciones es el estudio de la palma Ungurahua (*Oenocarpus bataua*), que habita los bosques neotropicales [13]. En la Estación Biológica Bilsa se estudió la estructura genética de esta especie. Se

amplificaron 12 loci de microsatélites de 357 frutos y de 185 individuos adultos de la población. Esta información permitió identificar el origen del 90% de los frutos. Además se estimó que la dispersión de polen se da entre los 300 y 1200 m de la planta adulta. El análisis genético de la población de *Oenocarpus bataua* en el Ecuador proporcionó evidencia de exogamia en esta especie.

Estudios genéticos con marcadores moleculares también pueden revelar flujo genético entre diferentes especies. Por ejemplo, *Phaedranassa viridiflora* y *Phaedranassa dubia* son dos especies de la familia Amaryllidaceae que existen en simpatria en la Reserva Geobotánica Pululahua, en el cráter del mismo nombre (provincia de Pichincha). El color de la flor de *P. viridiflora* es amarillo, mientras que el de *P. dubia* es predominantemente rojo. En el cráter del Pululahua también se encuentran individuos del género con flores anaranjadas [14]. Utilizando 13 loci de microsatélites diseñados para *Phaedranassa* (Amaryllidaceae), se pudo identificar el primer caso de hibridación natural entre estas dos especies [14]. Se colectaron alrededor de 30 individuos por cada especie, y un número similar de individuos con flores anaranjadas. Utilizando análisis bayesiano de agrupamiento, los individuos de *P. dubia* y *P. viridiflora* en su mayoría formaban grupos distintos. Los individuos de flores anaranjadas mostraban en general una mezcla genética entre estos dos grupos [14].

### Flujo genético: implicaciones para la bioseguridad

La tecnología para crear organismos transgénicos o genéticamente modificados (OGM) en plantas no es un método nuevo. Inclusive el volumen de marzo del 2013 de revista Nature, presenta varios artículos alusivos a los 30 años del uso de OGM en plantas. Sin embargo, existe inquietud sobre el impacto que el flujo genético de OGM pueda tener en poblaciones naturales y en el medio ambiente en general. También existe la percepción de riesgo de los alimentos originados de OGM en la salud humana, específicamente la resistencia a antibióticos, alergias, o cáncer. El flujo genético de transgenes es bien documentado. Para citar algunos ejemplos, se ha detectado flujo genético de una variedad resistente a herbicidas en canola, *Brassica* sp., [15], y en una especie resistente a

herbicidas de *Agrostis* (Poaceae) y las variedades silvestres [16]. Un ejemplo clásico de las implicaciones de la presencia de OGM en comida es el caso del maíz de la marca StarLink. El maíz StarLink, producido por la compañía Aventis, es un maíz resistente al glifosato que fue aprobado para consumo animal solamente. Este maíz fue encontrado en tortillas de Taco Bell y los gastos generados por producto retirado del mercado está calculado en \$1000 millones [17].

Existen múltiples métodos para detectar el flujo de genes de organismos genéticamente modificados. No es una sorpresa que la Organización Internacional de Estandarización (ISO) haya creado normativas ISO para identificar OGM [18]. Entre las técnicas de detección están las basadas en la identificación de proteína como por ejemplo los ensayos ELISA para la detección de anticuerpos monoclonales [19]. También se pueden detectar metabolitos mediante espectrometría de masa o a través de la detección de moléculas derivadas. Además, se pueden emplear técnicas basadas en ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), electroforesis en gel, entre otras. La técnica que utiliza PCR requiere, en primer lugar, el aislamiento de ADN de la planta o producto a ser analizado. Para esto existen múltiples técnicas y kits disponibles en el mercado. El principio para identificar plantas o alimentos que provengan de organismos genéticamente modificados es relativamente sencillo. La mayor parte de los organismos genéticamente modificados pueden ser detectados a través de un PCR con un cebador para el promotor 35S y el terminador NOS [20]. Inclusive se encuentran en el mercado kits diseñados para la identificación de OGMs, para propósitos educativos. Por ejemplo, la compañía Bio-rad ([www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com)) comercializa un kit que identifica la presencia del promotor 35S del virus de mosaico y el terminador del gen de la nopalina sintetasa del *Agrobacterium tumefaciens* NOS. Tanto el promotor 35S, como el terminador NOS se encuentran en más del 85% de organismos modificados aprobados. El método se basa en PCR y electroforesis. El kit de detección de OGM permite analizar 8 muestras de alimentos para un total de 32 estudiantes a un precio razonable (\$230 aproximadamente en EEUU).

