

Caracterización filogenética de *Carapa guianensis* en el bosque húmedo tropical de Colombia.

Laura Flórez Oviedo & Yani Aranguren Díaz

Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla,
Colombia.

laura.florez@unisimon.edu.co, yani.aranguren@unisimonbolivar.edu.co

Resumen.

Carapa Guianensis pertenece a la familia *Meliaceae*. Esta especie habita en los bosques húmedos de Colombia. La especie se destaca por poseer maderas de calidad, que han sido ampliamente explotadas por ser una de las más utilizadas en la construcción, decoración, entre otros; además, el aceite de las semillas se usa para hacer jabones y en el área cosmetológica. Tomando como problemática del estudio categorizar el estado de conservación en el que se encuentra *Carapa guianensis*. El objetivo principal del trabajo fue realizar un análisis filogenético de aislados de *Carapa guianensis*, teniendo en cuenta los marcadores moleculares como el gen cloroplastídial (*rbcL*), maturase K (*mtK*) y regiones espaciadoras intergénicas como *trnH-psbA* y *trnL-trnF*. Inicialmente se buscaron la secuencia de los marcadores seleccionados en la base de datos del GenBank del NCBI, se editaron y alinearán usando el programa BioEdit. Luego se construyeron dendrogramas empleando el programa MEGA X usando métodos de agrupamiento por distancia (Neighbour-Joining y UPGMA) y por filogenia (Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia). Finalmente, se estandarizaron los procedimientos de laboratorio que permitirán determinar el estado de conservación en el que se encuentra la especie.

Palabras Clave: método máxima verosimilitud, *mtK*, parsimonia, *rbcL*, secuencia de cloroplasto, *trnH-psbA*, *trnL-trnF*.

Phylogenetic characterization of *Carapa guianensis* in the tropical humid forest of Colombia.

Abstract.

Carapa guianensis belongs to the *Meliaceae* family. This species inhabits the humid forests of Colombia. The species stands out for its high quality wood, which has been widely exploited for being one of the most used in construction, decoration, among others; in addition, the oil from the seeds is used to make soaps and in the cosmetology area. The problem of the study was to categorize the conservation status of *Carapa guianensis*. The main objective of the work was to perform a phylogenetic analysis of *Carapa guianensis* isolates, taking into account molecular

markers such as the chloroplastic gene (*rbcl*), maturase K (*mtK*) and intergenic spacer regions such as *trnH-psbA* and *trnL-trnF*. Initially, the sequence of the selected markers was searched in the NCBI GenBank database, edited and aligned using the BioEdit program. Then, dendrograms were constructed using the MEGA X program using clustering methods by distance (Neighbour-Joining and UPGMA) and by phylogeny (Maximum Likelihood and Maximum Parsimony). Finally, laboratory procedures were standardized to determine the conservation status of the species.

Keywords: likelihood method, mtK, parsimony, chloroplast sequence, rbcl, trnH-psbA, trnL-trnF.

1. Introducción.

Los bosques húmedos tropicales son sin lugar a duda uno de los ecosistemas más diversos en cuanto a fauna y flora. Están dispersos a lo largo de todo el mundo, ocupando una superficie aproximada de más de 9 millones de Km²; en donde América del Sur tiene el área más extensa, en las cuencas del río Amazonas y alto Orinoco, con una extensión de 6 millones de Km² (Etter, 2014). En Colombia la extensión de bosque húmedo tropical en total es de 1.056.324,72 Km², que abarca zonas donde se presenta una precipitación media anual superior a los 2.000 mm, por tanto, las plantas nativas de esas regiones no carecen de agua a lo largo de todo el año (Corantioquia, 2017).

La importancia de estos bosques a nivel ambiental es muy relevante, por su rol como sumideros de carbono, ya que los árboles y las plantas que los habitan toman el dióxido de carbono (CO²) durante la fotosíntesis y como subproducto de este proceso liberan oxígeno al medio (Etter, 2014). Existen muchas familias de árboles maderables en los bosques húmedos tropicales, una familia de árboles que se destaca es *Meliaceae* (González Sánchez et al., 2013). Por lo que estos bosques a su vez han sido importantes en el ámbito económico, puesto que se pueden extraer maderas para la distribución y la exportación.

