

# Análisis del polimorfismo de ADN genómico de *Solanum sessiliflorum* Dunal (cocona) aplicando la técnica del RAPD-PCR en la región Loreto

## Polymorphism analysis of genomic DNA from *Solanum sessiliflorum* Dunal (cocona) applying RAPD-PCR technique in Loreto region

Janeth Braga V.<sup>1</sup>, Jorge Angulo Q.<sup>2</sup>, Juan C. Castro G.<sup>2</sup>, Pedro Adrianzén J.<sup>2</sup>,  
Javier Ramírez A.<sup>2</sup> y Jorge Marapara<sup>2</sup>

Recibido: abril 2011

Aceptado: junio 2011

### RESUMEN

La Amazonía peruana cuenta con una gran diversidad de recursos fitogenéticos, de los cuales *Solanum sessiliflorum* es una de las especies promisorias por la demanda que presenta y su factibilidad agroindustrial. Por tanto, para un uso óptimo del recurso, es preciso realizar su caracterización no solo a nivel fenotípico sino también a nivel molecular. En tal sentido, el presente trabajo de investigación se realizó para hacer una caracterización a nivel del ADN genómico de dos variedades de *S. sessiliflorum* que presentan una gran demanda a nivel local. La caracterización del ADN genómico se hizo empleando la técnica del RAPD-PCR con veinte primer's aleatorios. Los resultados muestran que de los veinte primer's aleatorios probados, solamente doce nos permitieron detectar polimorfismos a nivel del ADN genómico, los que nos facilitan la diferenciación genética de las dos variedades estudiadas. Sobre la base de estos datos se ha determinado que las dos variedades presentan una identidad genética de 67%.

**Palabras claves:** *Solanum*, RAPD-PCR, ADN genómico, polimorfismos.

### ABSTRACT

The Peruvian Amazon has a great diversity of phylogenetic resources, of which *Solanum sessiliflorum* is one of the promissory species for the demand that presents and its agroindustrial feasibility. Therefore, for a good use of the resource it is necessary to carry out their characterization at phenotypic and molecular level. In such a sense, the present investigation work was carried out to make a characterization at genomic DNA level of two varieties of *S. sessiliflorum* that present a great demand at local level. The characterization of the genomic DNA was made using the RAPD-PCR technique with 20 aleatory primer's. The results show that of the 20 aleatory primer's, only 12 allowed us to detect polymorphisms at genomic DNA level, those that facilitate us the genetic differentiation of the two studied varieties. Based on these data it has been determined that the two varieties present a genetic identity of 67%.

**Key words:** *Solanum*, RAPD-PCR, DNA genomic, polymorphisms.

### INTRODUCCIÓN

La sistemática trata de establecer una imagen completa de la gran diversidad de los organismos y al mismo tiempo de

establecer las relaciones formales existentes entre ellos y de conocer las leyes biológicas generales.

<sup>1</sup>Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Pevás 5ta. cuadra, Iquitos, Perú. janeth.braga@unapiquitos.edu.pe

<sup>2</sup>Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. UNAP. Iquitos, Perú.

Estos conocimientos se pueden conseguir a través de la obtención del mayor número de datos posibles sobre la forma, el tipo de vida, la distribución, la variabilidad. En la actualidad, se han utilizado diversos métodos estadísticos y numéricos para la valoración del catálogo de caracteres para evitar en lo posible las estimaciones subjetivas (Crisci, 1983).

Los avances en la biología molecular proveen las herramientas necesarias para el estudio del mejoramiento genético de plantas, la caracterización de bancos de germoplasma, la identificación y ubicación física en los cromosomas de características muy importantes. Las nuevas técnicas permiten el análisis a nivel del genoma nuclear, genoma mitocondrial y genoma cloroplástico en el caso de vegetales. Estos genomas pueden analizarse en forma directa con técnicas como Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD, por sus siglas en inglés) o de manera indirecta analizando proteínas totales o fracciones proteicas e isoenzimas.

