

Identificación de marcadores microsatélites polimórficos en el genoma de *Dioscorea trifida* L.f. "sachapapa"

Identification of marking polymorphic microsatellites in the genome of *Dioscorea trifida* Lf. "sachapapa"

Roberson Ramirez¹, Pedro Adriánzén^{1,2}, Marianela Cobos¹ y Juan Castro^{1,2}

¹ Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (CIRNA)

² Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), Apartado postal 4963 Facultad de C. Biológicas

RESUMEN

El objetivo principal del estudio fue identificar y evaluar marcadores microsatélites polimórficos presentes en el ADN genómico de *D. trifida* L.f. "sachapapa". Para esto se modificó el protocolo CTAB 2X que permitió obtener ADN genómico de buena calidad con un ratio de 1,78 y una cantidad de 186,9 µg/ml, mostrando ser aceptable para la amplificación de los microsatélites; del mismo modo se estandarizaron y amplificaron los marcadores microsatélites polimórficos, con seis pares de iniciadores, cuyos productos de amplificación variaron en un rango de 100 a 200 pb. Los 6 pares de iniciadores microsatélites utilizados no mostraron productos inespecíficos, resultando los iniciadores MT13 y MT110 más polimórficos con un contenido de información polimórfica (PIC) de 0,84 y 0,81 respectivamente. Sin embargo; el iniciador MT14 resultó con menor polimorfismo con un PIC de 0,52. Se encontró una ligera dependencia entre el número de alelos diferentes y el contenido de información polimórfica (PIC) con un índice de correlación relativamente alta ($r^2 = 0,69$). Se concluye que la técnica de obtención y purificación de ADN genómico de *D. trifida* L.f. es ideal para extraer ADN genómico, asimismo los 6 pares de marcadores microsatélites estandarizados son adecuados para futuros trabajos a nivel molecular en esta especie.

Descriptores: Microsatélites, *Dioscorea trifida* L.f., ADN genómico, PIC

ABSTRACT

The main objective of the study was to identify and evaluate polymorphic microsatellite markers present in genomic DNA *D. trifida* Lf. To modify this was achieved 2X CTAB protocol that yielded genomic DNA good quality with a ratio of 1.78 showing to be acceptable for the amplification and an amount of 186.9 µg/ml of the microsatellites, the same way were standardized and polymorphic microsatellite markers amplified with six pairs of primers, whose amplification products varied in the range of 100 to 200 bp. The 6 microsatellites primer pairs showed no nonspecific products, resulting initiators MT110 MT13 and more polymorphic polymorphic information content (PIC) of 0.84 and 0.81 respectively. However, the initiator was less polymorphism MT14 with a PIC of 0.52. There was a slight dependence between the number of different alleles and polymorphic information content (PIC) with a relatively high correlation index ($r^2 = 0.69$). We conclude that the technique of production and purification of genomic DNA from *D. trifida* L.f. is ideal for extracting genomic DNA, also the 6 pairs of microsatellite markers are adequate standard for future work at the molecular level in this species.

Keywords: *Dioscorea trifida* L.f., Microsatellite, genomic DNA, PIC

INTRODUCCIÓN

Dioscorea trifida "sachapapa" es un tubérculo muy parecido a la papa andina y está distribuida en

África, Asia y América. En nuestra amazonia peruana constituye una fuente de primer nivel en la dieta de los pobladores nativos, colonos e incluso

urbanos de nuestra selva alta y baja [2]. Asimismo, los estudios fisicoquímicos de harina de sachapapa [3]; revelan un 26,6% de carbohidratos, 2% de proteína y 129,5 de Energía (Kcal). El 90% de la producción mundial de *Dioscoreas* está en África Central y Occidental, quienes juntamente con Nigeria, representan el 68% de toda la producción mundial. Sin embargo, en la amazonia peruana no se reporta la producción y consumo anual de la especie [1]. Además de su importancia alimenticia y económica, tiene importancia farmacológica debido a que presentan sapogeninas y pigmentos antocianicos [4]. Para *D. trifida* L.f., los estudios referentes a origen, distribución geográfica, variabilidad genética, y citogenético son aún escasos [5] sumado a estas deficiencias, podemos indicar la carencia de estudios moleculares de esta especie en nuestra región. Sin embargo, actualmente disponemos de diversas técnicas de biología molecular que utilizan la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como el ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), Polimorfismo en Longitud de los Fragmentos Amplificados (AFLP) y los Microsatélites (SSR). De estas técnicas mencionadas, el estudio de los Microsatélites o SSRs se ha ido incrementando ya que muestran el más alto contenido de información polimórfica (PIC) en comparación con otras técnicas y se caracterizan por ser simples, sensibles, tener alta reproducibilidad, son codominantes y altamente informativos [6]. Además, estos marcadores microsatélites son amplificados a través de la PCR, utilizando un par de iniciadores o primers específicos, que hibridan en las regiones flanqueantes de los marcadores microsatélites.

