

**¿GENES RELACIONADOS?**

**¡MAPAS SIMILARES!**

# ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA CONSERVACIÓN DE SITIOS DE RESTRICCIÓN ENTRE GENES QUE CODIFICAN POLIFENOLES OXIDASAS (PPO) EN LULO, PAPA Y TOMATE

Mauricio Pulido Jiménez<sup>1</sup> y Víctor Manuel Núñez Zarante<sup>2</sup>

Director CEBM, Gimnasio Campestre. 2. Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica.  
Correspondencia para el autor: [centrobiomol@campestre.edu.co](mailto:centrobiomol@campestre.edu.co)

Recibido: 12 de septiembre de 2014

Aprobado: 29 de septiembre de 2014

## RESUMEN

Mediante el uso de herramientas computacionales se identificaron los sitios de corte para enzimas de restricción presentes en los genes *ppo* de papa, tomate, lulo, tabaco, manzana, batata, haba y durazno, se construyeron los mapas de restricción para los genes de las tres primeras especies y, con el fin de determinar su grado de similitud, se estableció una comparación entre ellos respecto de la localización y número de los sitios de corte. El análisis comparativo reveló que los sitios ubicados sobre la región 3' de los genes están mejor conservados que los del extremo 5'. Existen mínúsculas variaciones posicionales que son consecuencia de las diferencias en los tamaños de los genes estudiados. Los sitios de corte para las enzimas BsaJI, BtgI, ScrFI, ApoI, Styl, NcoI y NlaIV son los mejor conservados en términos de localización y cantidad. La coincidencia de los mapas de restricción elaborados es una nueva evidencia de la estrecha relación filogenética entre los genes *ppo* de lulo, papa (alelos A y B) y tomate (alelos E y F).

**Palabras claves:** pardeamiento enzimático, polifenol oxidasa, *Solanum quitoense*, enzima de restricción, mapa de restricción.

## SUMMARY

By means of computational tools, restriction enzyme cutting sites in potato, tomato, naranjilla, tobacco, apple, sweet potato, broad bean and peach *ppo* genes were identified; restriction maps for *ppo* genes from the first three species were made and, to determine its similarity level, a comparison among them with respect to location and cutting sites number were established. The comparative analysis showed that cutting sites located at the 3' end of *ppo* genes are much better conserved than those at the 5' end and for each one of them there are minor positional variations which are the consequence of studied genes length differences. Cutting sites for the enzymes BsaJI, BtgI, ScrFI, ApoI, Styl, NcoI and NlaIV are the best conserved with respect to location and quantity. The coincidence level of restriction maps made results in a new evidence of the tight phylogenetic relation among the *ppo* genes of naranjilla, potato (alleles A and B) and tomato (alleles E and F) *ppo* genes.

**Key words:** Enzymatic browning, polyphenol oxidase, *Solanum quitoense*, restriction enzyme, restriction map.

## INTRODUCCIÓN

La recombinación genética, así como la mutación, son algunos de los mecanismos que producen variabilidad del material hereditario en los seres vivos, condición que propicia la adaptación de estos a los cambios que ocurren en su entorno y que determina su capacidad para sobrevivir y generar descendencia capaz de perpetuar la especie (Verma, Sharma, Srivastava, Abdin & Bhatia, 2014). Con mucha frecuencia, los programas de mejoramiento de especies animales o vegetales, ya sean convencionales o asistidos por marcadores moleculares, recurren al estudio de la variabilidad genética existente dentro de la especie estudiada para identificar los individuos que puedan ser empleados como donadores de genes valiosos para la variedad que se desea desarrollar.

