

Evaluando el uso potencial del gen *ycf1* como código de barras en *Amaranthus spp.*

JULIO CHÁVEZ-GALARZA¹, DORA HENRIQUES^{2,3}, MARIA ALICE PINTO², CINTHYA ZORRILLA¹



¹INIA-Instituto Nacional de Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura y Riego, Perú
²CIMO-Centro de Investigação de Montanha, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal
³CBMA-Centro de Biología Molecular e Ambiental, Universidade do Minho, Portugal

Correspondencia: JULIO CHÁVEZ-GALARZA, INIA-Instituto Nacional de Innovación Agraria, Perú. E-mail: jccchavezgalarza@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Durante la última década, varias regiones del genoma de cloroplasto tales como *atpF-H*, *matK*, *psbK-I*, *rbcL*, *ropC1*, *rpoB*, *trnH-psbA* y *trnL-F* que son frecuentemente usados en sistemática molecular de plantas han sido extensamente evaluados, y solamente los genes *rbcL* y *matK* han sido seleccionados como códigos de barra de ADN para plantas por el Grupo de trabajo de plantas del Consorcio del Código de Barras de la Vida-CBOL (Hollingsworth *et al.* 2011). Desafortunadamente, estos dos genes no han podido completamente resolver la identificación de las especies en determinados grupos taxonómicos de plantas. Recientemente, el gen del cloroplasto *ycf1* presenta dos regiones muy variables en plantas con flores, habiendo sido propuesto como un gen promisorio para ser usado como código de barras genético (Dong *et al.* 2016). En el Perú, 12 especies de *Amaranthus* han sido reportadas (Brako y Zarucchi 1993), las cuales podrían producir híbridos interespecíficos haciendo la identificación inequívoca difícil en trabajos de colección, conservación y manejo de germoplasma, siendo el método de código de barras de ADN una solución ante esta dificultad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es predecir y analizar las secuencias del gen *ycf1* dentro de los genomas de cloroplastos disponibles en especies de *Amaranthus* para ser usado como código de barras de ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Las secuencias de los genes *ycf1*, *matK* y *rbcL* de *Nicotiana tabacum* fue usada como referencia para predecir sus ortólogos en los genomas cloroplastidiales en las especies del género *Amaranthus* (Figura 1a).
- Para las especies de la familia Rosaceae, Fagaceae, Chenopodiaceae, Vitaceae, Rutaceae, Verbenaceae, Solanaceae, Araliaceae, Paeoniaceae, Iridaceae; los fragmentos de la secuencia 23 *ycf1*-b del gen *ycf1* (Figura 1b), fueron usados como código de barras genético, y obtenidos del GENE BANK a través sus números de accesiones (Tabla 1), las secuencias para los genes *matK* y *rbcL* fueron las reportados por Dong *et al.* (2016).
- Las secuencias de los genes fueron alineadas y analizadas usando CLUSTALW incorporado dentro del programa MEGA.
- Topologías basadas en *neighbor-joining* (NJ) fueron llevadas a cabo para la representación gráfica de los patrones de divergencia de las secuencias de los genes entre especies. El modelo genético de distancia Kimura – dos parámetros fue usado para estimar la divergencia nucleotídica. Todas las topologías NJ fueran soportadas con 1000 *bootstraps*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Foram identificados ortólogos dentro del genoma de cloroplasto en el género *Amaranthus*, con aproximadamente 5,412 pb para *A. hypochondryacus*, *A. caudatus*, y *A. cruentus*, los cuales no fueron reportados cuando se publico la anotación de sus genomas (Chaney *et al.* 2016). En el caso de *A. tricolor* la secuencia fue parcial.
- El gen *ycf1*, fue el único que permitió discriminar a las especies en todas las familias analizadas (Figura 2a). Mientras el gen *matK* no funcionó para las familias Araliaceae y Paeoniaceae, pero si funcionó para Amaranthaceae (Figura 2b), y el gen *rbcL* no distinguió dentro de las familias Amaranthaceae y Rosaceae (Figura 2c).
- Cuatro sitios polimórficos de la región considerada como códigos de barra del gen *ycf1* permiten distinguir *A. hypochondryacus*, *A. caudatus*, y *A. cruentus*, extra estudios es necesario para *A. tricolor* por presentar secuencia parcial.

