

Formación de un banco de ADN en la especie *Cucurbita moschata* (Duchesne ex lam.) Duchesne ex Poir y evaluación de ocho marcadores moleculares como código de barras para su autenticación

¹ Dubert Yamil. Cañar Serna*, ² Franco Alirio Vallejo Cabrera, ³ Jaime Eduardo Muñoz Flórez

¹ Estudiante de posgrado. Mejoramiento genético, agronomía y producción de semillas de hortalizas. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. ² Profesor titular. Mejoramiento Genético, Agronomía y Producción de Semillas de Hortalizas. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. ³ Profesor asociado. Diversidad Biológica. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. *Autor para correspondencia: dycanars@unal.edu.co

Palabras clave: *Cucurbita moschata*, marcador genético, mapa genético, ADNcp, ADNnr, secuenciación

En Colombia, *Cucurbita moschata* es la especie domesticada de mayor importancia por su área de siembra, producción, versatilidad y consumo directo (Vallejo y Estrada, 2004). Como método de conservación, los bancos de ADN en plantas son el equivalente a las bibliotecas que contienen colecciones de alicuotas vegetales viables, con el propósito de mantener vivo este material y preservar sus características para el beneficio futuro de la humanidad y el medio ambiente (Painting et al., 1995). Actualmente para la autenticación de las especies conservadas existen limitaciones que no satisfacen las demandas complejas en el área. Los códigos de barras de ADN en plantas son una nueva herramienta biológica para la autenticación e identificación de especies, es una forma precisa, rápida y automatizada que utiliza un fragmento corto del ADN genómico, y ha sido ampliamente utilizado especialmente en la identificación de especies de plantas terrestres (Hebert et al., 2003). El objetivo principal de esta investigación es la formación de un banco de ADN en *C. moschata* y aplicación de un código de barras para su autenticación a través de ocho marcadores moleculares.

Metodología

Procedimientos. (1) Se tomaron 388 introducciones a partir de la colección de *Cucurbita* del programa de Hortalizas de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, para la conformación y establecimiento del banco de ADN. (2) Extracción del ADN a partir del protocolo de extracción (CTAB 1%). (3) Para el análisis de código de barras se seleccionaron veinte muestras del banco de ADN para su secuenciación. La selección se hizo con base en su distribución geográfica. (4) Amplificación por PCR de los ocho marcadores moleculares a evaluar, siete de origen ADNcp (AdhC, G3pdh, rpl32-trnL, ndhF-rpl32, 3'rps16-5'trnK(UUU), trnQ(UUG)-5'rps16, psbA-trnH) y uno ADNnr (ITS4-ITS5A) como candidatos a código de barras de ADN para la autenticación de la especie. (5) Se purificó y secuenció doscientas reacciones de PCR. (6) Uso de programas bioinformáticos para el ensamblaje de secuencias utilizando el software Vector NTI 10.3.0. Alineamiento y verificación de las secuencias con ClustalW versión 1.81 y NCBI. Identificación de bloques no informativos en el alineamiento por Gblock 0.91b8. Composición haplotípica de cada región con DNAsp v5. Construcción del árbol de distancia genética a nivel de especies a partir del programa MEGA Versión 5. El valor de Bootstrap para cada cladio fue de quinientas replicaciones.

Resultados

La cuantificación del ADN mediante el protocolo CTAB 1% permitió extraer ADN de manera adecuada con concentraciones altas entre 60 ng/μl y 80 ng/μl. Además, la cantidad de nitritos, carbohidratos totales y aparición de RNasa fue muy baja en el pellet haciéndolo viable para su conservación. Se obtuvieron alicuotas de manera rápida y menos costosa ya que no se requiere de la utilización de equipos especializados como espectrofotómetros o fluorómetros, pero los reactivos manejados son tóxicos y peligrosos debido a que se tratan con compuestos denominados cancerígenos como CTAB = bromuro de hexadeciltrimetilamonio, β-mercaptoetanol, EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético y fenol cloroformo isoamílico (FCI, 25:24:1) lo que la propone como una metodología fácil y rápida para la obtención de ADN total pero con precauciones en su uso. En el Cuadro 1 se observan los marcadores AdhC, rpl32-trnL y G3pdh que fueron descartados por su baja tasa de éxito en su amplificación.

Cuadro 1. Selección de los marcadores para su secuenciación.