Una de las herramientas más utilizada para la exploración de la variabilidad de las especies es el análisis mediante enzimas de restricción, proteínas catalíticas que tienen la capacidad de reconocer una secuencia de nucleótidos específica dentro de un segmento de DNA y generar cortes en dicha molécula. Existen tres tipos de enzimas de restricción: las pertenecientes a los tipos I y III producen cortes en la cadena de DNA a cierta distancia del punto de reconocimiento y además pueden modificarla químicamente mediante la adición de un grupo metilo (fenómeno conocido como metilación); las enzimas del tipo I cortan al azar y lejos del sitio de reconocimiento (aproximadamente a 1000 nucleótidos), mientras que las del tipo III lo hacen a 25-27 pares de bases del mismo. Por su parte, las enzimas del tipo II generan el corte

dentro de la secuencia de reconocimiento o muy cerca de ella. El resultado de la acción de estas enzimas (en particular las del tipo II) sobre una molécula de DNA es una serie de fragmentos de diversos tamaños denominados “fragmentos de restricción”, que al ser comparados en términos de su presencia o ausencia, o de su tamaño molecular, tienen el poder de revelar diferencias en la distribución y frecuencia de los sitios de corte para enzimas de restricción entre genomas diferentes (Goldstein, Krebs, & Kilpatrick, 2012).

La representación física de la manera como se distribuyen los sitios de restricción existentes en un genoma se conoce como “mapa de restricción”. Por mucho tiempo, estos mapas se han empleado como punto de partida para el análisis de las relaciones filogenéticas entre los individuos, puesto que los sitios de corte se pueden emplear como marcadores moleculares. Aspectos como la presencia de un sitio de restricción determinado o la distancia (en términos de nucleótidos) entre dos de estos sitios son el reflejo de diferencias genéticas que, a su vez, implican procesos de cambio evolutivo diferentes entre individuos estudiados (Poland, Brown, Sorrells, & Jannink, 2012).

Durante las últimas dos décadas, las especies frutales consideradas endémicas de la región andina tales como el lulo, la uchuva y el tomate de árbol han cobrado gran importancia social y económica para los países del norte de Suramérica dado su potencial como productos de exportación (Heiser, 1985). Estas tres especies se encuentran entre los diez primeros productos frutícolas colombianos de exportación a los mercados de

Europa y Norteamérica (Agronet, 2014). La creciente demanda de los mercados por frutas con mejores características organolépticas requiere del desarrollo de variedades más productivas y mejor adaptadas a su ambiente y de la implementación de nuevas estrategias tecnológicas para su aprovechamiento industrial. El conocimiento de la naturaleza genética y fisiológica de estas plantas es un requisito fundamental para el logro de los objetivos antes referidos. Los trabajos de genética realizados recientemente por Pulido y Núñez (2009, 2010) revelaron la presencia de un gen *ppo* en lulo (*Solanum quitoense* Lam.). Sin embargo, el grado de cercanía filogenética entre este nuevo gen y sus homólogos existentes en otras especies relacionadas no ha sido analizado en detalle.

En este trabajo se identificaron los sitios de corte para enzimas de restricción presentes en los genes *ppo* de papa, tomate, lulo, tabaco, manzana, batata, haba y durazno, se elaboraron los mapas de restricción para los genes de las tres primeras especies y se estableció una comparación entre ellos respecto de la localización y número de los sitios de corte.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Secuencia nucleotídica del gen *ppo* de lulo:** La secuencia del gen *ppo* de lulo empleada para el análisis comparativo fue determinada previamente por los autores (Pulido y Núñez, 2009; Pulido y Núñez, 2010) y registrada en GenBank bajo el código de acceso FJ573257.

**Secuencia nucleotídica de genes *ppo* de otras especies:** Las secuencias de los

genes *ppo* de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), manzana (*Malus domestica* (Borkh.) Likhonos), batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), haba (*Vicia faba* L.), durazno (*Prunus persica* (L.) Stokes) y papa (*Solanum tuberosum* L.) se obtuvieron de GenBank.

### Localización de sitios de corte para enzimas de restricción en los genes *ppo*:

La presencia/ausencia y la ubicación de los sitios de corte para enzimas de restricción en los genes *ppo* de papa, tomate, tabaco, batata, haba, durazno, manzana y lulo se determinó mediante el análisis de las respectivas secuencias nucleotídicas con el programa Webcutter 2.0.

