

Optimización de un protocolo de amplificación por PCR para la identificación de *Annona cherimola* Mill “Chirimoya”, mediante el uso del código de barras de ADN

Gladys Tello^{1,2,*}, Yuriko Ortega^{1,3}, Juan Agapito¹

¹ Laboratorio de Genómica y Biología Molecular, Instituto Peruano de Energía Nuclear.
Av. Canadá 1470, Lima, Perú

² Facultad de Ciencias-Biología, Universidad Nacional Agraria La Molina,
Av. La Universidad S/N, Lima, Perú

³ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos,
Av. Venezuela S/N, Lima, Perú

Resumen

Nuestro país es uno de los principales exportadores de chirimoya en el mundo, siendo Lima la región con mayor producción y exportación. Actualmente, existe poca información genética acerca de la identificación de la especie *Annona cherimola* Mill “chirimoya” mediante el uso de código de barras de ADN, herramienta molecular que permite tener un registro correcto en la identificación precisa de la especie. El objetivo de este estudio fue optimizar la técnica de extracción y amplificación por PCR como parte de la identificación molecular de *Annona cherimola* Mill “chirimoya”, mediante el uso de dos marcadores universales como *matK* y *rbcL* relacionados al gen de maduración y fotosíntesis. Se analizaron un total de 154 hojas colectadas de chirimoya extraídas de 26 árboles, distribuidas en 6 zonas de la región Lima-Perú (Ate, Callahuanca, Carabayllo, La Molina, Lima y Tapicara). Los resultados permitieron obtener una correcta estandarización en la extracción de ADN y todas las muestras fueron amplificadas para ambos genes.

Palabras claves: *Annona cherimola* Mill, marcadores moleculares *matK* y *rbcl*, código de barras.

Abstract

Our country is one of the leading exporters of chirimoya in the world, with the region Lima with the largest production and export. Currently, there is little genetic information on the identification of the species *Annona cherimola* Mill "chirimoya" using barcode DNA molecular tool to have a correct record the precise identification of the species. The aim of this study was to optimize the extraction technique and PCR amplification as part of the identification of molecular *Annona cherimola* Mill "chirimoya", by using two universal markers as *matK* and *rbcL* gene related to ripening and photosynthesis. Collected a total of 154 chirimoya leaves taken from 26 trees in 6 areas of the region Lima-Perú (Ate, Callahuanca, Carabayllo, La Molina, Lima and Tapicara) were analyzed. The results allow to obtain a proper standardization DNA extraction and all samples were amplified for both genes.

Key words: *Annona cherimola* Mill, *matK* and *rbcL* molecular markers, barcode.

1. Introducción

La *Annona cherimola* Mill “chirimoya” de la familia Annonaceae tiene su origen en los valles interandinos del Perú y Ecuador, comprendidos entre los 1500 a 2000 msnm [1]. Actualmente, el fruto tiene alta demanda dentro del país así como en el extranjero, registrándose un aumento de las hectáreas de cultivo como en el volumen de las exportaciones. El reto es posicionar a la chirimoya como un producto de bandera del Perú. Los principales mercados externos de la

chirimoya peruana son: Canadá (61 %), Costa Rica (32 %) y España (7 %) [2].

Por otro lado, registros bibliográficos confirman que esta especie está siendo poco estudiada a nivel molecular [3], siendo importante su identificación. Asimismo, la necesidad de estudios de conservación, diversidad y variabilidad genética son sin duda requisitos para la conservación de esta especie. Los estudios basados en taxonomía son comunes para su identificación, pero

* Correspondencia autor: tcgladys@gmail.com

también podrían ser muy limitados en algunos casos [4]. Las herramientas moleculares, por ejemplo el código de barras o “barcode” vienen siendo utilizadas por diferentes investigadores a nivel mundial como complemento a la identificación morfo-especies de diversas plantas [5]. Esta técnica ha sido aceptada como herramienta taxonómica, proporcionando de manera rápida y precisa discriminar e identificar especies de plantas a partir de un pequeño fragmento de ADN [6].