Conscientes de la importancia y la necesidad de emplear técnicas de biología molecular para estudiar nuestra biodiversidad y fomentar su conservación, se efectuó este trabajo de investigación empleando la técnica del RAPD para analizar los genomas de dos variedades de *Solanum sessiliflorum*, especie agrónomicamente importante en nuestra región. Los objetivos que se consideraron fueron: extraer el ADN genómico de las variedades 2 y 3, desarrollar la amplificación del ADN genómico con primers aleatorios y caracterizar los perfiles genómicos de las dos variedades.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Obtención de las muestras botánicas

Las muestras botánicas fueron obtenidas de Timicurillo 1<sup>ra</sup> Zona, río Amazonas. Las muestras recolectadas (frutos y hojas) de las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* fueron trasladadas a las instalaciones de los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas y de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana para su procesamiento.

### Micropropagación y mantenimiento de plántulas

Los frutos de las dos variedades de cocona se procesaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, donde se procedió a obtener las semillas; luego estas fueron germinadas en condiciones estériles en medio de Murashige y Skoog con phytigel (Murashige y Skoog, 1962). Posteriormente, de las vitroplántulas se obtuvieron explantes, los cuales fueron utilizados para el repique y la obtención de más vitroplántulas de cada variedad; este último proceso se repitió cada vez que era necesario mantener las vitroplántulas.

### Extracción de ADN genómico

Se realizaron pruebas preliminares para la estandarización de la extracción del ADN genómico con el método propuesto por Lynch y Milligan (1994), modificado por Angulo (1999). Luego de realizar la estandarización de la extracción de ADN genómico se procedió a extraerlo de las vitroplántulas de ambas variedades. El ADN genómico extraído fue resuspendido en buffer TE (Tris-HCL 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) (Maniatis et al., 1989) y mantenido a -20 °C en viales de 1,5 ml.

### Cuantificación y calidad del ADN

Para cuantificar y ver la calidad del ADN

extraído, se procedió de acuerdo con Maniatis *et al.* (1989).

La cuantificación se determinó por comparación de las muestras con el ADN marcador fago lambda digerido con *Hind* III, mientras que la calidad se verificó con la ausencia de cola de ADN fragmentado en el gel de corrido. La electroforesis se realizó a 70 V por una hora en una cámara de gel horizontal con una fuente de poder (Biotron, ATOM 504). El gel se tiñó con bromuro de etidio (5 mg/l) por 10 min, se enjuagó y visualizó en un transiluminador de luz UV. Seguidamente, se procedió a tomar una fotografía del gel.

### **Amplificación del ADN genómico**

Se realizó con la técnica RAPD (Innis *et al.*, 1990; Yu y Pauls, 1994; Oganisian *et al.*, 1996) en un termociclador (Techgene, FTGENE2D), empleando 20 primers diferentes cada uno a una concentración de 0,25  $\mu$ M, buffer 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, dNTPs 250  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM, ADN genómico 50 ng y 0,25 U de Taq polimerasa en un volumen final de 20  $\mu$ l). Se programó el termociclador con las siguientes condiciones de temperatura: 1 ciclo de denaturación inicial 94 °C x 4 min; 40 ciclos de 94 °C x 1 min, 40 °C x 1min, 72 °C x 1 min; 1 ciclo de extensión final a 72 °C x 10 min; luego 8  $\mu$ l de los productos de amplificación y 5  $\mu$ l del Ladder 123 fueron resueltos mediante electroforesis a 70 V por 1 hora en geles de agarosa al 2% y visualizados con luz UV luego de ser tratados con bromuro de etidio. Seguidamente se procedió a tomar fotografías de los geles.

### **Determinación del tamaño de los productos amplificados**

Se procedió de acuerdo a Maniatis *et al.* (1989). Para ello se imprimieron las fotografías de los geles, y se procedió a

calcular el Rf de cada una de las bandas del Ladder 123. Con los datos del Rf y los logaritmos de los tamaños del Ladder en pares de bases (pb) se generó un gráfico semilogarítmico, con la que se obtuvo una recta y la ecuación respectiva. Los tamaños de los productos de amplificación polimórficos se calcularon determinando sus Rf; estos valores fueron reemplazados en la ecuación de la recta, al resultado obtenido se le determinó el antilogaritmo y este resultado corresponde al tamaño del producto de amplificación en pares de bases. Las tablas de los cálculos y las gráficas de los respectivos geles.