Loci	Ampliaciones exitosas (bandas individuales)	Amplificaciones no específicas (bandas múltiples)	No amplificó	Usado para el estudio
AdhC	0/20=0%	19/20=95%	1/20=5%	No
G3pdh	4/20=20%*	20/20=100%	16/20=80%	No
ITS4-ITS5A	20/20=100%	20/20=100%	0/20=0%	Si
rpl32-trnL	0/20=100%	20/20=100%	20/20=100%	No
nshF-rpl32	20/20=100%	20/20=100%	0/20=0%	Si
3'rps 16-5'trnK(UUU)	20/20=100%	20/20=100%	0/20=0%	Si
trnQ(UUG)- 5'rps16	20/20=100%	20/20=100%	0/20=0%	Si
psbA-trnH	20/20=100%	20/20=100%	0/20=0%	Si

*Muy pocos individuos amplificados

Cuadro 2. Identidad de los cinco marcadores evaluados en la base de datos NCBI.

Loci	Ampliaciones exitosas (bandas individuales)	E-valor	Identidad
ITS4-ITS5	<i>Curubita moschata</i>	0.0	95%
	<i>Curubita pepo</i>	0.0	87%
ndhF-rpl32	<i>Cucumis sativus</i>	0.0	85%
	<i>Cucumis sativus cultivar</i>	4E-118	90%
3'rps16 5'trnK(UUU)	<i>Cucumis sativus</i>	0.0	86%
	<i>Cucumis melo</i>	0.0	90%
trnQ(UUG)-5'rps16	<i>Cucumis melo</i>	3E-125	87%
	<i>Cucumis sativus</i>	2F-140	78%
psbA-trnH	<i>Cionosicyos guabubu</i>	3E-104	94%
	<i>Cucumis melo subsp. melo</i>	6 E-101	93%

El nivel de identidad se hizo a partir de un BLASTn del NCBI. El marcador ITS4-ITS5 mostró discriminación al diferenciarlo con *C. máxima* con una identificación precisa del 87% y 95% a nivel de género y especie respectivamente (Cuadro 2).

En el Cuadro 3 los marcadores ndhF-rpl32, 3'rps16 - 5'trnK(UUU), trnQ(UUG)-5'rps16 y psbA-trnH presentaron baja y media variación, indicando que las secuencias exploradas fueron muy homogéneas en todas las introducciones. El loci ITS4 - ITS5, el único marcador ADNnr explorado, explica con superioridad la gran variabilidad genética existente en la colección que los marcadores ADNcp, confirmando los análisis de Flórez. (2010)

Cuadro 3. Composición haplotípica de cada región. Alta diversidad haplotípica (>0.5) y baja diversidad nucleotídica (< 0.005).

Loci	No. de sitios	No. de sitios polimórficos	Diversidad nucleotídica (Pi)	Diversidad haplotípica (Hd)
ITS4-ITS5	714	19	0.02754±0.00746	0.995±0.018
ndhF-rpl32	20	7	0.01766±0.06438	0.533±0.022
3'rps16-5'rps16	1.070	15	0.02163±0.00598	0.958±0.033
trnQ(UUG)-5'rps16	1.062	7	0.19053±0.08682	0.911±0.077
psbA-trnH	335	8	0.05113±0.03643	0.647±0.120

De acuerdo con la evaluación de los marcadores, el loci que sobresale por la capacidad de discriminar a nivel de especie es ITS4-ITS5. Se construyó un árbol de distancia genética entre *C. moschata*, *C. moschata* sp. y *C. maxima* para observar su nivel de asociación. Se observó una relación íntima entre *C. moschata* y *C. moschata* sp. de origen mejicano con un *bootstrap* de apoyo (BS) para cada cladio individual de cuarenta y nueve y su distancia de 0.01524 entre los individuos. Al confrontar con *C. maxima*, se observa un patrón claro de separación por un valor de 0.09097 entre los dieciocho individuos de *C. moschata* y uno de *C. moschata* sp. (Figura 1).