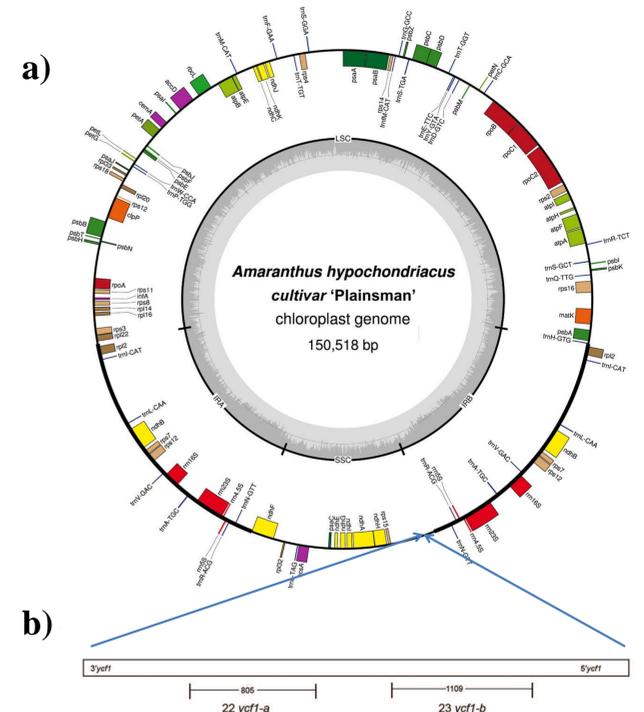


Figura 1. a) Arquitectura del genoma mitocondrial de *Amaranthus hypochondryacus* indicando la putativa posición del gen *ycf1*, b) Esquema del gen *ycf1*, indicándose cuales son los fragmentos evaluados para código de barras genéticos (Dong *et al.* 2012), para este estudio se selecciono 23 *ycf1*-b.

Tabla 1. Especies, familias y número de accesión de las secuencias utilizadas para evaluar el código de barras genético en este estudio

Especie	Familia	<i>ycf1</i>	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
<i>Amaranthus hypochondryacus</i>	Amaranthaceae	KX279888.1	KX279888.1	KX279888.1
<i>Amaranthus tricolor</i>	Amaranthaceae	KX094399.1	KX094399.1	KX094399.1
<i>Amaranthus caudatus</i>	Amaranthaceae	PI642741	PI642741	PI642741
<i>Amaranthus cruentus</i>	Amaranthaceae	PI477913	PI477913	PI477913
<i>Spinacia oleracea</i>	Chenopodiaceae	AJ400848.1	AJ400848.1	AJ400848.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	Solanaceae	KU199713.1	KU199713.1	KU199713.1
<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	Solanaceae	AB240139.1	AB240139.1	AB240139.1
<i>Caryopteris clandonensis</i>	Verbenaceae	KP088135.1	KP088995.1	KP088512.1
<i>Clerodendrum trichotomum</i>	Verbenaceae	KP088400.1	KP089017.1	KP088539.1
<i>Panax stipuleanatus</i>	Araliaceae	KP089446.1	KP089460.1	KP089455.1
<i>Panax ginseng</i>	Araliaceae	KP089435.1	KP089459.1	KP089454.1
<i>Panax japonicus</i>	Araliaceae	KP089432.1	KP089458.1	KP089453.1
<i>Parthenocissus thomsonii</i>	Vitaceae	KP088401.1	KP089167.1	KP088703.1
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	KP088179.1	KP089371.1	KP088918.1
<i>Citrus trifoliata</i>	Rutaceae	KP088184.1	KP089016.1	KP088538.1
<i>Phellodendron chinense</i>	Rutaceae	KP088225.1	KP089168.1	KP088706.1
<i>Prunus zhengheensis</i>	Rosaceae	KP089833.1	KP089854.1	KP089875.1
<i>Prunus armeniaca</i>	Rosaceae	KP089821.1	KP089842.1	KP089863.1
<i>Prunus sibirica</i>	Rosaceae	KP089828.1	KP089849.1	KP089870.1
<i>Quercus stellata</i>	Fagaceae	KP088367.1	KP089281.1	KP088821.1
<i>Quercus robur</i>	Fagaceae	KP088361.1	KP089274.1	KP088814.1
<i>Quercus mongolica</i>	Fagaceae	KP089887.1	KP089917.1	KP089902.1
<i>Paeonia delavayi</i>	Paeoniaceae	KP089771.1	KP089752.1	KP089761.1
<i>Paeonia descomposita</i>	Paeoniaceae	KP089769.1	KJ946113.1	KJ946161.1
<i>Paeonia jishanensis</i>	Paeoniaceae	KP089777.1	KJ946120.1	KJ946168.1
<i>Iris scariosa</i>	Iridaceae	KP089537.1	KP089627.1	KP089582.1
<i>Iris setosa</i>	Iridaceae	KP089538.1	KP089628.1	KP089583.1
<i>Iris sibirica</i>	Iridaceae	KP089539.1	KP089629.1	KP089584.1