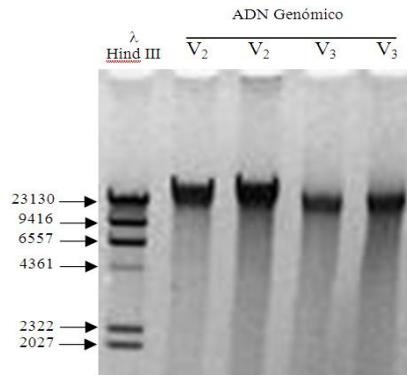
### **Análisis de datos**

De las fotografías tomadas a los geles se procedió a identificar las bandas polimórficas de los productos amplificados (presente en una variedad y ausente en la otra), las cuales se codificaron con 1 (banda presente) y 0 (banda ausente) y estos datos se introdujeron y procesaron con el software Popgene 1.31 (Oganisian *et al.*, 1996), el que nos proporcionó los resultados de identidad genética, distancia genética y el dendrograma de identidad genética.

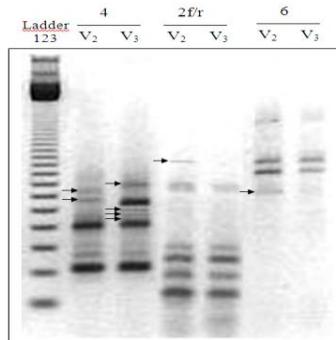
## **RESULTADOS**

### **Extracción y cuantificación del ADN genómico**

El ADN genómico extraído de las variedades 2 (V<sub>2</sub>) y 3 (V<sub>3</sub>) de *Solanum sessiliflorum* se aprecian en la figura 1. Es evidente que el ADN extraído es de buena calidad, debido a que no presenta degradación significativa. Al realizar la cuantificación por comparación con el estándar, se han encontrado 2300 ng de ADN en 50 mg de tejido de la variedad 2 y 1200 ng de ADN en 50 mg de tejido de la variedad 3; estas diferencias se deben a que para la extracción de ADN de la



**Figura 1.** Calidad del ADN genómico extraído de las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum*.



**Figura 2.** Productos de amplificación del ADN genómico de las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* obtenidos con los primer's que se indican

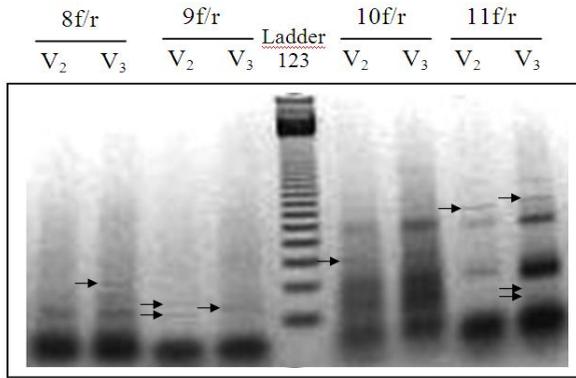
variedad 2 se han empleado solamente brotes, mientras que para la variedad 3 se empleó una mezcla de brotes, tallos y raíces; lo cual nos indica que hay diferencias en el contenido de ADN entre los tejidos de *Solanum sessiliflorum*.

### Amplificación

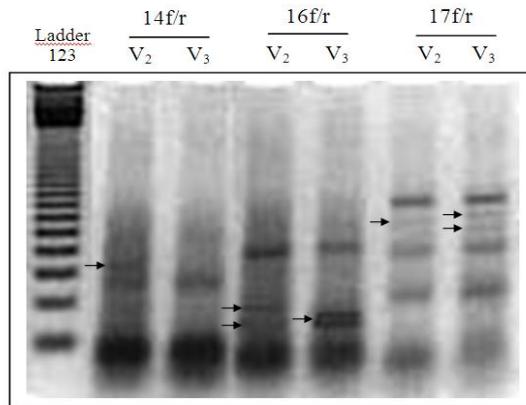
En las figuras 2, 3, 4 y 5 se aprecian los productos de amplificación del ADN genómico de las variedades 2 y 3, obtenidos con veinte primer's diferentes. En dichas fotos se muestran solamente los doce primer's que nos permitieron detectar polimorfismos en el ADN genómico de *Solanum sessiliflorum*, con los cuales se

diferencian las dos variedades analizadas. Así, se observó una banda polimórfica (presente en una variedad y ausente en la otra variedad) con los primer's 2f/r, 6, 8f/r, 10f/r y 14f/r; tres bandas polimórficas con los primer's 9f/r, 16f/r, y 17f/r; cuatro bandas polimórficas con los primer's 11f/r y 20; seis bandas polimórficas con el primer 4 y ocho bandas polimórficas con el primer 18. La ubicación de las bandas polimórficas se indican con flechas en las fotos de los geles.