Carapa guianensis es una especie que habita los bosques húmedos de Colombia, la madera de esta especie es muy apetecida en diferentes áreas de la construcción. Los taninos que se encuentran en la corteza del árbol *Carapa guianensis* se utilizan para la curtiembre. El alcaloide que se extrae (caparina C₁₀H₂₈O₄) tiene aplicaciones medicinales. Además, dentro de los compuestos registrados para la especie se tiene que las semillas poseen acidoboxílico, andi-robina, andirobindil, 7-deacetoxi-7 oxogedunina, enmeina, ácido oléico, ácido palmítico, campeste rol, estigmasterol, b-sitosterol. Mientras que la madera extraída del tronco posee compuestos como lo

es b-acetoxigedunina, andirobina, metil angolensato (Machado da Rosa et al., 2013).

Por otro lado, las semillas contienen un alto contenido de un aceite, el cual es del grupo químico de los triterpenos, llamados limonoides dentro de los que están andirobina, gedunina y epoxi azadiradiona; como se había mencionado anteriormente. Se ha demostrado que estas sustancias son antialimentadores de insectos, es decir, que son potenciales objetivos para la fabricación de repelentes, por esta razón, resulta de suma importancia desarrollar estudios que utilicen terapias no residuales como el aceite de andiroba para que sirva como herramienta auxiliar en la reducción del ataque de moscas de la fruta en árboles frutales de climas templados (Montero et al., 2015)

En la industria cosmética se destaca nuevamente el fruto del árbol, puesto que de este se extrae un aceite, el cual posee múltiples beneficios para el cuidado de los músculos, el cabello y la piel. En la piel, por la alta presencia del ácido linoleico, estimula la regeneración y debido a sus propiedades antiinflamatorias, suaviza síntomas de enfermedades en la piel; y en el cabello, reduce el volumen y lo deja más brillante (Machado da Rosa et al., 2013).

Hasta el momento la especie no se encuentra evaluada en Colombia, por tal razón, se desconoce a ciencia cierta, en qué categoría de conservación se encuentra en este país. Por su parte, a nivel mundial según los datos de la lista roja del IUCN se encuentra en la categoría de menor preocupación (*Least Concern*) (Rivers, 2017), es decir, que a nivel mundial no presenta una problemática. Sin embargo, a nivel local la especie es usada sin la menor conservación de la misma. De tal forma no se tienen estudios en donde se estudien las relaciones de parentesco de la especie, que permitan entender la biología evolutiva de la especie.

En Colombia se han realizado varias experiencias agroforestales empleando *C. guianensis*. En el departamento del Chocó en la región de Bojayá, Medio Atrato, se plantó en asociación con cultivos antiguos de plátano (*Musa sp*). En la llanura aluvial, terrazas antiguas, y colinas bajas, y se comprobó que sobrevivió el 84% de los individuos (Morales, 1997). El árbol *C. guianensis* es sin duda alguna importante para la industria maderable y la industria cosmética colombiana. Sin embargo, esta no cuenta con estudios en el país, donde se evidencie la genética de la especie y sus poblaciones, así como su estado de conservación. Por tal motivo un análisis filogenético constituye un aporte para conocer la biología evolutiva y conservación de la especie.

2. Materiales y métodos.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN de *C. guianensis*, recolectaron muestras de hojas en la región del Valle del Cauca, específicamente en Buenaventura, en una localidad aledaña el Centro Forestal Tropical Universidad del Tolima. Las muestras fueron nombradas como se muestra en la Tabla 1.

Las muestras se secaron en silica gel y las extracciones de ADN se realizaron utilizando el protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Lodhi et al., 1994).

Tabla 1. Muestras de *Carapa guianensis* colectadas y evaluadas.