**Análisis comparativo de los mapas de restricción de los genes *ppo*:** Con el fin de determinar el nivel de coincidencia en términos de localización y número de sitios de corte para enzimas de restricción en los genes *ppo* de lulo, papa (alelos A y B) y tomate (alelos E y F) se construyeron mapas de restricción utilizando el programa NEBcutter versión 2.0 (Vincze, *et al.*, 2003).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las secuencias de los genes *ppo* de tomate, papa, tabaco, batata, haba, durazno, manzana y lulo se analizaron para determinar la presencia de sitios de corte para enzimas de restricción comunes a todas ellas (tabla 1). Se identificaron cincuenta enzimas que cortan (al menos en un sitio) a todos los genes *ppo* analizados; nueve que cortan a todos los genes *ppo* de las solanáceas consideradas en el es-

tudio; dos que cortan a todos los genes *ppo* de las solanáceas excepto al gen de lulo; veintiuna que cortan a todos los genes analizados excepto al gen de haba; trece que cortan a los genes *ppo* de las solanáceas excepto al gen de lulo, a los genes E y F de tomate, A y B de papa y al presente en tabaco; cinco que cortan solamente al gen *ppo* de lulo, a los genes E y F de tomate y al gen POT32 de papa; tres que cortan a todos los genes *ppo* analizados excepto al gen de lulo; nueve que cortan a todos los genes *ppo* de solanáceas excepto al gen de lulo y al gen D de tomate; dos que cortan a todos los genes analizados excepto al gen de lulo y a los genes B de tomate y *ppo* 1 de batata; y finalmente seis que cortan a todos los genes analizados excepto al gen de lulo, a los genes *ppo* A y B de papa y al gen de haba.

Con el fin de determinar el nivel de similitud entre los genes *ppo* A y B de papa, E y F de tomate y el encontrado en lulo, a continuación se presentan los resultados de la comparación de los mapas de restricción elaborados para cada caso. El análisis se limitó a los genes antes mencionados puesto que el nivel de similitud genética entre estas tres especies es sustancialmente mayor al que existe entre cualquiera de ellas y las demás especies consideradas en el estudio. Hay dos sitios de corte muy bien conservados y un tercero parcialmente conservado para la enzima BsaJI. El primero se encuentra entre los nucleótidos 90-140 de los genes *ppo* E y F de tomate, A y B de papa y el gen *ppo* de lulo. En este último, el sitio de corte está aproximadamente 50 nucleótidos más cerca al extremo 3' de la secuencia codificante. El segundo

sitio de corte está entre las posiciones 980-1280 de los mismos; la secuencia de corte más próxima al inicio de la región codificante está en lulo. El tercero se localiza entre las posiciones 1060-1350 de los genes A y B de papa y el gen de lulo, exclusivamente. Este es uno de los casos en los que los sitios de corte para la enzima están más distanciados entre sí: en los genes de papa los sitios están 300 nucleótidos más lejos del extremo 5' del gen que en el caso de lulo.

En los cinco genes estudiados hay dos sitios de corte muy bien conservados para la enzima BtgI. El primero está en la región comprendida entre los nucleótidos 90-140: mientras que en los genes de papa y tomate la secuencia de corte está alrededor de las posiciones 90-120, en el gen de lulo se ubica en la posición 140. El segundo se encuentra entre las posiciones 1260-1280; en el gen de lulo el sitio está en la posición 990, alrededor de 270 nucleótidos más cerca del inicio del gen. Entre los nucleótidos 940-980 hay un sitio de corte para la enzima ScrFI. Tal como en el caso anterior, sólo el gen de lulo muestra el sitio de corte en la posición 670. Para la enzima Apol hay un sitio de corte entre los nucleótidos 1160-1180; el gen de lulo lo presenta en la posición 880. En el caso de la enzima Styl el sitio mejor conservado está en la posición 980 de lulo y entre las posiciones 1260-1270 de los otros cuatro genes.