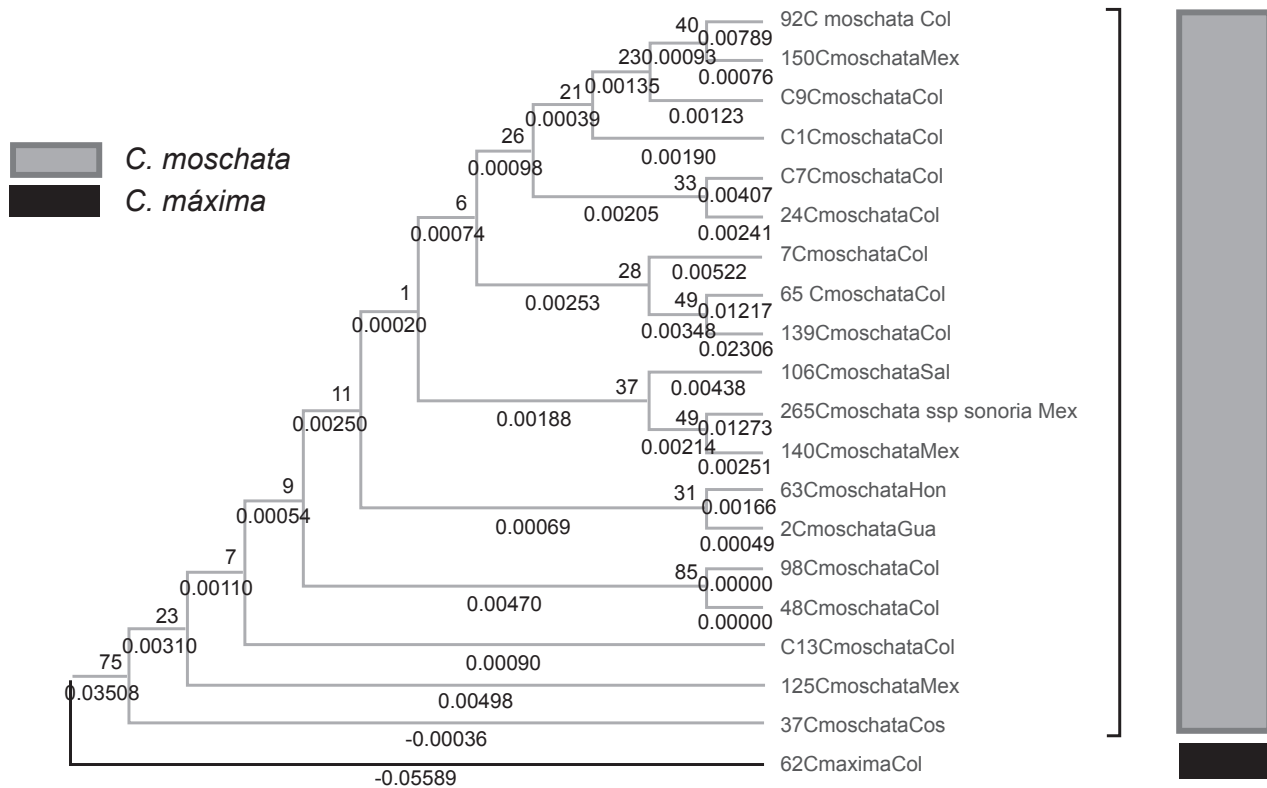


Figura 1 Árbol de distancias, basado en el método de Kimura-2-parametros. Se observa la capacidad del loci ITS4 – ITS5 para discriminar *C. moschata* y *C. maxima*

Conclusión

El marcador ITS4-ITS5 del cistron 18S-5.8S-26S del ADN ribosomal descrito por White et al. (1990) encabeza la lista de los marcadores evaluados de más alta eficiencia en la identificación de especies, postulándolo como un potente código de barras de ADN para *C. moschata*. Sin embargo, para validar la información se debe evaluar el marcador con otras especies estrechamente relacionadas.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento al Departamento Administrativo de Ciencias, Tecnología e Innovación Colciencias por la financiación del trabajo. A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. A los grupos de investigación Mejoramiento Genético, Agronomía y Producción de Semillas de Hortalizas y Diversidad Biológica

Referencias

- Vallejo, F. A. y Estrada, E. I. 2004. Producción de hortalizas de clima cálido. Palmira: Universidad Nacional de Colombia. 346 p.
- Painting, K. A.; Perry, M. C.; Denning, R.A.; y Ayad, W G. 199). Introduction To Gene banks and documentation systems. En: Painting, K.A., Perry, M.C., Denning, R.A. y Ayad, W.G. (eds.). Guidebook for genetic resources documentation. A self-teaching approach to the understanding, analysis and development of genetic resources documentation. IPGRI, Roma. 7-36.
- Hebert. P.D.N Hebert, Cywinska A., Bola, SL, JR DeWaard 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc.. Londres, Ser. B, 270. p. 313
- Flores, R. y Ana, M. 2009. Contribución al estudio de la domesticación del zapallo *Cucurbita moschata* (Duchesne ex Lam.) Duchesne ex Poir. Palmira. Trabajo de grado (Msc en Ciencias con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 42 p.
- White, T. J., 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic, San Diego, 315–322.