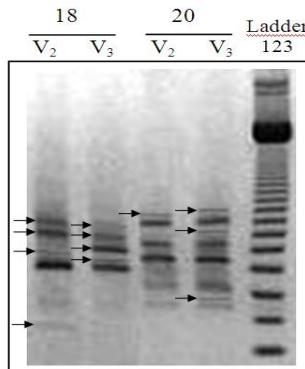
En el dendrograma se muestra que la identidad genética es de 0,67 (67%) y la distancia genética es de 0,33 (33%), indicándonos que las dos variedades son genéticamente muy idénticas.



**Figura 3.** Productos de amplificación del ADN genómico de las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* obtenidos con los primer's que se indican.



**Figura 4.** Productos de amplificación del ADN genómico de las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* obtenidos con los primer's que se indican.



**Figura 5.** Productos de amplificación del ADN genómico de las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* obtenidos con los primer's que se indican.



**Figura 6.** Dendrograma de identidad genética entre las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum*.

## DISCUSIÓN

Varios trabajos de investigación han encontrado diferencias fenotípicas marcadas entre las variedades de *Solanum sessiliflorum*, particularmente entre las variedades 2 y 3. Estas diferencias pueden observarse a nivel de órganos como los tallos, hojas y frutos (Pinedo, 1968; Grayum, 1987; Salick, 1988; Tello, 1995; Villachica, 1996; Tratado de Cooperación Amazónica, 1997).

Se conoce que, cuando una especie es expuesta a diversas condiciones ambientales puede presentar diferentes características fenotípicas como resultado de los mecanismos de adaptación de la especie a dichas condiciones (Gardner, 1990), lo cual no se atribuye completamente a diferencias marcadas a nivel de su genoma, sino a la expresión diferencial de sus genes, lo que le permite adaptarse a las condiciones ambientales impuestas (Pinedo, 1968).

Estas afirmaciones se evidencian con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, como el alto nivel de identidad genética entre las dos variedades estudiadas (0,67), a pesar de que ambas variedades presentan diferencias marcadas a nivel de sus características fenotípicas, como son tallos, hojas y frutos (figura 6).

En un trabajo previo, Braga *et al.* (2000) compararon tres variedades de *S. sessiliflorum* a nivel de proteínas totales extraídas de las semillas y encontraron una similaridad genética de 0,57 entre las variedades 2 y 3, mientras que en este

trabajo de investigación se encontró que dicho índice es 0,67, lo cual constata lo manifestado anteriormente, se observa una expresión diferencial de los genes evidenciado por las proteínas de semillas, es decir a nivel fenotípico son diferentes pero a nivel genotípico son más idénticos.

También, es preciso indicar que con la aproximación empleada (RAPD) existe la posibilidad de analizar varias regiones del genoma (Izumi *et al.*, 1997; Sidorenko *et al.*, 2000; Sivolap *et al.*, 1994; Sivolap *et al.*, 1996; Sivolap y Kalendar, 1995), tanto a nivel de los genes en sus zonas codantes o no codantes y también en regiones intergénicas, lo cual no es posible al analizar los aspectos fenotípicos ya que estos solo corresponderían a las regiones codantes de sus genes, excluyendo las otras regiones indicadas (Sineo *et al.*, 1993). Además, otro aspecto que puede influir en la expresión de los genes y por tanto en las diferencias fenotípicas, son los errores que puede cometer la enzima ARN polimerasa en el proceso de transcripción de los genes, es decir al añadir un ribonucleótido no complementario a la cadena de ARNm que se está sintetizando, originando modificaciones en las secuencias aminoacídicas y en el tamaño de las proteínas sintetizadas (Lodish *et al.*, 2001).