Los genes A y B de papa y el gen de lulo comparten un segundo sitio que está entre los nucleótidos 1060-1350; como en los casos anteriores, el gen de lulo muestra el punto de corte para la enzima aproximadamente 300 nucleótidos más

Enzima	Genes que corta
<i>AcI</i> , <i>AcMI</i> , <i>AfaI</i> , <i>AluI</i> , <i>AluI</i> , <i>BsaJI</i> , <i>Bsc4I</i> , <i>BseDI</i> , <i>BsYI</i> , <i>BsII</i> , <i>Bsp143I</i> , <i>BssT1I</i> , <i>BstDEI</i> , <i>Cac8I</i> , <i>Csp6I</i> , <i>CviJI</i> , <i>DdeI</i> , <i>DpnI</i> , <i>DpnII</i> , <i>Eco130I</i> , <i>EcoT14I</i> , <i>ErhI</i> , <i>HinfI</i> , <i>HphI</i> , <i>Hsp92II</i> , <i>Kzo9I</i> , <i>Maell</i> , <i>MaellI</i> , <i>Mbol</i> , <i>MbolI</i> , <i>MnlI</i> , <i>MseI</i> , <i>MspR9I</i> , <i>Mwol</i> , <i>NdeII</i> , <i>NlaIII</i> , <i>NlaIV</i> , <i>PspN4I</i> , <i>RsaI</i> , <i>Sau3AI</i> , <i>ScrFI</i> , <i>Sse9I</i> , <i>StyI</i> , <i>TaqI</i> , <i>Tru1I</i> , <i>Tru9I</i> , <i>Tsp45I</i> , <i>Tsp509I</i> , <i>TspEI</i> , <i>TthHB8I</i> .	Todos los genes analizados.
<i>AcSI</i> , <i>ApoI</i> , <i>BfaI</i> , <i>Bsp19I</i> , <i>BstDSI</i> , <i>DsaI</i> , <i>MaeI</i> , <i>NcoI</i> , <i>SfaNI</i> .	Todos los genes de las solanáceas.
<i>BsrDI</i> , <i>FauI</i> .	Todos los genes de las solanáceas excepto el de lulo.
<i>AspS9I</i> , <i>AsuI</i> , <i>Avall</i> , <i>Bme18I</i> , <i>Bse1I</i> , <i>BseNI</i> , <i>BseRI</i> , <i>BsSI</i> , <i>Bsrl</i> , <i>BsrSI</i> , <i>BstF5I</i> , <i>Cfr13I</i> , <i>Eco47I</i> , <i>FokI</i> , <i>HapII</i> , <i>HgiEI</i> , <i>HpaII</i> , <i>MslI</i> , <i>MspI</i> , <i>Sau96I</i> , <i>SinI</i> .	Todos los genes analizados excepto haba.
<i>AccB7I</i> , <i>AccII</i> , <i>BsaAI</i> , <i>BsaMI</i> , <i>Bsml</i> .	Dentro del grupo de solanáceas cortan solamente a lulo, tomate (E y F) y papa (POT 32).
<i>AccB1I</i> , <i>AflIII</i> , <i>Ama87I</i> , <i>AvaI</i> , <i>BanI</i> , <i>BcoI</i> , <i>BshNI</i> , <i>BsoBI</i> , <i>BspLU11I</i> , <i>Eco64I</i> , <i>Eco88I</i> , <i>MspA1I</i> , <i>NspBII</i> .	Todos los genes de solanáceas excepto lulo, tomate (E y F), papa (A y B) y tabaco.
<i>BsoFI</i> , <i>Fsp4HI</i> , <i>ItaI</i> .	Todos los genes analizados excepto lulo.
<i>BanIII</i> , <i>Bscl</i> , <i>BseCI</i> , <i>Bsp106I</i> , <i>BspDI</i> , <i>BspXI</i> , <i>Bsu15I</i> , <i>Clal</i> , <i>HindIII</i> .	Todos los genes de solanáceas excepto lulo y tomate D.
<i>BbvI</i> , <i>Bst71I</i> .	Todos los genes analizados excepto lulo, tomate B y batata 1.
<i>AspLEI</i> , <i>CfoI</i> , <i>HhaI</i> , <i>Hin6I</i> , <i>HinP1I</i> , <i>HspAI</i> .	Todo los genes analizados excepto lulo, papa A y B y haba.

