

Códigos de barra genéticos en especies arbóreas del bosque seco de la Costa Caribe colombiana
Genetic barcodes in dry forest tree species of the Caribbean coast

Giovanna Rodríguez C, Katherine Escorcía L, Yani Aranguren D.

Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas
Programa de Microbiología, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla.

Introducción. Los bosques secos tropicales, cubren grandes áreas en Centro y Suramérica. Este ecosistema se caracteriza por presentar estaciones prolongadas de sequía, con bajas precipitaciones, dando como resultado una biodiversidad característica de plantas, animales y microorganismos adaptados a condiciones de estrés hídrico. Inicialmente en Colombia los BST ocupaban unos 9 millones de hectáreas; sin embargo, solo se conserva el 8%. El objetivo de este trabajo es determinar el código de barras genéticos de dos especies arbóreas del BST del Caribe colombiano. **Materiales y Métodos.** Se determinó mediante revisión bibliográfica las especies prioritarias para la conservación en la región. Luego, se realizaron colectas en diferentes poblaciones de *Pseudobombax septenatum* y *Aspidosperma polyneuron*. A partir del material vegetal se hicieron extracciones de DNA y PCRs de marcadores genéticos. Luego se seleccionaron los marcadores con mejor rendimiento y calidad, y se secuenciaron por método Sanger. Finalmente, se realizó un análisis bioinformático con las secuencias obtenidas y se construyó el código de barras. **Resultados.** Se estandarizó el protocolo de extracción y se ajustaron las condiciones de reacción de PCR para cada marcador. Los mejores marcadores fueron *rbcl*, *psbB-psbF* y *rpl20r-rp12f*. Se obtuvieron secuencias informativas y código de barras del gen marcador *rbcl* para *P. septenatum*. **Conclusión.** El BST está ampliamente distribuido en el departamento del Atlántico, pero ha sido notablemente destruido. Los códigos de barra de especies, permiten identificar y monitorear las poblaciones con fines de conservación, y facilitan el estudio de las relaciones ecológicas y el desarrollo de productos y servicios.

Palabras clave: biodiversidad, marcadores moleculares, PCR.

Abstract

Introduction. Tropical dry forests cover large areas in Central and South America. This ecosystem is characterized by prolonged drought seasons, with low rainfall, resulting in a characteristic biodiversity of plants, animals and microorganisms adapted to water stress conditions. Initially in Colombia the BST occupied about 9 million hectares; however, only 8% is retained. The objective of this work is to determine the genetic bar code of two tree species of the Colombian Caribbean BST. **Materials and methods.** Priority conservation species in the region were determined by literature review. Then, collections were made in different populations of *Pseudobombax septenatum* and *Aspidosperma polyneuron*. From the plant material DNA extractions and PCRs of genetic markers were made. The markers with better performance and quality were then selected and sequenced by the Sanger method. Finally, a bioinformatic analysis was performed with the sequences obtained and the bar code was constructed. **Results.** The extraction protocol was standardized and the PCR reaction conditions were adjusted for each marker. The best markers were *rbcl*, *psbB-psbF* and *rpl20r-rp12f*. Informational

sequences and barcode were obtained from the *rbcl* marker gene for *P. septenatum*. **Conclusion.** The BST is widely distributed in the department of the Atlantic; it has been remarkably destroyed. The species bar codes allow the identification and monitoring of populations for conservation purposes and it facilitate the study of ecological relationships and the development of products and services.

Key words: biodiversity, molecular markers, PCR.

Introducción

Los bosques secos tropicales (BST) cubren grandes áreas en Sur América, África y Asia, se encuentran en zonas bajas y cálidas, pero también pueden encontrarse en grandes altitudes (1). Este ecosistema se caracteriza por tener estaciones prolongadas de sequía donde la radiación solar es intensa y constante; asimismo tiene pocos meses de precipitaciones y poca humedad, que trae consigo comunidades características de animales, plantas y microorganismos adaptados a un estrés hídrico (1). La biodiversidad única que se han adaptado a condiciones climáticas de estrés hídrico, presenta altos niveles de endemismo. Es decir, poseen especies que no se dan en ningún otro lugar (2). Este ecosistema tiene gran importancia ya que numerosas especies proveen materias primas para la manufactura, alimentación y producción de medicamentos, estimándose que el 25% de las plantas estudiadas del BST tienen propiedades farmacéuticas; también aporta una gran cantidad de servicios ecosistémicos, como el proteger los cursos de agua, y la captura de carbono atmosférico (3).

Las poblaciones humanas vienen haciendo uso excesivo de estos recursos naturales lo que constituye una amenaza si se hace desmesuradamente (4). Esto ocurre porque los pobladores del BST que se benefician de las plantas ya que no tienen conocimientos de las prácticas adecuadas para el buen manejo de estos recursos. Un ejemplo resaltante es la explotación de árboles de madera fina típicos de este ecosistema, ya que desde tiempos ancestrales vienen siendo talados con fines de construcción para elaborar puertas, ventanas, artesanías y hasta obtención de combustibles, a partir de procesos como la quema de bosque para la producción de carbón vegetal entre otros (5). Inicialmente en Colombia existían 9 millones de hectáreas de BST, pero actualmente solo existe el 8% distribuido principalmente en propiedades privadas por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas SINAP (6). Los BST son una prioridad de conservación mundial debido a sus numerosas especies endémicas, y al hecho de que ha perdido más del 95% de su extensión original, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO (7).