Por las razones expuestas, se consideró como objetivo principal identificar y evaluar marcadores microsatélites polimórficos presentes en el ADN genómico de *Dioscorea trifida* L.f. "sachapapa", amplificando ADN purificado y cuantificando con iniciadores específicos para microsatélites e identificando los que proporcionan mayor polimorfismo.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Área de Estudio

Se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; situada en la calle Pevás 5ta cuadra.

Zona de muestreo

Se recolectaron al azar hojas jóvenes de *Dioscorea trifida* L.f, del banco de germoplasma de la Facultad

de Agronomía ubicado en Zungarococha (km 04 camaretera Iquitos-Nauta) cuyas coordenadas son 3°50'0504" de latitud y 73°22'0622" de altitud.

Purificación de ADN genómico

Se purificó el ADN genómico de acuerdo a [7], el cual fue modificado en los tiempos de incubación y el empleo del carbón activado, con la finalidad de eliminar los contaminantes del ADN.

Determinación de calidad y cantidad de ADN

Para verificar la calidad y cantidad del ADN se utilizaron los métodos electroforético y espectrofotométrico. Para la electroforesis se sembró 5 µl de ADN genómico y se corrió en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (10g/ml), a 100V por 1 hora. Para aplicar el método espectrofotométrico se diluyó el ADN 1/20 con la relación 260/280nm. Para calcular la cantidad de ADN obtenido se utilizó la fórmula propuesta por [8]. Posteriormente se realizó el PRE-PCR con la preparación del Master Mix, que incluyan agua ultrapura, buffer 10X, dNTPs 0,8 mM, MgCl₂ 2mM, los 6 pares de iniciadores directo y reverso 0,25 mM, propuesto por [5], taq DNA polimerasa 1 U/µl y ADN 1µl, las cantidades agregadas variaron para cada iniciador. Consecuentemente se realizó la PCR en el termociclador (TECHGENE), se realizó el corrido electroforético de los productos de amplificación en el gel de agarosa al 2%, sin embargo por la poca resolución que éste presentaba se preparó en gel de poliacrilamida al 6% que permitió la separación de los alelos generados por cada iniciador. Posteriormente el gel fue teñido usando la tinción argéntica con nitrato de plata propuesto por [9]. Luego se determinó el tamaño de los productos generados por la PCR en base a la ecuación de la recta generado por el RF (Índice de corrido) y el logaritmo del tamaño de cada alelo del marcador de 25 pb (Invitrogen). Finalmente se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) según [10] para estimar a los iniciadores más informativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad Y Cantidad De ADN Genómico

Método Electroforético

Al aplicar este método se observaron bandas intensas de ADN genómico. Sin embargo, inicialmente se evidenció la presencia de compuestos contaminantes del material genómico como los ARNs que se observa claramente en la parte inferior (Figura 1a), además del muclago ubicado en los pocillos de siembra. Y al ser tratadas con ARNasa y carbón activado, estos contaminantes son eliminados con lo que se obtiene un ADN de

buena calidad. (Figura 1b). Los resultados concuerdan con los resultados obtenidos por [11] y [12] debido a que utilizaron el mismo tratamiento para la extracción del ADN en hojas de *Dioscorea trifida* y *Coffea arabica* respectivamente.

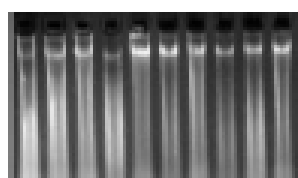


Figura 1a) Bandas de ADN genómico sin ARNasa y carbón activado b) ADN genómico tratado con ARNasa.