**Tabla 1.** Enzimas de restricción que cortan a los genes *ppo* de papa, tomate, tabaco, lulo, manzana, batata, haba y durazno.

cerca de la región 5´ que los otros dos genes. La secuencia de reconocimiento de *NcoI* está en la posición 980 del gen

de lulo y entre las posiciones 1260-1270 de los otros cuatro genes. Finalmente, el sitio de corte para la enzima *NlaIV*

está en la posición 1410 del gen de lulo y entre los nucleótidos 1680-1700 de los genes de tomate y papa.

La diferencia en la longitud de los genes estudiados es uno de los factores que determina las variaciones observadas en la ubicación de los sitios de restricción anteriormente referidos. Aunque aún no se conoce la secuencia nucleotídica de un fragmento de 330 nucleótidos correspondiente al extremo 5' del gen de lulo (Pulido y Núñez, 2009) y se presume que la longitud total del gen debe estar dentro del rango establecido para los genes *ppo* estudiados previamente en plantas (1700-2000 pares de bases),

las distancias entre los puntos de corte de los genes comparados probablemente se reducirían.

## CONCLUSIONES

El análisis comparativo de los mapas de restricción construidos revela minúsculas variaciones posicionales de los sitios de corte, consecuencia de las diferencias en los tamaños de los genes estudiados. De todos los sitios de corte que se pueden encontrar en los miembros de esta familia de genes, los correspondientes a las enzimas BsaJI, BtgI, ScrFI, Apol, Styl, NcoI y NlaIV son los que ponen de manifiesto la similitud entre el gen *ppo*