La diversidad genética aumenta la capacidad adaptativa a los cambios que puedan ocurrir en el medio ambiente; una especie con una variabilidad genética baja será más vulnerable ante los cambios que se producen en el ecosistema (8). Tomando en cuenta esto, se pueden utilizar herramientas como los marcadores moleculares, que permiten caracterizar las poblaciones tanto silvestres como domesticadas con el fin de evaluar los niveles de diversidad genética y mantener poblaciones de especies vulnerables estimando el nivel de fragilidad de las especies y su ecosistema (9). Además, permiten proponer métodos para rescatar, mantener y conservar los ecosistemas (1).

El genoma del cloroplasto está altamente conservado entre plantas y algas superiores, y es fundamental para estos organismos ya que posee la información genética que codifica para tRNAs, rRNAs y un conjunto de componentes proteicos como la maquinaria transcripcional, traslacional y fotosintética (10). En estudios de sistemática molecular, filogenia y genética de la conservación, suelen usarse algunas regiones génicas e intergénicas de este genoma. Dos de estos marcadores génicos son la subunidad grande de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*rbcL*) y la maturasa K (*matK*), que actualmente son las secuencias recomendadas como posibles loci de códigos de barra para plantas por el organismo internacional del Grupo de Trabajo de Plantas (PWG) del Consorcio para el Código de barras de la vida (CBOL) (11). Para marcadores intergénicos se utilizaron *psbB-psbF* y *rpl20-rps12*. Estos son espaciadores intergénicos, lo que significa que es un espacio entre la parte codificante del gen; haciéndolo atractivo como marcador, debido a que es una región no codificante conservada con baja presión evolutiva, otorgándole un amplio grado de variación (12). Adicionalmente, con estos marcadores se pueden construir códigos de barras genéticos que nos ayudan en el monitoreo poblacional entre individuos de una especie para así facilitar el seguimiento de las especies vulnerables y en los estudios de variabilidad genética y evaluar los factores que influyen en la vulnerabilidad de las especies (13).

Las especies *Pseudobombax septenatum* (familia Malvaceae) y *Aspidosperma polyneuron* (familia Apocynaceae), son especies nativas representativas del bosque seco en la región Caribe colombiana y que son vulnerables debido a la intensa explotación (14). Todo esto establece la necesidad de evaluar y caracterizar a nivel genético, las especies y zonas que aún se mantienen con el objeto de preservar su integridad genética y poder desarrollar estrategias que permitan su conservación. En virtud de lo anterior, el objetivo de este trabajo es determinar códigos de barra genéticos en *P. septenatum* y *A. polyneuron* del bosque seco tropical en la costa Caribe colombiana.

Materiales y métodos

La presente investigación es de tipo prospectivo, descriptivo de corte transversal, y fue desarrollada en el laboratorio de investigación en Microbiología de la Universidad Simón Bolívar, Barranquilla- Colombia.

Evaluación de especies vulnerables

Se realizó la exploración a través de las bases de datos y publicaciones sobre las especies vulnerables de los BST del Caribe colombiano. Se escogieron dos especies: *P. septenatum* y *A. polyneuron*, debido a que estas son especies emblemáticas en la región, se encuentran en riesgo y tienen una gran importancia en el ecosistema, además de que son utilizadas por las comunidades para diferentes aplicaciones.

Colecta

Se colectaron cinco individuos de cada especie, ubicados en áreas diferentes del departamento del Atlántico. Las muestras de *P. septenatum* fueron recolectadas en los municipios de Baranoa, Barranquilla, y Puerto Colombia. Y las muestras de *A. polyneuron* fueron recolectadas en 3 fincas diferentes de San Juan de Tocagua, Luruaco, Atlántico. Para ello, se escogieron hojas jóvenes de cada individuo en cada población, y se conservaron en sílica gel. Además, se tomó una muestra para herbario y adicional a

eso se hizo una descripción con referencia geográfica y registro fotográfico del área local de la colecta.

Extracción de ADN de plantas

Cada muestra fue apropiadamente rotulada antes de iniciar con su procesamiento en el laboratorio. Inicialmente los tejidos fueron limpiados celosamente y se hicieron las extracciones empleando el protocolo de extracción de DNA de Lodhi et al. (1990) (15). Para ello se pesaron 15 mg de tejido deshidratado. Seguidamente, en un mortero estéril se maceraron con buffer de lisis (EDTA 20mM, Tris 100mM, CTAB 2%, NaCl 14M, β -Mercaptoetanol 0,2%) y se incubó a 65 °C. Luego, se realizó una extracción orgánica con cloroformo: alcohol isoamílico 24:1. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaron con 2/3 V de isopropanol y finalmente se hicieron dos lavados con etanol 70%. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con el fin de verificar la calidad y pureza de las extracciones.

Estandarización de amplificación de marcadores moleculares

Inicialmente, se hizo una búsqueda de secuencias reportadas en GenBank de National Center for Biotechnology Information (NCBI), para verificar qué secuencias de marcadores moleculares se conocen para las especies estudiadas. Luego, se escogieron 3 muestras de cada especie y basándonos en sus respectivas electroforesis de ADN genómico donde las bandas evidenciaban el ADN de mayor calidad para así realizar las respectivas PCRs de cada marcador.

