

Códigos de barra genéticos en especies arbóreas del bosque seco tropical de la Costa Caribe colombiana

Escorcia Lindo Katherine Paola
Rodríguez Cuesta Giovanna María

Trabajo de Investigación como requisito para optar el título de Microbiólogo

RESUMEN

Antecedentes. Los bosques secos tropicales (BST) cubren grandes áreas en Centro y Suramérica. Se encuentran mayoritariamente en zonas bajas y cálidas, pero también se pueden encontrar en grandes altitudes. En estos bosques las épocas secas se prolongan durante varios meses del año, en los cuales la radiación solar es elevada. Las lluvias se presentan durante temporadas cortas, es decir; que en estas zonas geográficas hay baja humedad y baja precipitación dando como resultado una biodiversidad característica y única 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 existe el 8% de ellas, ya que estos se han explotado para uso urbano y agropecuario por ser suelos fértiles. El abuso de estos factores produce deforestación y desertificación, lo más alarmante es que tan solo el 5% de esa área está protegido por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SINAP), fincas y propiedades privadas. Por otro lado, los marcadores moleculares son regiones del DNA cuyas similitudes o disimilitudes permiten identificar y caracterizar polimorfismos entre individuos, poblaciones o especies. Asimismo, los códigos de barras genéticos son secuencias específicas característica de una especie que permite su identificación taxonómica rápida para facilitar la conservación, el conocimiento y un uso sustentable a la biodiversidad. **Objetivo.** El objetivo de este trabajo es determinar el código de barras genéticos de dos especies arbóreas del BST del Caribe colombiano. **Metodología.** 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 los marcadores genéticos: *trnH-psbA*, *psbB-psbF*, *rpl20-rps12*, *rbcL*, *trnL-trnF*, *atrnL-atrnF*, *matK*. Luego se seleccionaron los marcadores con mejor rendimiento y calidad, y se secuenciaron por método Sanger. Finalmente, se realizarán los análisis bioinformáticos para analizar las similitudes entre individuos y determinar el código de barras de la especie y establecer cuáles marcadores permiten hacer estudios poblacionales. También, se realizó carácter informativo de la importancia del BST y medidas para conservarlo. **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. El código de barras genético basado en *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. Además, de que nos permite 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

Background. Tropical dry forests (BST) cover large areas in Central and South America. They are found mostly in low and warm areas, but can also be found at high altitudes. In these forests, dry seasons last for several months of the year, in which solar radiation is high. Rains occur during short seasons, that is; that in these geographical areas there is low humidity and low rainfall resulting in a characteristic and unique biodiversity of plants, animals and microorganisms adapted to water stress conditions. Initially in Colombia the BST occupied about 9 million hectares; however, there is only 8% of them, since these have been exploited for urban and agricultural use because they are fertile soils. The abuse of these factors produces deforestation and desertification, the most alarming is that only 5% of that area is protected by the National System of Protected Areas (SINAP), farms and private properties. On the other hand, molecular markers are regions of DNA whose similarities or dissimilarities allow to identify and characterize polymorphisms between individuals, populations or species. Likewise, genetic barcodes are specific sequences characteristic of a species that allows its rapid taxonomic identification to facilitate conservation, knowledge and sustainable use of biodiversity. **Objective.** The objective of this work is to determine the genetic bar code of two tree species of the Colombian Caribbean BST. **Methodology.** Priority conservation species in the region were determined by literature review. Then, collections were made in different populations of *Pseudobombax septenatum* and *Aspidosperma polyneuron*. DNA and PCRs were extracted from the plant material from the genetic markers: *trnH-psbA*, *psbB-psbF*, *rpl20-rps12*, *rbcL*, *trnL-trnF*, *atrn-atrnF*, *matK*. The markers with better performance and quality were then selected and sequenced by the Sanger method. Finally, bioinformatics analyzes will be carried out to analyze the similarities between individuals and determine the bar code of the species and establish which markers allow population studies. Also, an informative character of the importance of the BST and measures to conserve it was made. **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, but has been remarkably destroyed. The genetic bar code based on *rbcL* is a good tool for the correct identification of plant species of the Malvaceae family, due to its good sequence quality, universality and high levels of discrimination between species. In addition, it allows us to monitor populations for conservation purposes, and facilitate the study of ecological relationships and the development of products and services.

Key words: biodiversity, molecular markers, PCR.

REFERENCIAS

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_D_C_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, Flourney 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 bibliofgrafica 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.