Actualmente, los estudios basados en códigos de barras para vegetales proponen utilizar siete marcadores provenientes del núcleo como del cloroplasto, los cuales son: *nrITS*, *nrITS2*, *atpF-H*, *matK*, *psbK-I*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *trnH-psbA*, *trnL-F*, *trnL(P6)* [7]. Para este estudio se trabajó con dos marcadores universales plastidiales llamados *matK* (maturase K o gen de la maduración), y *rbcL*, (ribulosa - 1, carboxilasa 5-bifosfato-carboxilasa oxigenasa subunidad grande), los cuales permiten obtener secuencias de calidad y altos niveles de discriminación resultando

en datos fácilmente comparables en la identificación [8].

Es por ello que la presente investigación tiene como objetivo estandarizar la técnica de extracción de ADN y amplificación por PCR, herramientas que permitirán la identificación molecular de la especie *Annona cherimola* Mill “chirimoya” mediante el código de barras de ADN usando marcadores *matK* y *rbcL*.

2. Experimental

2.1 Áreas de muestreo

Se recolectaron hojas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) del jardín botánico de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), ubicado en el distrito de La Molina; Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), ubicado en Lima y del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), ubicado en el distrito de Carabayllo. Además de las zona productoras de cultivo del Distrito de Callahuanca y Tapicara - Provincia de Huarochirí, Departamento de Lima (Figuras 1 y 2).

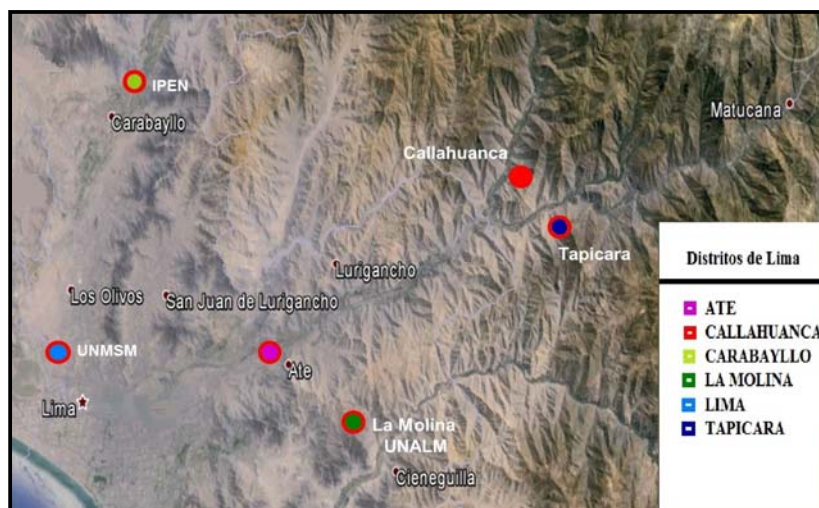


Figura 1. Localización de las zonas de muestreo para la colecta de hojas de chirimoya.

2.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN a partir de 100 mg de hoja fresca, utilizando dos métodos de extracción: QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit [9] y el método modificado de Buffer CTAB 2X [10]. El ADN fue cuantificado por espectrofotómetro (NanoDrop™ 1000).

2.3 Amplificación de los genes *matK* y *rbcL*

Fragmentos específicos para los genes *matK* y *rbcL* fueron amplificados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando el protocolo [11] y los cebadores descritos [12] en un volumen final de 30 uL conteniendo: 10X de buffer de PCR (20 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 50

mM MgCl₂, 10 mM de cada par de cebadores *matK* y *rbcL* (Tabla 1) 10 mM dNTPs, 5U Taq ADN (Promega), 3 ng/uL de ADN para *matK* y 50 ng/uL de ADN para *rbcL*. Los ciclos termales realizados en el termociclador (TECHNE TC-412) para el gen *matK* fueron de 94 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 55° por 30 s,

72 °C por 50 s y una extensión final de 72°C por 5 min. Para el gen *rbcL* se modificó el programa: 94 °C por 7 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 min 30 s, 55° por 1 min 30 s, 72 °C 1 min 30 s y una extensión final de 72°C por 10 min. (Comunicación personal, Víctor Jiménez).



Figura 2. Colecta de las muestras en el distrito de Callahuanca. Provincia de Huarochirí (Lima).