Se probaron los marcadores: *trnH-psbA*, *psbB-psbF*, *rpl20-rps12*, *rbcl*, *trnL-trnF*, *atrnl-atrnF*, *matK* y se optimizaron las reacciones para cada *primer* y especie. Las PCRs se realizaron con la Taq polimerasa PCR-100-2X, y se prepararon reacciones de 25ul (Master Mix 12,5ul, Primer F' 0,5 ul and Primer R' 0,5ul, DNA 1,5ul, H₂O 10ul). En las amplificaciones se utilizó el perfil térmico: 94°C x 2', 94°C x 30", 50-53°C x 30", 68°C x 45"-1'30", 68°C x 5', 4°C x ∞ (variando la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión a cada marcador). Los productos de PCRs fueron separados y visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con tampón TAE 1X (Tris 0,04M, ácido acético 0,02M, EDTA 0,001M) a 80 voltios, 300 amperios por 1h.

Selección de secuencias

A partir de la evaluación de marcadores de cloroplasto, así como la optimización de las reacciones de amplificación, se seleccionaron los marcadores más específicos, con mayor rendimiento y que no están reportados en las bases de datos. Estos productos de PCR fueron secuenciados por método Sanger a través de un servicio prestado por la empresa Macrogen, Corea del Sur.

Determinación de códigos de barra

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los reportes que se encuentran en el *GenBank*. Además, fueron analizadas, alineadas y editadas, con la ayuda de los softwares bioinformáticos *ClustalX* (16) y *BioEdit* (17). También, se construyeron *contigs*, para determinar secuencias consenso por marcador y especie. Luego se determinó el mejor modelo evolutivo y se hicieron análisis filogenéticos por métodos de

máxima verosimilitud y máxima parsimonia entre las secuencias obtenidas y secuencias de especies de la familia Malvaceae obtenidas de la base de datos del GenBank, y se calcularon las distancias intraespecíficas e interespecíficas empleando el programa *MEGA X* (18). Y Con estos análisis se determinó cuáles secuencias son más informativas para hacer análisis de ecología molecular, diversidad y códigos de barras para la conservación de especies del bosque seco.

A partir de esto se verificó y determinó las secuencias código de barras para cada especie. Finalmente, se construyó un gráfico de identidad y heterogeneidad dentro de las secuencias a través del programa *Fingerprint* (19).

Resultados

Extracción de ADN.

Para verificar la calidad del ADN obtenido luego del proceso de extracción y determinar su concentración, se procedió a correr las muestras suspendidas en tampón TAE 1X (Tris 0,04M, ácido acético 0,02M, EDTA 0,001M) junto con una escalera de peso molecular de 1kb, con el fin de determinar la eficiencia del método de extracción usado.

Se observaron bandas más intensas que otras, de alto peso molecular y con presencia de ARN en las muestras de *A. polyneuron* (Figura 1). Para *P. septenatum* se obtuvieron algunas bandas definidas, pero algo contaminadas con sales, ARN y proteínas. Cada banda mostró una intensidad diferente, por lo tanto, el rendimiento fue diferente en cada muestra, pero se logró obtener ADN integro (Figura 2).

Se escogieron 3 muestras para *P. septenatum* (*Pq15*, *Pq16*, *Pq18*) y 3 muestras para *A. polyneuron* (*Ap1b*, *Ap14*, *Ap15*). La extracción se hizo por duplicado a cada muestra.



Figura 1. Extracción de ADN genómico de *Aspidosperma polyneuron*. a) Ap1a, b) Ap1b, c) Ap21, d) App22, e) Ap3, f) Ap32 g) Ap4 h) Ap42, i) Ap5, j) Ap52, l) Escalera de 1kb.

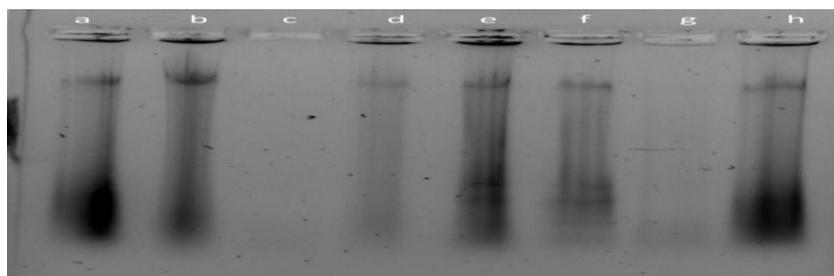


Figura 2. Extracción de ADN genómico de *Pseudobombax septenatum*. a) Pq14, b) Pq15, c) No se evidencio ADN, d) Pq16, e) Pq17, f) Pq18, g) Pq19, h) Pq20.

Estandarización de marcadores moleculares

Para seleccionar las mejores secuencias para códigos de barra, primero se hicieron pruebas con 6 marcadores, 2 génicos y 4 espaciadores intergénicos (Tabla 1), a los cuales se les realizó una estandarización para así poder optimizar cada PCR (Tabla 2).

Tabla 1. Generalidades de marcadores utilizados.

