

Códigos de barras para la identificación del complejo *Capsicum*

Franco A. Vallejo C.¹, Jaime E. Muñoz F.², Rubén D. Rojas P.^{3*}

¹Profesor titular. Mejoramiento Genético, Agronomía y Producción de Semillas de Hortalizas. ²Profesor Asociado. Diversidad Genética. ^{3*}Estudiante de pregrado. Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. rdrojas@unal.edu.co

Palabras clave: DNA barcoding, psbA-trnH.

No existe una clasificación única y definitiva del género *Capsicum*. Varias investigaciones han contribuido al conocimiento en la diversidad genética de este género mediante caracteres morfológicos; sin embargo, la morfología floral en la diferenciación de especies de este género es poco efectiva (Pickersgill, 1980) y no permite diferenciar las especies *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* (Palacios, 2007). El acompañamiento de técnicas de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) ha permitido la identificación de genotipos y la formación de grupos con base en caracteres morfológicos y moleculares en *Capsicum*. La secuenciación y la bioinformática aplicada al campo de la taxonomía han proporcionado un modo de identificar especies más allá de los caracteres morfológicos, es así como surgen los códigos de barras (DNA Barcoding) que permiten la identificación de especies, mediante la utilización de una o más secuencias cortas de genes de una porción estandarizada del genoma. (Kress, 2005). Complementa los estudios morfológicos y puede facilitar la identificación taxonómica, la conservación y la gestión de recursos genéticos almacenados en bancos de germoplasma. En este estudio se evaluaron siete regiones loci cloroplásticas: AdhC, G3pdh, rpl32-trnL, ndhF-rpl32, 3'rps16-5'trnK(UUU), trnQ(UUG)-5'rps16, psbA-trnH y una región loci nuclear ITS4, ITS5A como posibles candidatos a la identificación del complejo *Capsicum*.

Metodología

Material biológico. Se utilizaron diez introducciones de *Capsicum* spp. procedentes del Banco de Germoplasma de Semillas existente en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Las introducciones fueron sembradas en campo y las muestras para análisis fueron tomadas de tejido foliar joven que no presentaba síntomas de enfermedades para ser transferidas a tubos 'eppendorf' debidamente identificados, liofilizadas y almacenadas en un termo con nitrógeno líquido.

Extracción DNA. El DNA genómico fue aislado a partir de tejido liofilizado, utilizando el método de Doyle y Doyle (1987) modificado.

Amplificación por PCR. Se utilizó un par de cebadores por cada región. Las condiciones de los ciclos de PCR empleadas fueron: desnaturalización a 80°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento de los cebadores a 50 °C por 1 min, seguido por una rampa, por ejemplo, incremento gradual de 0.3 °C/seg hasta 65 °C, una extensión de primer a 65 °C por 4 min seguida por una de extensión final de 5 min a 65 °C. Los productos de amplificados fueron enviados a Macrogen Corea para su purificación y secuenciación.

Edición y análisis de secuencias. Para la edición y ensamble de las secuencias de ADN se empleó el software Vector NTI®. Una vez limpiadas, se ensamblaron las secuencias y se comprobó su identidad en BLAST, por último se hizo un alineamiento múltiple con empleo de ClustalW.

Resultados

Se observaron variaciones en los ocho locis. La región AdhC mostró una amplificación inespecífica que dio lugar a múltiples bandas, por tanto se excluyó del experimento. Los locis G3pdh, ITS4-ITS5A, rpl32-trnL, ndhF-rpl32, 3'rps16-5'trnK(UUU), trnQ(UUG)-5'rps16 presentaron una amplificación exitosa con las condiciones PCR establecidas (Cuadro 1). Sin embargo, las secuencias de aminoácidos generadas de esta región de genes no permitieron determinar la identidad en BLAST de las especies estudiadas, excepto para la región ITS4-ITS5A donde el algoritmo de BLAST permitió identificar positivamente sólo el 20% de las secuencias. La identificación se llevó a cabo a nivel de familia y especie. La región cloroplástica *psbA-trnH* demostró una alta eficiencia en la amplificación y permitió identificar el 100% de las secuencias. La utilización de esta región en el genoma cloroplástico presentó atributos deseables como códigos de barras, genes conservados y alto número de copias en cada célula, lo que permitió la amplificación de dichas regiones. El análisis UPGMA de las

secuencias psbA-trnH ayudó a la diferenciación del complejo *Capsicum*, donde *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* permanecieron en un mismo grupo. En el dendrograma de la Figura 1 se aprecia la diferenciación de las especies evaluadas: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*, al mostrar la distancia taxonómica.

Cuadro 1. Amplificación y regiones exitosas en el complejo *Capsicum*.

Variables	Locus							
	Nuclear		Cloroplásticas					
	ITS4 ITS5A	psbA-trnH	AdhC	G3pdh	rpl32-trnL	ndhF- rpl32	3'rps16-5' trnK(UUU)	trnQ(UUG) -5'rps16
Condiciones PCR	65°C	65°C	65-72°C	65°C	65°C	65°C	65°C	65°C
Amplificaciones exitosas (bandas individuales)	10/10	10/10	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Amplificaciones no específicas (bandas múltiples)	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Porcentaje de amplificación (%)	100.	100.	100.	100.	100.	100.	100.	100.
Porcentaje de amplificación no específica (%)	0.	0.	100.	0.	0.	0.	0.	0.
Utilizados en la identificación	SI	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Identificación de la familia(%)	2/10=20.	10/10=100.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.
Identificación especie (%)	2/10=20.	10/10=100.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.	0/10=0.

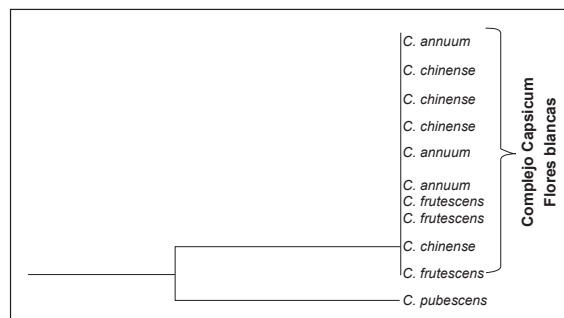


Figura 1. Análisis UPGMA. Secuencias de la Región psbA-trnH de diez introducciones de *Capsicum* spp.

Conclusión

La región psbA-trnH es una herramienta útil para la identificación de las especies del complejo *Capsicum*, teniendo en cuenta la facilidad y las condiciones reproducibles del PCR. Este marcador de ADN puede ser utilizado para identificar con precisión las especies del complejo *Capsicum*.

Agradecimientos

A: Franco A. Vallejo, Jaime E. Muñoz, por la lectura crítica del escrito, Fabián Tobar por compartir sus conocimientos en el área de Bio-informática, Duber Y. Cañar, por acompañamiento, Magda Piedad por su constante gestión, Sindi Tapia Lajud por su acompañamiento y a los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por su ayuda y conocimientos aportados.

Referencias

- Kress, W. J.; Wurdack, K. J.; Zimmer, E. A.; Weigt, L. A.; y Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. 102:8369-8374.
- Pickersgill. 1980. Some aspects of interspecific hybridation in *Capsicum*. IV. Eucarpia meeting, Capsicum Working group 1980. Wageningen. p. 1-5.
- Palacios, C. S. 2007. Caracterización morfológica de accesiones de *Capsicum* spp. Trabajo de grado (Magíster en Ciencias, con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales) Universidad Nacional de Colombia- Sede Palmira.