## CONCLUSIONES

1. La técnica de extracción de ADN genómico empleada permite obtener ADN de buena calidad.
2. La técnica de extracción de ADN genómico empleada permite la

eliminación de inhibidores de la reacción de PCR y por tanto adecuada para su utilización en el RAPD.

3. De los veinte primer's empleados, doce permiten diferenciar las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum*, siendo el primer 18 el que detectó un mayor número de polimorfismos entre los genomas de ambas variedades.
4. Es posible diferenciar las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* mediante el RAPD.
5. Las variedades 2 y 3 de *Solanum sessiliflorum* son genéticamente idénticas en un 67%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angulo Q J. 1999. Extracción de DNA por método no tóxico para RAPD-PCR. Libro de Resúmenes del I Congreso Internacional de Biología. Póster Número 41. Lima, Perú.
- Braga J, Angulo J, Ramírez J, Peña M, Chota W, Castro D. 2000. Determinación de la variabilidad proteica como marcadores moleculares de tres especies del género *Solanum* "cocona" y dos especies del género *Capsicum* "ají" (Solanaceae) en la región Loreto. Informe Final. Instituto de Investigación FCB-UNAP.
- Crisci JV. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. OEA. Washington D. C.
- Gardner EJ. 1990. Principios de genética. 5ª ed. Edit. Limusa. México. Pág. 821.
- Grayum M. 1987. *Solanum sessiliflorum* D. Instituto Nacional de Biodiversidad de Missouri Botanical Garden. 1985.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ. 1990. PCR Protocols, a guide to methods and applications. Academic Press. INC. San Diego, California.
- Izumi M, Kojima E, Matsuda M, Shimizu T, Murakami A, Tanabe T, Murakami K. 1997. Random amplified polymorphic DNA observed in Eucalyptus by PCR study with random primers. Nucleic Acids Symp Ser. (37): 167-8.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. 2001. Molecular Cell Biology. Fourth Edition. W. H. Freeman and Company. USA. 1084 pp.
- Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic-structure with RAPD markers Mol. Ecol., 3, pp. 91-99.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. First Edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory publications. New York. USA. 545 pp.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Oganisian A S, Kochieva EZ, Ryskov AP. 1996. "Fingerprinting of potato species and cultivar using RAPD-PCR". Genetika. 32 (3): 448-51.
- Pinedo J. 1968. Tesis: Determinación del rendimiento en peso, volumen de jugo

- y número de frutos de 7 variedades de "cocona" (*Solanum topiro*).
- Salick J. 1988. Cocona (*Solanum sessiliflorum*) production, nutrition and underex ploited crop of the Peruvian tropics. USAID/Lima, Perú. 18 pp.
- Sidorenko AP, Berezovskaia OP, Sozinov AA. 2000. "Assessment of genetic polymorphism in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* 8Say by RAPD markers". Genetika. 36 (5): 651-6.
- Sineo L, Martini R, Borghi G, Failli M. 1993. "Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)". Boll Chim Farm. 132 (6): 201-2.
- Sivolap IM, Balashova IA, Troshin LP. 1996. "The genetic polymorphism of the grape studied by RAPD analysis". Tsitol Genet. 30 (6): 33-7.
- Sivolap IM, Kalendar RN. 1995. "Genetic polymorphism in barley detected by arbitrary primers". Genetika. 31 (10): 1358-64.
- Sivolap IM, Kalendar RN, Chebotar SV. 1994. "The genetic polymorphism of cereals demonstrated by PCR with random primers". Tsitol Genet. 28 (6): 54-61.
- Tello F. 1995. Tesis: Caracterización biológica de néctares de cocona (*Solanum topiro*) y arazá (*Eugenia estipitata*) mediante geometría capilar. Iquitos, Perú.
- Tratado de Cooperación Amazónica. 1997. Cultivo de frutales nativos de la Amazonía, manual para el extensionista. Impresión Mirigraf SRL.
- Villachica H. 1996. Frutales y hortalizas promisorias de la Amazonía. Tratado de Cooperación Amazónica. Iquitos, Perú.
- Yu K, Pauls KP. 1994. Optimization of DNA-extraction and PCR procedures for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in plants. In: Griffin HG, Griffin AM, editors. PCR Technology: Current Innovations. London: CRC Press; pp. 193-200.