

# INFORME TÉCNICO ANUAL

**Titulo del Proyecto:**

**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *CARICACEAS* EN EL SUR DEL PAÍS MEDIANTE LA TECNICA AP-PCR**

**Código:** Parte del proyecto IQCV045

**Responsables:** Blga. Denisse Peña T.

**Institución Base:**

INIAP. Estación Experimental Chuquipata, Granja Experimental Bullcay

**Instituciones colaboradoras:**

Departamento Nacional de Recursos Filogenéticos y Biotecnología (DENAREF- INIAP.

Fundación San Francisco – Loja

Universidad de Ghent

**Fecha de Inicio:** Enero /2004

**Fecha término:** Diciembre/2004

## Introducción

El proyecto “Diversidad de Frutales Nativos Comestibles *Solanaceae* y *Caricaceae*, Fenología Usos y Recolección de Germoplasma en el Sur del País”, financiado por el Programa de Modernización del Sector Agropecuario (PROMSA) y El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ha localizado material de *Vasconcellea* en estado silvestre y cultivado con características aún no descritas, razón por la cual se lo ha considerado como un posible nuevo taxón botánico. Además se ha colectado una segunda especie que morfológicamente comparte características tanto de *V. Cundinamarcensis* como del posible nuevo taxón, ambas en la Cordillera occidental del Austro de Ecuador (INIAP, 2003).

Para conocer las relaciones filogenéticas entre las accesiones registradas por el mencionado proyecto y así apoyar o descartar la hipótesis de tener un nuevo taxón y un híbrido natural, los marcadores moleculares de ADN constituyen una herramienta confiable, ya que proporcionan estabilidad en la identificación de especies, ayudando a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, lo cual requiere observaciones muy exhaustivas de los organismos en los diferentes estadios de desarrollo. Los criterios utilizados carecen a menudo de definición y objetividad, y en cualquier caso son marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales (Claros, 2002).

## Objetivos específicos del Proyecto:

- Conocer las relaciones filogenéticas entre las accesiones registradas por el proyecto IQCV045
- Apoyar o descartar la hipótesis de tener un nuevo taxón y un híbrido natural
- Estandarizar la técnica AP- PCR para las Vasconcelleas en estudio
- Aplicar los conocimientos y adquirir destrezas en el área de biología molecular

## Materiales y Métodos

### 1. Preparación de la muestra

Cada una de las muestras secas fueron maceradas en morteros, en donde se adicionó 0,2g de antioxidante bisulfito de sodio. Cuando la muestra estuvo lista 0,5g de material macerado fue utilizado para cada una de las extracciones.

### 2. Extracción del ADN

El protocolo empleado fue una combinación de las técnicas de Ferreira y Grattapaglia (1998) y Del Rio y Bambey (1993), tal como lo describen Medina y Yaguache, (2003). Cuando las muestras se mostraron contaminadas se sometieron a una purificación con el protocolo de Jhigan (1992).

### 3. Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN genómico se llevo a cabo en minigeles de agarosa 1%, mediante la comparación de bandas de ADN obtenidas con las del estándar *ADN Low Mass Ladder*,.

### 4. AP-PCR

Las amplificaciones finales se realizaron colocando 3ul de cada ADN muestra (5ng/ul) en tubos PCR, en cada uno de ellos se adicionó 5,5ul de la solución del mix de reacción que consta de: 2,2ul Buffer PCR 5X (Tris pH8 0,25M; KCl 0,1M; MgCl<sub>2</sub>6H<sub>2</sub>O 0,005M; BSA 0,25%; Ficoll400 0,75%; Xylene Cyanole 0,05%) (Morillo, 2000), 0,13ul de Taq polimerasa (5U/ul), 0,4ul de DNTPs (2,5mM c/u; MgCl 0,025M), 2,3ul de agua ultrapura y 0,4 del *primer* (20pM ), la mezcla resultante fue cubierta con 10ul de aceite mineral, para evitar la evaporación, finalmente los tubos fueron debidamente tapados y colocados en un termociclador MJ Research PTC-100 con la siguiente programación:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1) Desnaturalización inicial	94	5 min
2) Desnaturalización cíclica	94	30 seg
3) Alineamiento	40	1 min
4) Extensión	4	2 min
5) 40 veces desde el 2 hasta el 4		
6) Extensión final	72	7 min
7) Conservación de la muestra	72	5 min

Los productos de la amplificación se migraron en geles de agarosa al 1,5%

La electroforesis se llevó a cabo durante 3 horas a 110 Voltios, luego, se fotografiaron los geles (20 X 10 cm) para la posterior identificación y lectura de bandas polimórficas.

## **5. Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico NTSYS-pc (Applied Biostatistics Inc., 1994), los pares de similitud genética fueron calculados de la matriz de datos binarios usando el coeficiente de Jaccard.

Mediante el método de agrupamiento UPGMA (Media Aritmética no Ponderada) utilizando previamente la opción SAHN CLUSTERING, posteriormente se obtuvo el respectivo dendrograma. Paralelamente se realizó el análisis de coordenadas principales (PCO) con el cálculo anticipado de los valores eigen, todo esto en el mismo programa estadístico mencionado.

## **Resultados, Avances y Discusión:**

### **R1. POA**

Se realizó el análisis molecular de las *Vasconcelleas* del sur del país, cumpliéndose con todas las actividades planificadas para conseguir este objetivo.

- Se apoya la hipótesis de tener un nuevo taxón registrado en la zona y descartamos la presencia de un híbrido natural.
- Estandarizamos la técnica AP-PCR para las *Vasconcelleas* en estudio
- Se aplicaron los conocimientos adquiridos y se adquirieron destrezas en el área de biología molecular

## **Conclusiones y Recomendaciones:**

En general los protocolos de laboratorio fueron adecuados y eficientes para nuestros propósitos. La técnica RAPD fue buena para discriminar grupos, los resultados guardan concordancia con otros trabajos similares en los que incluso se han usado técnicas más sensibles como AFLP, por lo que RAPD es recomendable para este tipo de estudios, sobre todo para nuestro medio, ya que es una técnica simple, relativamente económica y no requiere conocimiento previo sobre la secuencia.

La especie silvestre (*V. sp.*) presenta un agrupamiento claro y definido, bastante cercano a *V. cundinamarcensis*; este trabajo apoya la hipótesis de nominarla como un nuevo taxón, expresada por Criollo, 2003. y descarta la presencia de un posible híbrido procedente de la especie silvestre *V. sp.*

El dendrograma obtenido mostró agrupamientos claramente definidos por especie, y en éste, se pudo confirmar las relaciones genéticas existentes entre las distintas especies que se han incluido, coincidiendo muchas de ellas, con otros estudios publicados.

El género *Carica* se presentó en un grupo distinto, es decir, comparte un menor grado de similitud con el resto de materiales, de igual forma, las *V. candicans* se ubican con bajos niveles de similitud respecto al resto de *Vasconcelleas*, por lo que su inclusión dentro del género actual debería revisarse.

**R. POA**

Se escribió un proyecto para la reactivación del laboratorio de biotecnología, el cual fue aprobado por la Embajada de Japón.

Se han realizado algunas conversaciones con personas del CINCAE y otras instituciones (Consejos Provinciales y Alcaldías) para el financiamiento de futuros proyectos en el laboratorio.

Se tiene elaborado un perfil de proyecto para ser entregado en la llamada que ha hecho FUNDACYT para proyectos de investigación en el 2005.

Se ha apoyado en algunas actividades al departamento de generación de Conocimiento y Tecnología de la Estación, principalmente en eventos como días de campo ferias y exposiciones.