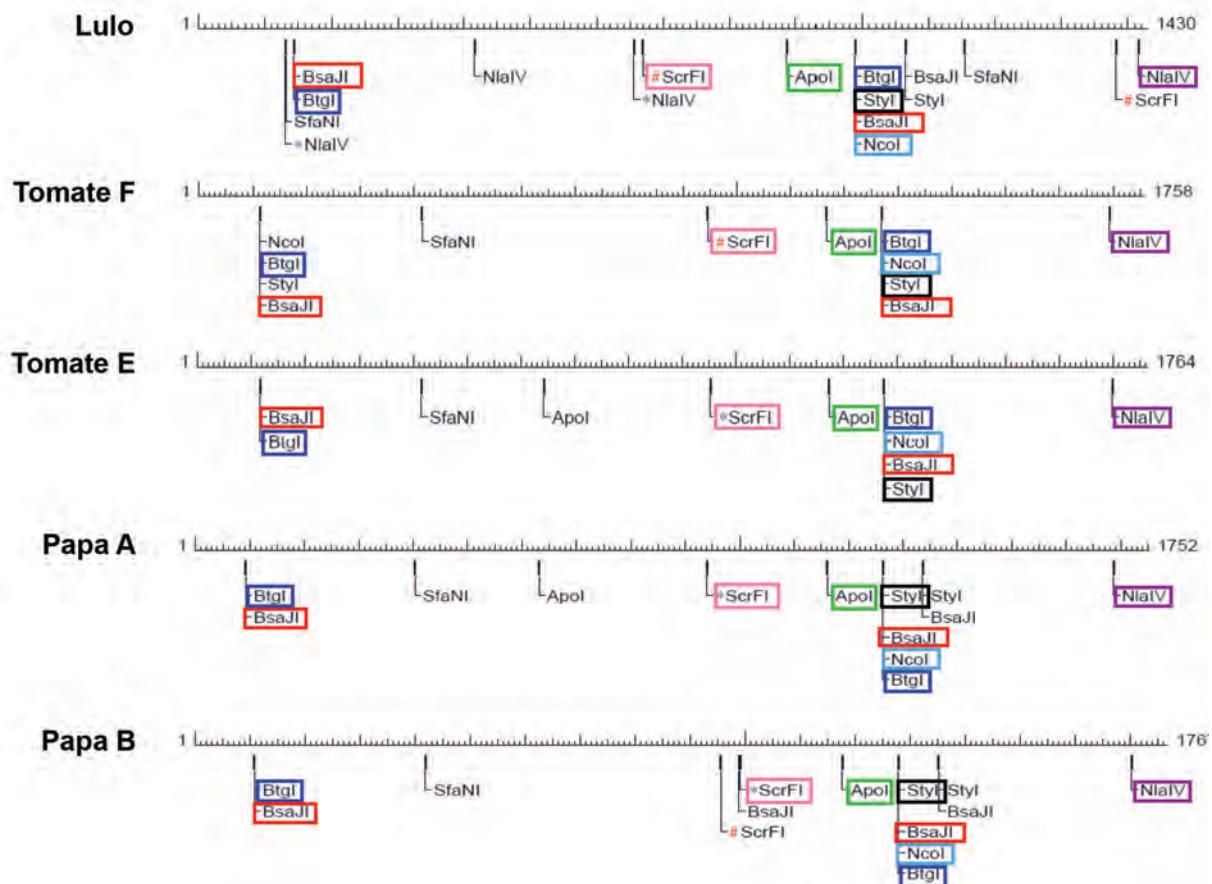


Figura 1. Mapa de restricción de los genes *ppo* de lulo, tomate (alelos E y F) y papa (alelos A y B).

de lulo y los genes *ppo* de papa (alelos A y B) y tomate (alelos E y F) analizados. Adicionalmente, los mapas revelan que, dentro de la familia génica, los sitios de corte ubicados sobre la región 3' se encuentran mucho mejor conservados que los observados en el extremo 5' de la secuencia. El nivel de coincidencia en términos de localización y número de sitios de corte para enzimas entre los genes *ppo* de lulo, papa (alelos A y B) y tomate (alelos E y F) se constituye en nueva evidencia de la estrecha relación filogenética entre los genes mencionados.

riability within lentil (*Lens culinaris* Medik.) and across related legumes using a newly developed set of microsatellite markers. *Molecular and Biological Reports* 41, 5607-5625.

Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J. (2003). NEB-cutter. A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 31: 3688 - 3691.

## LISTA DE REFERENCIAS

Agronet. (2014, Agosto 19). Exportaciones del sector agropecuario por cadena. Recuperado de la página web de Agronet:

[http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte79\\_2011.aspx?cod=79](http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/ReportesAjax/parametros/reporte79_2011.aspx?cod=79)

Heiser, C.B. (1985). Ethnobotany of the Naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. *Economical Botany*, 39, 4-11.

Goldstein, E.S., Krebs, J.E., & Kilpatrick, S.T. (2012). Lewin's Genes XI. Oxford University Press. New York - USA. Páginas 129-134.

Poland, J.A., Brown, P.J., Sorrells, M.E., & Janink, J.L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS One*, 7(2):e32253. doi:10.1371/journal.pone.0032253.

Pulido, M., & Núñez, V.M. (2009). Aislamiento y caracterización molecular de un fragmento de DNA genómico correspondiente a un gen que codifica para una polifenol oxidasa (PPO) en lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *El Astrolabio*, 8(1), 20-29.

Pulido, M., & Núñez, V.M. (2010). Aislamiento y secuenciación de un fragmento de DNA genómico correspondiente a la región 3' de un candidato a gen *ppo* de lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *El Astrolabio*, 9(1), 17-27.

Verma, P., Sharma, T.R., Srivastava, P.S., Abdin, M.Z., & Bhatia, S. (2014). Exploring genetic va-