Marcador/Gen	Función	Peso molecular
<i>trnH-psbA</i>	Región intergénica o <i>spacer</i> (20, 21).	~444pb
<i>psbB-psbF</i>	Codifica para un citocromo de tipo B (22).	~790pb
<i>rpl20r-rp12f</i>	Se une directamente al ARN ribosómico 23S y es necesario para el proceso de ensamblaje <i>in vitro</i> de la subunidad ribosómica 50S (23).	~800-900pb
<i>trnL-trnF</i>	Consiste en el gen <i>trnL</i> , un intrón del grupo I y el espacio intergénico <i>trnL-F</i> (24).	~900-1100pb
<i>rbcl</i>	Cataliza dos reacciones: la carboxilación de 1,5-bisfosfato de D-ribulosa (25, 26).	~500-600pb
<i>matK</i>	Es esencial para el <i>empalme in vivo</i> de intrones del Grupo II (27).	~1500pb

Tabla 2. Estandarización de marcadores moleculares para su uso en la creación de código de barras genéticos en plantas.

Marcador/Gen	T °m; Tiempo de extensión	Amplificación (+/-)
<i>trnH-psbA</i>	49-53 °C; 30''	+
<i>psbB-psbF</i>	50 °C; 30''	+
<i>rpl20r-rp12f</i>	53 °C; 30''	+
<i>atrnl-atrnF</i>	50 °C; 30''	+
<i>rbcl</i>	50-51 °C; 30-60''	+
<i>matK</i>	50-57 °C; 1'	-

Se tuvieron que ajustar las temperaturas *melting* (T_m) porque los *primers* fueron diseñados en otras especies, de manera que son específicos para otras especies; sin embargo, por ser regiones conservadas deben estar presentes en todo el reino Plantae. Debido a esto, primero se estandarizó las T_m porque el mismo valor de los *primer* podrían generar amplificaciones inespecíficas, poca intensidad o simplemente no amplificar. Luego de la estandarización, se escogieron los marcadores donde se obtuvieron bandas únicas y con mayor intensidad a temperaturas 50-53°C. Estos marcadores fueron *rbcl*, *trnH-psbA*, *psbB-psbA*, *rpl20r-rp12f*. Se realizaron dos PCR para cada marcador con un volumen de reacción de 25µl, con el fin de obtener mayor contenido para secuenciar y verificar la correcta optimización del marcador. Se verificó la calidad e identidad por tamaño, *rpl20r-rp12f* con un tamaño aproximado de 800 a 900pb; *rbcl* con un tamaño aproximado de 600pb, *psbB-psbA* con tamaño aproximado de 700pb; (Figuras 3-5). El marcador *trnH-psbA* amplificó, pero evidenció fragmentos inespecíficos, por lo cual se descartó (Figura 6).

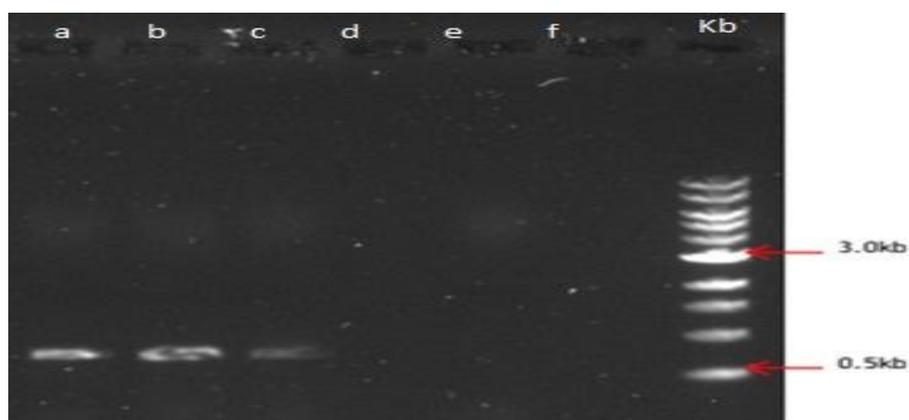


Figura 3. Productos de la amplificación de la región *rpl20r-rps12f* del cpDNA de la especie *Pseudobombax septenatum* en gel de agarosa al 0,8%. a) Pq15, b) Pq16, c) Pq18, escalera de 1kb.

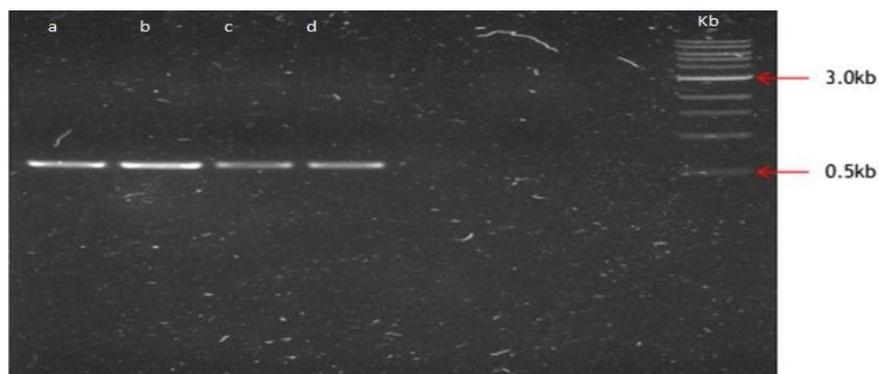


Figura 4. Productos de la amplificación por PCR de la región *rbcl* (700pb) del cpDNA de la especie *Pseudobombax septenatum* en gel de agarosa al 0,8%. a) C (+) b) Pq15, c) Pq16, d) Pq18, escalera de 1kb, escalera de 1kb.