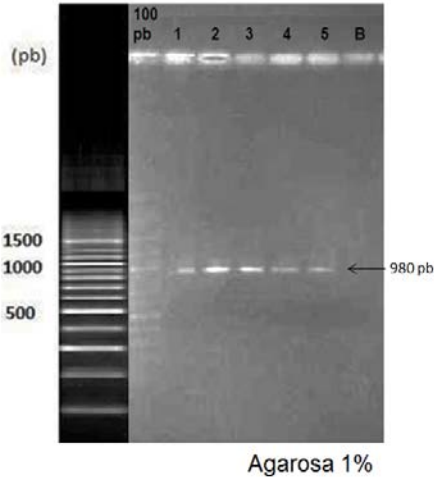


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posición 1 al 5 amplificación del gen *matK*. B= Blanco de PCR. Marcador 100 pb.

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, TBE 1X a 100 V, teñido con una solución de Bromuro de etidio (0.1 ug/mL) y visualizado en el foto documentador BIORAD bajo luz ultravioleta. Se utilizó como marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). (Figura 3 y 4).

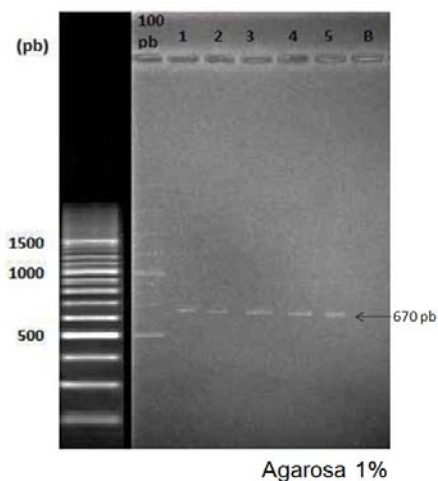


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posición 1 al 5 amplificación del gen *rbcL*. B= Blanco de PCR. Marcador 100 pb.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores *matK* y *rbcL* (Elansary, 2013).

Primer	Secuencia
<i>matK</i>	
1RKIM-f	5'CCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC3'
3FKIM-r	5'GTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG3'
<i>rbcL</i>	
<i>rbcL</i> -F	5'TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC3'
<i>rbcL</i> -R	5'GTAATAATCAAGTCCACCRG3'

3. Resultados y Discusión

Se evaluaron un total de 154 hojas de chirimoya provenientes de 9 árboles de Callahuanca, 5 de Tapicara y 3 de la zona de Ate, Carabayllo, La Molina y Lima. Todas las muestras fueron procesadas mediante dos métodos de extracción de ADN: buffer CTAB 2X y mediante el Kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). El método de CTAB empleado [10] permitió obtener un mayor rendimiento de extracción de ADN de las muestras y resultó fácil de implementar, sin embargo se obtuvo poca cantidad de ADN con el Kit comercial.

Los productos amplificados por la PCR con los cebadores descritos, mostraron fragmentos de tamaño de 980 pb para el marcador *matK* y 670 pb para el marcador *rbcL* en ADN genómico de chirimoya (Figuras 2 y 3). Sin embargo, otros autores han reportado en los estudios de secuenciación tamaños de 777 pb para el gen *matK* [13] y 552 pb para el gen *rbcL* [14]. Cabe resaltar que los avances de esta investigación corresponden a un estudio preliminar, basado solo en la amplificación de los marcadores *matK* y *rbcL* y no en la secuenciación de los genes.

Por otro lado, otras investigaciones reportan a los marcadores universales en rangos de amplificación de 862 a 910 pb para *matK* y 654 pb para *rbcL* [7], cercanos a los resultados del presente trabajo más no dentro de los mismos. Sin embargo, los rangos están sujetos a variación a medida que se estudie especies aún no trabajadas con código de barras.

Los resultados obtenidos permitieron la amplificación de bandas definidas y de muy buena intensidad para detectar ambos genes como se observa en los carriles 1-5 (Figuras 2 y 3).

La repetitividad preliminar del ensayo fue del 100 % de confiabilidad con los parámetros y condiciones anteriormente establecidas y la utilización de los controles con otras especies *Hibiscus rosa-sinensis* “cucarda” y *Pelargonium x hortorum* “geranio”.

No se amplificaron fragmentos de ADN en las muestras utilizadas como controles negativos y positivas de otras especies, lo cual confirmó la especificidad analítica de la técnica solo para detectar *matK* y *rbcL* en las muestras de chirimoya.

