

Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación de especies

Pedro Jordano Barbudo

Estación Biológica de Doñana, CSIC

Pabellón del Perú

Avda. M. Luisa S/N

41013 Sevilla, España

e-mail: jordano@ci.csic.es

http://ebd10.ebd.csic.es

En esta ponencia revisamos los recientes desarrollos de técnicas moleculares aplicados a problemas de ecología y conservación de especies. El desarrollo de la ponencia se dividirá en dos partes, la primera de las cuales resume las técnicas disponibles y sus aplicaciones a problemas biológicos concretos; en la segunda exponemos un caso de estudio aplicado a cuestiones de flujo génico en paisajes fragmentados, a fin de ilustrar el potencial y los problemas de este tipo de estudios.

La aplicación de marcadores genéticos moleculares a problemas de ecología y evolución es lo que se conoce como “Ecología Molecular”. Se trata de un área pluridisciplinar de la Ecología donde el principal objetivo es la aplicación de marcadores de ADN que son estables, discretos y heredables a fin de identificar individuos, poblaciones o especies y estudiar las relaciones que se establecen entre éstos. El aspecto central es por tanto la imbricación de la tecnología molecular con cuestiones biológicas básicas; de esta imbricación han surgido nuevas perspectivas a viejos problemas de ecología y evolución y una mayor robustez científica en estas disciplinas. Más que de una nueva disciplina científica, estamos ante una nueva aproximación a viejos problemas. Hay tres características que definen esta nueva aproximación:

1. Utilización de marcadores moleculares de ADN (proteínas, secuencias de ADN o ARN), basados en genealogías soportadas por herencia y principios genéticos.
2. Aplicación a problemas de ecología y evolución.
3. Utilización de las relaciones genéticas entre individuos, poblaciones o especies para abordar los problemas biológicos a diferentes escalas biológicas jerarquizadas.

Las técnicas disponibles

Alozymas. La técnica molecular más ampliamente usada en las últimas décadas y una de las primeras en aplicarse a problemas de genética de poblaciones. Su éxito reside en parte en la facilidad y bajo costo de su uso. Consiste en la detección de variantes electroforéticas de enzimas.

RFLP: “*Random Fragment Length Polymorphism*”. En este caso las variantes genotípicas se detectan como variaciones en el tamaño de fragmentos de restricción. Se basa en el uso de enzimas de restricción, presentes de forma natural en bacterias como parte de un sistema de protección antiviral, que cortan el ADN en puntos con una secuencia específica de 4, 5 o 6 nucleótidos.

Minisatélites y "DNA fingerprinting". El termino minisatélites designa a loci que presentan un número variable de repeticiones de secuencias en tandem o VNTR (*"variable number of tandem repeats"*). El número de repeticiones en estos loci es muy variable, siendo loci especialmente polimórficos. Esta propiedad los convierte en herramientas especialmente útiles para la identificación de individuos y el análisis de relaciones de parentesco próximo.

PCR: "Polymerase Chain Reaction". Sin duda, la revolución tecnológica mas reciente en la biología molecular fue la introducción de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El poder de esta técnica reside en la capacidad de producir cantidades en la práctica ilimitadas de un fragmento de DNA particular, a partir de hasta una única copia del mismo y en un una única reacción. Mediante la PCR es posible generar moléculas de DNA en cantidades que permitan su caracterización a partir de muy poco material de partida (un pelo, células descamadas de la piel, etc.), lo que permite un muestreo no invasivo o poco destructivo de organismos vivos y el análisis de restos. Sus principales aplicaciones son tres:

Microsatélites. La visualización de los fragmentos amplificados tras electroforesis puede ser en sí misma informativa cuando a partir de distintos genotipos se obtienen patrones de bandas diferentes. Los microsatélites son otro tipo de loci VNTR en los que la secuencia repetida es de sólo 2-4 pares de bases. La amplificación de estos loci mediante PCR con cebadores flanqueantes a la repetición genera fragmentos cuyo tamaño depende del número de repeticiones de esta secuencia, caracterizándose así fácil y sensiblemente los alelos de estos loci en un número considerable de individuos. Tanto la simpleza tecnológica (de la aplicación, no tanto del desarrollo) como la cantidad y calidad de la información que genera (hipervariabilidad, análisis locus a locus) han convertido al análisis de microsatélites en una de las técnicas mas poderosas para la identificación de individuos, los análisis de parentesco y la genética de poblaciones.

RAPD: "Randomly Amplified Polymorphic DNA". En esta aplicación ingeniosa de la PCR, el ADN total de un organismo es cebado con oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria que ceban al azar en numerosos sitios esparcidos por el genoma. De cada reacción se obtiene así un patrón de fragmentos que es específico del genoma analizado y del cebador utilizado. La comparación y análisis de los patrones de bandas entre individuos permite la estimación de variabilidad genética en poblaciones.

Secuenciación de ADN. Las técnicas de secuenciación de ADN han estado disponibles desde 1977. Sin embargo, su aplicación a estudios poblacionales ha estado limitada por la dificultad en la producción de cantidades suficientes del ADN a secuenciar. La introducción de la PCR salvó esta dificultad y actualmente resulta viable la secuenciación de fragmentos de ADN de un número considerable de individuos, muchos más si se dispone de secuenciadores automáticos. Para este objetivo, la PCR simplemente proporciona cantidades suficientes de DNA molde de cada individuo.

Aplicaciones

Las técnicas moleculares permiten, en general, sondear la complejidad y variabilidad del contenido genético de los organismos. Este tipo de información puede servir para múltiples objetivos que cubren un amplio rango desde el individuo a las categorías taxonómicas más amplias. En las porciones inferiores de esta escala, estudiamos relaciones familiares y pedigrí (genealogía); en su extremo superior podemos estudiar las relaciones filogenéticas entre poblaciones, especies, géneros, etc. Las principales aplicaciones son las siguientes:

- Identificación individual, sexo y paternidad
- Parentesco y filogenia intraespecífica
- Especiación, hibridación, introgresión
- Filogenia de especies, macroevolución
- Aplicaciones en biología de la conservación: en dos aspectos fundamentales: i) entender los cambios genéticos que afectan a la supervivencia de especies amenazadas y ii) proporcionar información genética utilizable para la mejor gestión de las especies amenazadas.
 - *Heterocigosidad, endogamia.* La reducción drástica del número de individuos de una población tiene unas consecuencias genéticas, que se suman a las consecuencias demográficas y ecológicas.
 - *Identificación de unidades de conservación.* Al permitir analizar las relaciones filogenéticas entre grupos de individuos, los marcadores moleculares pueden ser clave a la hora de decidir si una población concreta merece protección.
 - *Documentación de fenómenos de hibridación e introgresión.* Una de las amenazas para especies en peligro es la pérdida de identidad genética mediante hibridación extensiva con grupos relacionados.
 - *Aplicación de las legislación medioambiental y utilización forense.* Por último, los análisis moleculares están siendo, y sin duda lo serán cada vez más en el futuro, utilizados como herramientas para la detección de delitos contra el medio ambiente.

Bibliografía

- Avise, J.C. (1989). A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 279-281.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Burke, T. (1992). Spots before the eyes: molecular ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 355-357.
- Carvalho, G.R. (1998). *Advances in molecular ecology*. IOS Press, New York.
- Dohndt, A.A. (1996). Molecular techniques in conservation and evolutionary biology: a quantum leap?. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 147-148.
- O'Brien, S.J. (1994). A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5748-5755.