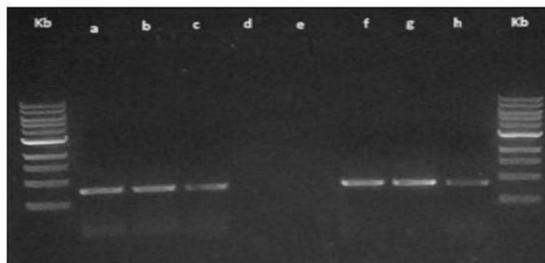


Figura 5. Marcadores moleculares *psbB-psbA* (a-c) y *rpl20r-rps12f* (f-h) amplificados en *Aspidosperma polyneuron*. Gel de agarosa al 0,8%. Escalera de 1kb, (a) y (f) Ap1b, (b) y (g) AP41, (c) y (h) Ap51.

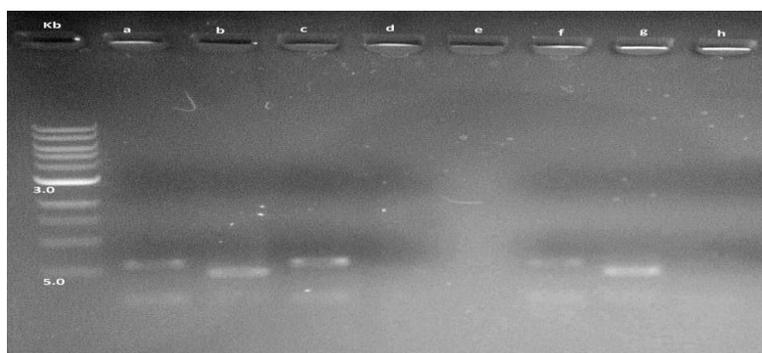


Figura 6. Productos de la amplificación por PCR de la región *trnH-psbA* del cpDNA de la especie *Aspidosperma polyneuron* en gel de agarosa al 0,8%. Escalera de 1kb; (a) Ap1b; (b) AP14; (c) Ap51.

Análisis filogenético y códigos de barra

Una vez obtenidas las secuencias fueron evaluadas y se determinó que solo un marcador es de calidad y suficientemente informativo para establecer un código de barras. Este es *rbcl* para la especie *P. septenatum*, cuyas secuencias en sentido y antisentido en los tres individuos fueron de calidad. En el caso de *rpl20-rps12* de *P. septenatum*, las secuencias obtenidas fueron de calidad, pero la extensión no fue completa para formar una secuencia consenso, y el código obtenido no lograba diferenciar la especie de otras malváceas, por tanto, la información no es suficiente para determinar un código de barras. En el caso de las secuencias *rpl20-rps12* y *psbB-psbF* de *A. polyneuron*, la calidad de la secuencia no fue buena, posiblemente por amplificaciones inespecíficas que no fueron separadas y detectadas en la electroforesis.

A partir de la secuencia de *rbcl* se construyeron *contigs* para cada muestra comenzando con la secuencia *forward* y *reverse*, y fue verificada por Blast (98% de identidad). Luego se realizó el análisis filogenético comparando la secuencia de los tres individuos con otras especies de la familia Malvaceae y se encontró que los individuos de la familia si conservan identidad dentro de la especie (Figura 7 y 8).

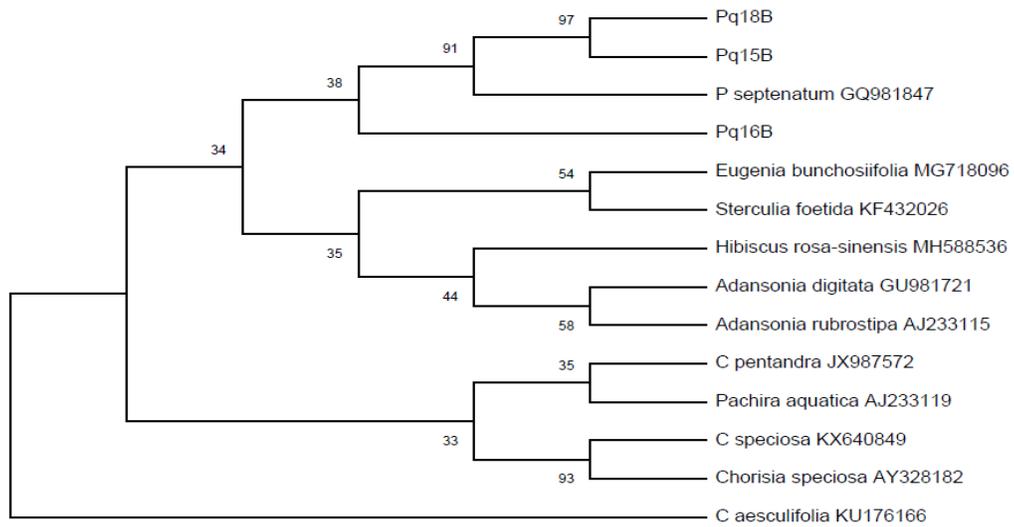


Figura 7. Relación filogenética de *Pseudobombax septenatum* con especies de plantas de la familia Malvaceae. La distancia evolutiva se dedujo empleando el método de Maxima Parsimonia a partir de secuencias de *rbcl*. Los números representan porcentajes de Bootstrap de 1000.