Si bien es cierto que detectar la mayoría de casos de individuos con transgenes o de productos generados a partir de transgenes es posible, incluso a un costo accesible, la identificación de la presencia de transgenes es todavía un desafío. Por un lado, los transgenes son productos de compañías multinacionales, por lo tanto, por motivos de propiedad intelectual o patentes, las secuencias usualmente pertenecen a las empresas y su contenido molecular no necesariamente es compartido. En este sentido, el consumidor de los productos podría exigir que las compañías provean mecanismos para identificar productos provenientes de transgenes y además que sirvan para identificar flujo genético. El intercambio de información es importante para la detección de OGMs, en este sentido se creó la plataforma GMOMETHODS (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>) en donde se encuentra información útil, como las secuencias de los cebadores para la detección de OGMs específicos [21].

### El futuro del control del flujo genético

Una de las mayores preocupaciones sobre el uso de organismos genéticamente modificados es la presencia de ADN foráneo. Una propuesta es eliminar los transgenes de polen, semillas, frutos y otros órganos. Esto es posible mediante una técnica llamada *gene deleter* [17]. El método del *gene deleter*, o borrador de gen, se basa en un sistema de recombinación de sitio específico de ADN. Este tipo de tecnología se ha utilizado en animales para controlar expresión de genes, desde hace 20 años [17]. Por ejemplo, para eliminar transgenes de frutos y semillas se puede utilizar la tecnología de sitio directo de recombinación. Esta tecnología de recombinación de ADN fue derivada de bacterias y hongos y permite manipular el ADN de un organismo *in vivo* [22]. Este proceso involucra la recombinación entre una secuencia específica (de alrededor de 30 bases de pares) (como el FRT) con una enzima recombinasa que actúa sobre esa secuencia específica [17]. El mecanismo permite insertar, cortar, invertir o translocar ADN [22]. El mecanismo para eliminar un transgen en polen o semillas consistiría en colocar el transgen entre dos secuencias de sitio directo de recombinación, junto con un promotor específico para polen o semillas [17].

Entonces la expresión del mecanismo de sitio directo de recombinación ocurriría solamente en polen y semillas. Entonces, como resultado, todas las demás partes de la planta mantendrán el transgen, excepto el polen o semillas [17]. Esta tecnología permitirá eliminar el problema del flujo genético de OGMs a cultivos no modificados. Finalmente, los intragenics o cisgenes, son OGMs derivados del acervo génico de la misma especie, y representan otro de los desafíos para la identificación de organismos genéticamente modificados [23]. La forma de detectar estos organismos no se logra detectando solamente los elementos insertados, sino que requiere identificar el orden específico del loci insertado y los motivos de ADN específicos al evento de insertar el ADN [23]. Dependiendo del origen del elemento insertado, se puede realizar una serie de evaluaciones para detectar la presencia de una o varias regiones de ADN asociadas a la inserción genética [23].

## Conclusiones

Identificar el flujo genético en cultivos agrícolas actualmente es importante en el por múltiples razones. Por un lado, el uso de organismos genéticamente modificados está prohibido por la Constitución de la República del Ecuador [24]. Por el otro, el Artículo 16 de la Ley de Desarrollo Agrario permite la libre importación y comercialización de transgénicos, los mismos que no requerirán autorización si cumplen con la Ley Orgánica de Aduanas, y la Ley de Sanidad Vegetal y Animal [24]. Esta ambigüedad legal ejemplifica la dualidad de criterios acerca de los transgénicos: por un lado se los prohíbe (por considerarlos peligros) y por otro se los incentiva (por su mayor rendimiento y producción). Además los alimentos procesados que se comercialicen en Ecuador y que contengan más del 0,9% de material transgénico deben ser etiquetados siguiendo el Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 022 (1R) "Rotulado de Productos Alimenticios Procesados, Envasados y Empaquetados" a partir del presente año [25]. En este contexto social complejo, las técnicas discutidas en este ensayo son una herramienta para identificar los productos transgénicos. La decisión de su uso, comercialización y consumo es un debate todavía no resuelto.