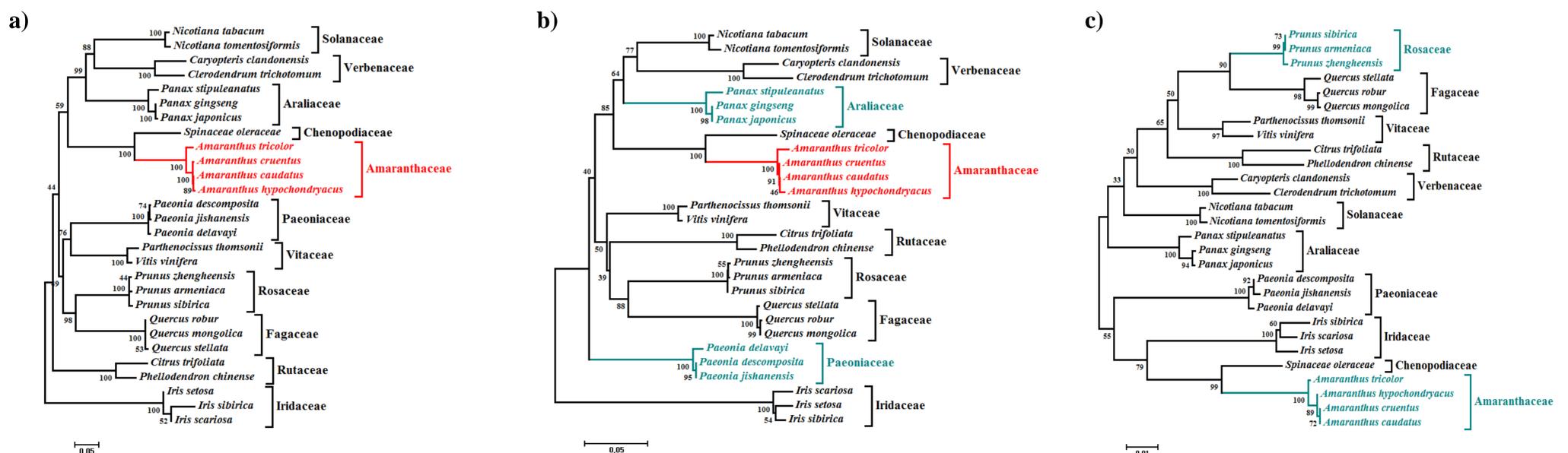


Figura 2. Relaciones filogenéticas de los fragmentos de secuencias de los genes usados como código de barras genético para especies de *Amaranthus* y otras familias a) *ycf1*, b) *matK*, y c) *rbcL*. El color rojo indica cuando el gen identifica las especies en Amaranthaceae, el color verde cinza cuando los genes no consiguen distinguir las especies, y el negro cuando distinguen a las especies en otras familias diferentes a Amaranthaceae.

- Nuestros resultados revelan el poder discriminatorio del gen *ycf1* con respecto a los otros genes recomendados por el CBOL, lo cual es concordante con previos estudios en esta región genómica (Dong *et al.* 2012, 2016). Sugiriendo su inclusión como nuevo gen para código de barras genéticos para plantas en especial para el género *Amaranthus*.
- Es necesario incluir más individuos de la misma especie para poder identificar y diferenciar polimorfismos interespecíficos e intraespecíficos, lo que mejorará este método para identificar poblaciones dentro de una especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Innovación Agraria – PNIA por el financiamiento a Julio César Chávez Galarza a través de la Consultoría en Filogenia y Taxonomía



- Brako and Zarucchi (1993) Catalogue of the flowering plant of Perú. Monograph in Systematic Botany. Vol 45. Missouri Botanical Garden. St. Louis, MO. 1286 pp.
- Chaney *et al.* (2016) The complete chloroplast genome sequence for four *Amaranthus* species. Applications in Plant Sciences. 4(9): 160063.
- Dong *et al.* (2012) Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding. PLoS ONE. 7(4): e35071.
- Dong *et al.* (2016) *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. Scientific Reports. 5: 8348.
- Hollingsworth *et al.* (2011) Choosing and using a Plant DNA barcode. PLoS ONE. 6(5): e19254.