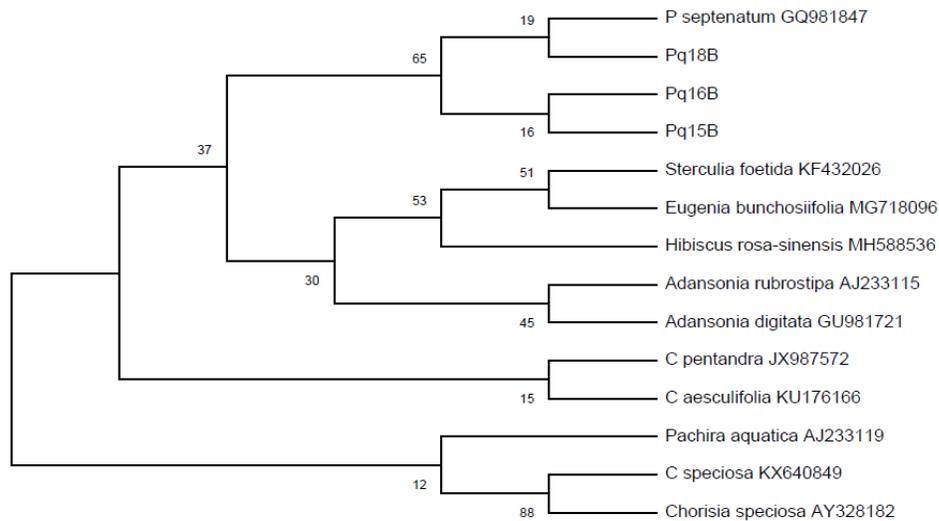


Figura 8. Relación filogenética de *Pseudobombax septenatum* con especies de plantas de la familia Malvaceae. La distancia evolutiva se dedujo empleando el método de Maxima Verosimilitud, y el modelo Kimura a partir de secuencias de *rbcl*. Los números representan porcentajes de Bootstrap de 1000.

El código de barras obtenido mediante el programa *Fingerprint* (Figura 9), ilustra de forma gráfica la composición de nucleótidos de la especie analizada que evidencia un alto porcentaje de adenina y timina en las secuencias, además de uniformidad de las

secuencias entre los 3 especímenes. El valor de la longitud de las barras en las secuencias fue de 0,00051 (Figura 9a).

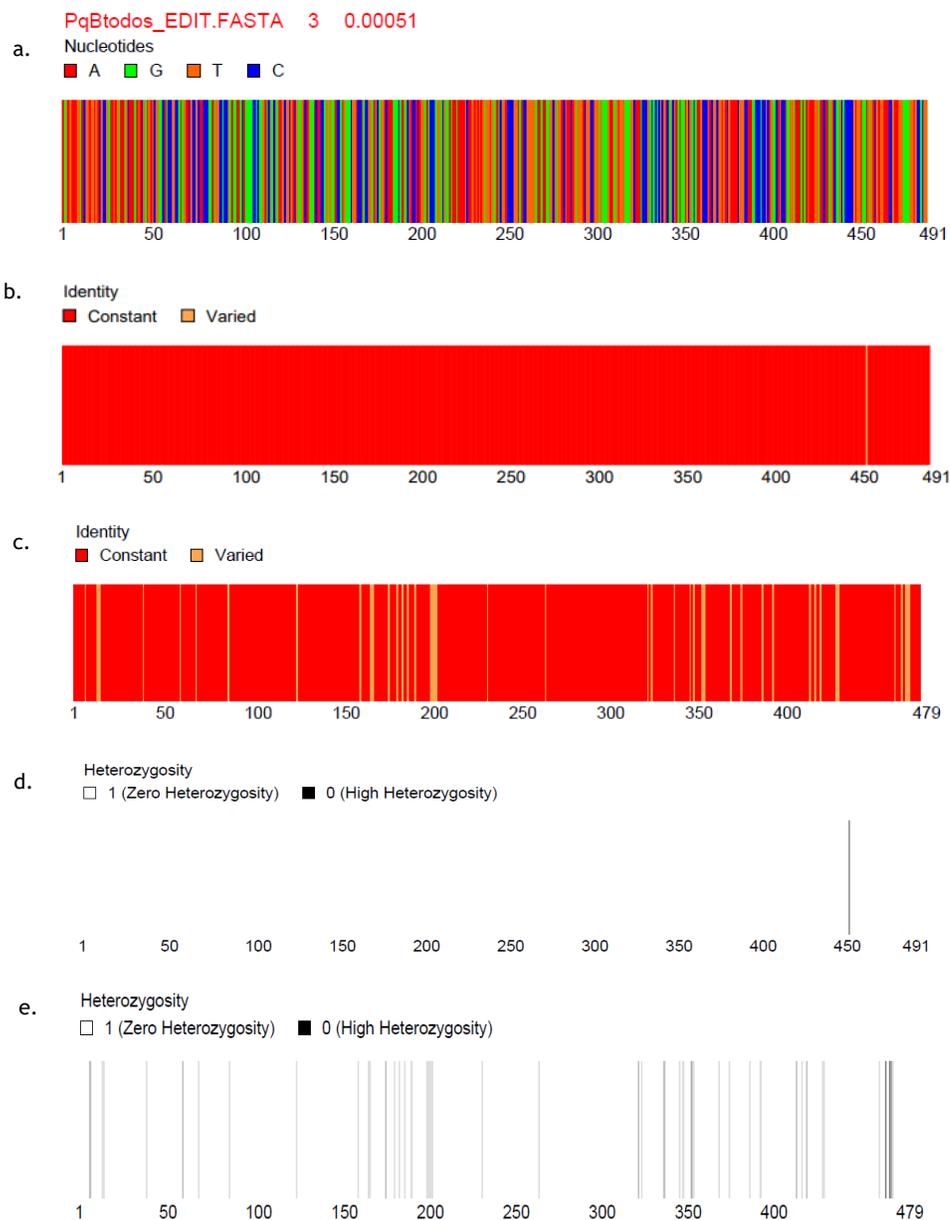


Figura 9. Identidad y heterogeneidad de la secuencia *rbcl* en *Pseudobombax septenatum*. (a) Código de barras; Identidad (b) intraespecífica y (c) entre especies de la familia Malvaceae; Heterocigosidad (d) intraespecífica y (e) interespecífica.