## Referencias

- [1] Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787-792.
- [2] Stern, K.R., Bidlack, J.E., Jansky, S.H. 2008. *Introductory Plant Biology*, 11th edition. McGraw-Hill, NY.
- [3] Bendich, A.J. 2013. DNA abandonment and the mechanisms of uniparental inheritance of mitochondria and chloroplasts. *Chromosome Research* 21: 287-296.
- [4] Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- [5] Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.
- [6] Hedrick, P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633-1638.
- [7] Jost, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17:4015-4026.
- [8] Morgante, M. y Olivieri A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3: 175-182.
- [9] Ouborg, N. J., Pertoldi, C., Loeschcke, V., Bijlsma, R.K., Hedrick, P. W. 2010. Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in genetics* 4:177-187.
- [10] Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11:1-16.
- [11] Csencsics, D., Brodbeck, S., Holderegger, R. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered Dwarf Bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity* 101: 789-793.
- [12] Smouse, P.E. 2010. How many SNPs are enough? *Molecular Ecology* 19:1265-1266.



- [13] Ottewell, K., Grey, E., Castillo F., Karubian, J. 2012. The pollen dispersal kernel and mating system of an insect-pollinated tropical palm, *Oenocarpus bataua*. *Heredity* 109:332-339.
- [14] Oleas, N.H., Meerow, A.W., Francisco-Ortega, J. 2013. Molecular markers and conservation of plant species in the Latin-America: the case of *Phaedranassa viridiflora* (Amaryllidaceae). *The Botanical Review*.
- [15] Rieger, M.A., Lamond, M., Preston, C., Powles, S.B., Roush, R.T. 2002. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296:2386-2388.
- [16] Reichman, J.R., Watrud, L.S., Lee, E.H., Burdick, C.A., Bollman, M.A., Storm, M.J., King, G.A., Mallory-Smith, C. 2006. Establishment of transgenic herbicide-resistant creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) in nonagronomic habitats. *Molecular Ecology* 15:4243-4255.
- [17] Li, Y. 2012. Gene detector: a new tool to address gene flow and food safety concerns over transgenic crop plant. *Fronti.Biol.* 7:557-565.
- [18] Zel, J., Cankar, K., Ravnkar, M., Camloh, M., Gruden, K. 2006. Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection. *Accreditation and Quality Assurance* 10: 531-536.
- [19] Micelini, E., Simoni, P., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Roda, A. 2008. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: and update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* doi: 10.1007/s00216-008-2193-7.
- [20] Hardegger, M., Brodmann, P., Hermann, A. 1999. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *European Food Research and Technology* 209:83-87.
- [21] Bonfini, L., Van den Bulcke, M. H., Mazzara, M., Patak, L. 2012. GMOMETHODS: The European Union Database of Reference Methods for GMO Analysis. *Journal of AOAC international* 95: 1713-1719.
- [22] Dymecki, S.M. 1996. Flp recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6191-6196.
- [23] Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Morisset, D., Pecoraro, S., Pla, M., Van den Bulcke, M., Wulff, D. 2012. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials *Biotechnology Advances* 30:1318-1335.
- [24] Loayza Rodriguez, G.R. 2014. Reformas al Art. 16 de la Ley de Desarrollo Agrario para garantizar la soberanía alimentaria. Tesis para la obtención del título de Abogado. Universidad Nacional de Loja, Loja.
- [25] INEN. 2014. Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 022 (1R) "Rotulado de Productos Alimenticios Procesados, Envasados y Empaquetados". Obtenido el 28 de Octubre de 2014, disponible en <http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/08>.

Recibido: 2 junio 2014

Aceptado: 28 octubre 2014