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

En la figura 02 se observa que en cada etapa de la purificación, la absorbancia va disminuyendo conforme se van eliminando los contaminantes. En la primera etapa (E-01) se evidencia la formación de una curva (pico) indicando la máxima absorbancia de la clorofila (660 nm). Asimismo a 230 nm, la absorbancia de algunos polifenoles, péptidos, hidratos de carbono, y por último las proteínas a 280 nm. Seguidamente en la segunda etapa (E-02), el solvente orgánico Cloroformo: alcohol isoamilico y el detergente CTAB 10X en cloruro de sodio, eliminan la clorofila, polifenoles y algunas proteínas. Y en la última etapa (E-03) donde se realizó el tratamiento con carbón activado, se eliminaron en su mayoría a los contaminantes, generando solo una curva (pico) a 260 nm, lo cual corresponde al ADN genómico. Aparentemente la presencia de las microporosidades, grupos funcionales como carboxilo, hidroxilo, carbonilo y asimismo electrones desapareados ubicados en sus centros activos del carbón activado, permitieron absorber sustancias polares como mucilago, de esta manera se optimizó y maximizó este protocolo.

Además se aprecia los ratios de calidad (A_{260}/A_{280}) en cada una de las tres etapas de la purificación, con valores de 0,96, 1,57 y 1,75 respectivamente, estos valores reflejan la mejora en la calidad del ADN extraído conforme se avanza en las etapas de purificación. Este método registró un ratio (A_{260}/A_{280}) promedio de 1,75, aceptable con respecto al Ideal (1,8). Además, la concentración promedio del ADN, estimado fue de 186,9 ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Ideal para la amplificación del marcador. Siendo este protocolo de CTAB, adecuado para extraer ADN de esta especie, sin embargo los resultados encontrados por [11]

reportan al MATAB como el más eficiente, pero la concentración es mucho menor que lo encontrado con el protocolo de este trabajo.

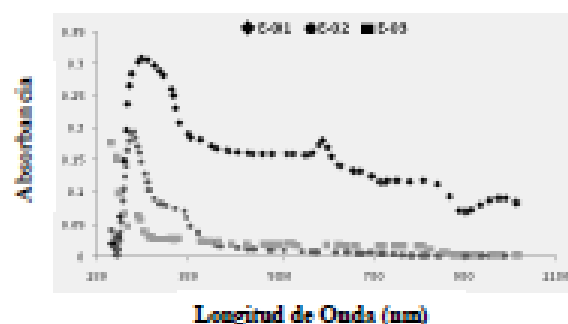


Figura 02: Análisis Espectrofotométrico de las etapas (E-01, E-02 y E-03) del proceso de purificación del ADN genómico de *D. trifida* L. f.

Amplificación Con Los Seis Pares de Iniciadores Por PCR

Los productos generados por el iniciador MT12 Y MT14 tienen un tamaño aproximado de 100 pb, y los productos del MT13, MT110 200 pb y del MT111 y MT112 190 pb aproximadamente (Figura 03).

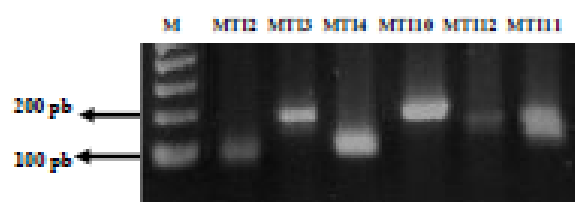


Figura 03: Amplificación de los 6 pares de iniciadores. La figura 04 muestra el polimorfismo que presentan estos iniciadores, con productos que varían de 100 a 200 pb, estos tamaños encontrados también fueron reportados por [5]

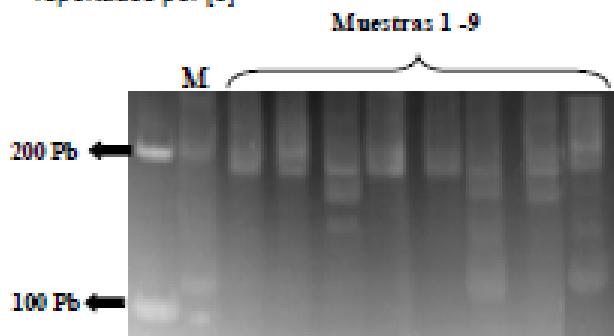


Figura 04: Iniciador más polimórfico MT13

Iniciadores	R ²	Ecuación	Rangos (Pb)	Rangos (Hochu et al. 2006)
MT112	0,995	$y = -0,751x + 2,721$	105 - 123	101 - 125
MT12	0,998	$y = -0,825x + 2,691$	120 - 129	119 - 131
MT111	0,997	$y = -0,754x + 2,701$	141 - 155	127 - 145
MT14	0,999	$y = -0,565x + 2,497$	107 - 117	101 - 118
MT13	0,998	$y = -0,845x + 2,699$	138 - 191	131 - 204
MT110	0,999	$y = -0,922x + 2,711$	151 - 174	158 - 178

Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El iniciador MT13 presenta mayor (PIC) con un valor de 0,84; es decir tiene más capacidad de discriminar los loci (Figura 1b), seguida del iniciador MT110, con PIC de 0,81; por otro lado el iniciador MT14 tiene menor valor PIC con 0,52 y el iniciador MT12 con 0,58. Estos resultados concuerdan con lo reportado por [5] que reporta al iniciador MT13 y MT110 como más polimórfico. Asimismo, reporta al iniciador MT111 como menos informativo, sin embargo en este trabajo se obtuvo como menos informativo al iniciador MT14 con un PIC de 0,52, seguido del iniciador MT12 que si concuerda con los reportes de [5], así como el rango de tamaño y número de alelos encontrados.

Relación entre contenido de información polimórfica y número de alelos diferentes.

Existe una ligera relación lineal debido a que se encontró un índice de correlación relativamente alto ($r^2 = 0,69$), entre el número de alelos generados por cada iniciador y el contenido de información polimórfica (PIC) de cada iniciador, es decir existe una ligera dependencia del número de alelos diferentes para un mayor valor de PIC.

El cuadro 01 muestra la ecuación de la recta y los valores de coeficiente de correlación lineal (R^2) generados a partir del marcador ladder de 25 pb por cada iniciador. Esta ecuación permitió obtener el tamaño de los alelos generados por cada iniciador. Y estos resultados concuerdan con los reportados por [5]

Tabla 01: Datos de Índice de Correlación (r^2), ecuación de la recta de cada iniciador y los rangos encontrados con cada iniciador y los propuestos por Hochu et al. (2006).

CONCLUSIONES

Se obtuvo ADN genómico de *Dioscorea trifida* L.f. de buena calidad 1,75 de ratio y cantidad con 186,9 $\mu\text{g/ml}$ promedio, suficiente para ensayos de amplificación.

El Marcador o iniciador MT13 presentó mayor polimorfismo con un PIC de 0,84 y por tanto es el más informativo, seguido del marcador MT110 con PIC de 0,81 y el menos polimórfico e informativo es el MT14 con un PIC de 0,52.

Se logró estandarizar y amplificar los 6 pares de iniciadores o marcadores microsatélites, demostrándose que son reproducibles debido a la presencia de los productos esperados

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto "Selección de clones superiores de *Dioscorea trifida* L. f. (Sachapapa) en base a su caracterización morfológica, molecular y fotoquímica, de la Región Loreto" por el financiamiento a este trabajo de investigación

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, por permitir el acceso a sus ambientes y uso de equipos para el desarrollo de este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] FAO. FAOSTAT Agriculture data. (2002) <http://apps.fao.org/collection>
- [2] Montaldo A. Cultivo de Raíces y tubérculos (1991). 2da. Edición
- [3] Reátegui d; Maury m; Chirinos c; Arcaña I. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria. 1(2001)43 – 48.
- [4] Heble M. R; y Staba E. Planta Medica supplement (1980) Pp. 124-128
- [5] Hochu, I. ; Santoni, S. Busalem, M. Journal Molecular Ecology 6(2006) 137-140

- [6] Ramos S.; Barrios A.; A. Martín; García A.; Rodríguez M.; Hernández M. Barriuso B.; Caminero C. *Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL)* 2(3): 21 – 24
- [7] Ghislain M. Rodríguez F.; Villalón F.; Nuñez J.; Waugt R.; Bonierbale M. Centro Internacional de la Papa (CIP). Program rep. (2000) Pp. 167 – 174
- [8] Sambrook *et al.* *Molecular cloning.* (2001). Third edition.
- [9] Bassam Y Gresshoff *Nature protocols Recipes for Researches* 2(2007)3-4
- [10] Bolsteind D. y Whiter. R; L. *American Journal of Human genetic.* 32(1980) 314 - 315.
- [11] Gonzales Y. *Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE.* (2003) Pp. 68 – 69.
- [12] Krizman M; Jaksej J; Baricevic, Javornik B. *Acta agriculturae Slovenica*, 2(2006) 427 – 439.
- [13] Morales, R.; Gonzales, C; Gonzales, R; Hernández, R. *Notas de Investigación en progreso. IDIAP.* 11(2001)1: 9

Roberson_Leo@hotmail.com