Discusión

Unos de los problemas que a menudo se encuentran durante la extracción es separar el ADN de los contaminantes que existen naturalmente en la célula de la planta, tales como polisacáridos y compuestos fenólicos, por lo tanto, es importante que las técnicas moleculares requieran el aislamiento de ADN genómico de pureza apropiada para la PCR, digestión enzimática y los posibles estudios a nivel genético (28).

El método de extracción de ADN basado en CTAB, es un protocolo que se ha empleado en diferentes especies de plantas donde las altas concentraciones de sales y la presencia de CTAB ayudan a la precipitación de los polisacáridos (14). Los polisacáridos son visualmente evidentes en extracciones de ADN por su textura viscosa como de goma y hacen al ADN no manejable en el pipeteo y no amplificable, por lo tanto, esta pudo ser una de las razones por la cual algunas muestras no se visualizaron en la electroforesis en gel de agarosa o se mostraron algo contaminadas con sales y ácidos nucleicos, debido a esto, se tuvo que hacer un segundo lavado después de hacer la extracción (29).

Es importante resaltar que las plantas son organismos muy diversificados, por lo cual, un marcador molecular no siempre es suficiente para su identificación, al menos dos secuencias ayudarían a hacer un el correcto análisis filogenético y construcción de código de barras (30). El Consorcio para el Código de barras de la vida (CBOL), recomienda los marcadores *rbcL* y *matK* (11). A su vez, los espaciadores intergénicos como *rpl20r-rp12f* y *psbB-psbA* resaltan las diferencias (polimorfismo) dentro de una secuencia nucleica entre diferentes individuos.

El análisis y edición de la secuencia obtenida fue a través de los softwares bioinformáticos *ClustalX* y *BioEdit* donde se tomó el *forward* y *reverse* de cada individuo para construir un *Counting* y obtener una secuencia más larga y estadísticamente más significativa porque se verifica que una es igual a la otra, así se realizó para cada individuo. La construcción de los arboles fue por medio del programa *MEGA X*, donde a partir de las secuencias se buscaron 13 secuencias de *rbcL* para Malvaceae (unas más cercanas y otras más distantes) y una de un grupo externo. Se alinearon y se construyeron árboles filogenéticos.

La secuencia que se obtuvo se diferencia de las otras especies y se demuestra al agruparse los tres especímenes en el mismo clado, además de que se agruparon con secuencia de *P. septenatum* de referencias del GenBank; y esto es validado por dos métodos filogenéticos, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud.

En la representación gráfica del código, el valor de la longitud de las barras de 0,00051 indica alta identidad entre individuos (Figura 9a). Debido a este grafico se puede verificar que dentro de la especie no hay variabilidad (Figura 9b) y entre especies si hay (Figura 9c). Además, entre especímenes hay solo un nucleótido variable con heterocigosidad media (Figura 9d) y entre especies hay varias regiones polimórficas. Así, dentro de las 3 secuencias de la misma especie en todas las posiciones, *rbcL* es igual excepto en un punto, es decir, se evidencia un SNP (polimorfismo de nucleótido simple), donde ese cambio de nucleótido puede hacer que se diferencie una población de otra, pero también al unir las tres secuencias con las del GenBank demuestra puntos variables, que podría ser empleado para hacer análisis de variabilidad poblacional. Evidenciándonos así, que la secuencia de *rbcL* se conserva dentro de las familias, pero con una variabilidad mayor dentro de la especie, por lo tanto, permite diferenciar a la secuencia del resto de las especies (31). Por ello, esta secuencia es un buen código de barras ya que permite ver identidad intraespecífica y diversidad interespecífica, y puede

ser empleada para evaluar relaciones de parentesco y ecología molecular de la familia Malvaceae.

Conclusión

La secuencia génica de la subunidad mayor de la ribulosa bifosfato (*rbcL*) puede ser empleada como código de barras genético de *Pseudobombax septenatum*, que podrá emplearse para hacer seguimiento y conservación de la especie, así como del bosque seco en la región Caribe. Sin embargo, el espaciador intergénico *rpl20r-rp12f* no posee suficiente información para ser empleado como secuencia identificadora de la especie. Por otro lado, al momento de determinar un código de barras para identificar especies es necesario que las amplificaciones del marcador genético sean muy específicas y limpias para obtener una secuencia de calidad.

Además, el estudio reveló que un código de barras genético basado en genes como *rbcL* es una buena herramienta para una correcta identificación de especies de plantas de la familia Malvaceae, debido a su buena calidad de secuencia, universalidad y altos niveles de discriminación entre especies. Sin embargo, el estudio taxonómico en plantas puede complementarse con características morfológicas y métodos moleculares, considerando diversos genes con el fin de obtener un respaldo vigoroso para los resultados.