Esta metodología constituye una herramienta útil para el estudio de códigos de barras de ADN, como etapa previa a estudios más complejos como RFLP y secuenciación, similar a lo planteado por otros autores [4, 5, 12].

4. Conclusiones

El sistema de extracción de ADN modificado del protocolo CTAB, muestra una buena cantidad de ADN, sin embargo, no fue adecuado para realizar los estudios de amplificación por PCR, como si lo fue para las muestras extraídas con el kit comercial donde se obtuvo mejores resultados en la amplificación de los marcadores utilizados. Los marcadores *matK* y *rbcL* amplificaron en todas las muestras analizadas.

El PVP (polivinilpirrolidona) facilitó la optimización en la extracción de ADN por la liberación de los materiales nucleares y la precipitación de los polisacáridos, lo que mejora la calidad del extracto y por lo tanto, de los productos de amplificación.

Por último, este trabajo forma parte de un estudio preliminar por lo que la importancia de este protocolo se encuentra en los estudios futuros hacia la identificación taxonómica de esta especie.

5. Agradecimientos

Este trabajo contó con el apoyo del Instituto Peruano de Energía Nuclear. Los autores agradecen al MSc. José Olivera del laboratorio de Genética Molecular del

Instituto de Investigación de Farmacia de la Facultad de Medicina, MSc.(e) Víctor Jiménez del Laboratorio de Sistemática Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Bach. Ing. Agrónomo Marvin Pérez Cisneros de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), Sr. Eugenio Salazar productor de chirimoya en el Distrito de Callahuanca, Provincia de Huarochirí, Sr. Gerson Pérez Riquez productor de chirimoya del Anexo de Tapicara Distrito de San Mateo de Otao, Provincia de Huarochirí, por el apoyo recibido.

6. Bibliografía

- [1] Tijero F. El cultivo del chirimoyo en el Perú. Ediciones FUNDEAGRO. Lima, Perú. 1992. p 13.
- [2] Agencia Agraria de Noticias. Exportación de chirimoya peruana se incrementaría 50% este año. En volumen, los envíos llegarían a 104 TM. 11 de febrero 2014. Disponible en <http://www.agraria.pe/noticias/exportacion-de-chirimoya-peruana-se-incrementaria-50-este-ano>
- [3] Villena G. Valorización biotecnológica de la biodiversidad: La alternativa de desarrollo. Identificación de Megaproyectos de Investigación Científica. CONCYTEC. 2010. Lima, Perú. 2010. p. 44.
- [4] Packer L, Gibbs J, Sheffield C, Hanner R. DNA barcoding and the mediocrity of morphology. *Molecular Ecology Resources*. 2009; 9:42-50.
- [5] Pires C, Marinoni A. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*. 2010; 10:339-346. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199115791035>
- [6] Kress J, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the noncoding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One*, 2:e508. 2007.
- [7] Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 6(5): e19254. Ontario. Canada. 2011. p 1-3.
- [8] Haseeb A. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. *Plant Omics Journal*. 2011; 4(4):195-198.
- [9] Manual de procedimiento de kit QIAGEN DNeasy Plant Mini and DNeasy Plant Maxi Handbook. For isolation of DNA from plant tissue. 2004. p. 19-20.
- [10] Ghislain M, Zhang D, Herrera MR. (Eds.). *Protocolos de Laboratorio de Biología Molecular. Tipificación Genética. Manual de Capacitación*. Centro Internacional de la Papa (CIP). Departamento de Recursos Genéticos. 2ª Edición (revisada Oct. 1998). Lima, Perú. 1998. p. 1-2.
- [11] Kuzmina M, Ivanova N. PCR Amplification for Plants and Fungi. CCCB Protocols. Disponible en: http://www.ccdb.ca/docs/CCDB_Amplification-Plants.pdf
- [12] Elansary HO. Towards a DNA barcode library for Egyptian flora, with a preliminary focus on ornamental trees. *Versita Sp. z o.o*. 2013. p. 47.
- [13] Elansary HO. *Annona cherimola* voucher Hosam00153 maturase K (*matK*) gene, partial cds; chloroplast. 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/404331919>
- [14] Elansary HO. *Annona cherimola* voucher Hosam00153 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds; chloroplast. 2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/408450237>