Bibliografía

1. Pizano C, Hernando Garcia. El Bosque Seco Tropical [Internet]. 2014. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/265468424_Pizano_C_y_H_Garcia_Editores_2014_El_Bosque_Seco_Tropical_en_Colombia_Instituto_de_Investigacion_de_Recursos_Biologicos_Alexander_von_Humboldt_IAvH_Bogota_DC_Colombia
2. González-m R, Isaacs P. El bosque seco tropical en Colombia [Internet]. 2014. 1-29 p. Available from:
<http://www.humboldt.org.co/images/documentos/pdf/investigacion/gonzalez-m-et-al-2014-memoria-tecnica-verificacion.pdf>
3. Azul PP. EL FUTURO DEL BOSQUE SECO [Internet]. 2019. 1-11 p. Available from:
<https://www.imeditores.com/banocc/seco/cap7.htm>
4. Humboldt IA Von, Bosque E. El Bosque seco Tropical (Bs -T) en Colombia I . [Internet]. 2000. 1-24 p. Available from:
<http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/9333>
5. SIAC. No Title [Internet]. Bosque seco tropical de Colombia. 2014. Disponible en:
http://181.225.72.78/Portal-SIAC-web/faces/Dashboard/Biodiversidad2/eco_import_ambiental/bosqueSeco.xhtml
6. Mundo DEL, De ELE. Los bosques del mundo. 2018.
7. Profile SEE. La genética , los marcadores moleculares y la conservación de especies. 2014;(August).
8. Oliver TH, Heard MS, Isaac NJB, Roy DB, Procter D, Eigenbrod F, et al. Biodiversity and Resilience of Ecosystem Functions. Trends Ecol Evol [Internet]. 2015;xx(x):1-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2015.08.009>
9. Díaz YCA, Varani AM, Michael TP, Miranda VFO. Development of microsatellite

- markers for the carnivorous plant *Genlisea aurea* (Lentibulariaceae) using genomics data of NGS. Mol Biol Rep [Internet]. 2017;0(0):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-017-4140-1>
10. Rock CD, Barkan A, Taylor WC. The maize plastid *psbB-psbF-petB-petD* gene cluster: spliced and unspliced *petB* and *petD* RNAs encode alternative products. 1987;69-77.
 11. Plant C, Group W. A DNA barcode for land plants. 2009; 2009:1-4. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/106/31/12794.long>
 12. Systematics P, Khan IA, Azim K. Variations in intergenic spacer *rpl20- rps12* of mango (*Mangifera indica*) identification and phylogenetic analysis. 2011;(April).
 13. Ballou, J.D.; Frankham, R.; Biscoe DA. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, Brasil: Sociedade Brasileira de Genética; 2008. 26p.
 14. Editores NRS. Libro rojo de plantas de Colombia de Colombia.
 15. Lodhi M a., Ye G-N, Weeden NF, Reisch BI. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol Biol Report [Internet]. 1994 Mar;12(1):6-13. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF02668658>
 16. Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. In: Current Protocols in Bioinformatics [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2002. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471250953.bi0203s00>
 17. HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser. 41:95-8.
 18. Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform [Internet]. 2008 Mar 27;9(4):299-306. Disponible en: <https://academic.oup.com/bib/article-lookup/doi/10.1093/bib/bbn017>
 19. LOU, M. y GOLDING, GB (2007). Huella digital: representación visual de la variación en alineaciones de secuencias múltiples. Molecular Ecology Notes, 7 (6), 908-914. doi: 10.1111 / j.1471-8286.2007. 01904.x
 20. Tate JA, Simpson BB. Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and Diverse Origins of the Polyploid Species Paraphyly of Tarasa (Malvaceae) and Diverse Origins of the. 2003;28(4):723-37.
 21. Aeoniceae PAP, Ang TAOS, Rawford DAJC. EVOLUTION , AND BIOGEOGRAPHY OF. 1997;84(9):1120-36.
 22. Federal U, Gerais DM. Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of Petunia (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. 2006;4487-97.
 23. Taberlet P, Coissac E, Gielly L, Miquel C, Brochmann C, Valentini A, et al. Power and limitations of the chloroplast trn L (UAA) intron for plant DNA barcoding. 2007;35(3).
 24. Kress WJ, Erickson DL. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants : The Coding rbcL Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. 2007;(6).
 25. Costion C, Ford A, Cross H, Crayn D, Harrington M, Lowe A. Plant DNA Barcodes Can Accurately Estimate Species Richness in Poorly Known Floras. 2011;6(11).

26. Ferri, G., Corradini, B., Ferrari, F., Santunione, A. L., Palazzoli, F., & Alu', M. (2015). Forensic botany II, DNA barcode for land plants: Which markers after the international agreement? *Forensic Science International: Genetics*, 15, 131-136. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.10.005
27. Pandey RN, Adams RP, Flournoy LE. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by Plant Polysaccharides. 1996;14(1):17-8.
28. Cerda-granados DA. ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. 2014;(May).
29. Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. 2009;19-35.
30. Revision bibliografica uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del tropico 1 . 2006;17(2).
31. Maloukh L, Kumarappan A, Jarrar M. Discriminatory power of *rbcL* barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. 3 *Biotech*. 2017;7(2):1-7.