Código	Tipo de Muestra
CG-BC-1	Hojas
CG-BC-2	Hojas
CG-BC-3	Hojas
CG-BC-4	Hojas
CG-BC-5	Hojas
CG-BC-6	Hojas
CG-BC-7	Hojas
CG-BC-8	Hojas
CG-BC-9	Hojas
CG-BC-10	Hojas
CG-BC-11	Hojas
CG-BC-12	Hojas
CG-BC-13	Hojas
CG-BC-14	Hojas
CG-BC-15	Hojas
CG-BC-16	Hojas
CG-BC-17	Hojas

Reacción en Cadena de la Polimerasa

La PCR se llevó a cabo al amplificar el marcador molecular *rbcL*. La master mix se preparó con los primers forward (5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3') y reverse (5'GCAAATGGCATTCTGACATCC3'). Los perfiles de amplificación necesitaron de una desnaturalización primeramente de 30 ciclos a 94°C durante 30s; seguido de 30 ciclos de 30s a 49°C y 30s a 72°C, con una elongación final a 72°C durante 5 min. Esto fue efectuado en el termociclador Applied Biosystems de ThermoFisher Scientific. Una vez culminados todos los ciclos, los productos generados por PCR, se sometieron a electroforesis a 80V durante 1h en gel de agarosa al 0,8%. El producto amplificado se observó en un visualizador de gel de electroforesis Biologix®

Búsqueda, selección y edición de secuencias.

Para este estudio filogenético se buscaron secuencias en la base de datos en línea GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information), empleando la herramienta BLAST. Los genes que se tuvieron en cuenta para hacer la búsqueda son el gen cloroplástico *matturase K* (*mtK*) y la región espaciadora intergénica *trnL-trnF* (Ramsay et al., 2000). Luego, se realizó la comparación de las secuencias de *Carapa guianensis* con las secuencias de referencia, haciendo énfasis en las secuencias con >85% de identidad. Estas secuencias se guardaron en formato FASTA y por medio del programa BioEdit se realizaron alineamientos múltiples, empleando el algoritmo Clustal W (Monterroza et al., 2019). Luego, se analizaron y editaron los alineamientos con el fin de que todas las secuencias tuviesen el mismo tamaño y el formato correcto, fundamental para seguir con el análisis filogenético.

Para obtener el análisis estadístico de la evolución molecular y para construir los árboles filogenéticos y de distancia se utilizó el programa bioinformático MEGA X (Kumar et al., 2018).

Además, se determinó del modelo evolutivo a la cual se ajustaban las secuencias analizadas, calculando el BIC score, Bayesian Information Criterion (Criterion, 2016).

Luego, se construyeron dendrogramas usando métodos de agrupamiento por distancia (Neighbour-Joining y UPGMA) y por filogenia (Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia). Posteriormente, aplicó un Bootstrap de 1.000 repeticiones para cada método. Por último, seleccionó el agrupamiento con mayor sentido biológico y se construyó así un árbol consenso (Monterroza et al., 2019).

3. Resultados.

Los genes que se evaluaron inicialmente en este estudio fueron *matK*, *rbcL*, *rps16*, *trnH-psbA*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG*.

Las extracciones realizadas fueron satisfactorias, esto se comprobó con el resultado del gel, donde evidenció la amplificación satisfactoria del gen *rbcL* (Figuras 1 y 2).

A partir de la metodología aplicada se obtuvieron de la base de datos 23 secuencias completas para la región espaciadora intergénica *trnL-trnF* de *C. guianensis* por el método de Máxima verosimilitud (Figura 3) y Máxima Parsimonia (Figura 4), las cuales, se compararon además de con 19 especies más del género *Carapa* y con una especie fructífera como lo es *Mangifera indica* y otras especies maderables como *Juglans neotropica* (Cedro) y *Swietenia macrophylla* (Caoba). Para el gen

cloroplastial maturasa K (matK) de *C. guianensis*, se compararon 7 secuencias, las cuales se compararon con otras especies del género *Carapa*, una especie fructífera como lo es *Mangifera indica* y otras especies maderables como *Juglans neotropica* (Cedro) y *Swietenia macrophylla* (Caoba); por el metodo de Máxima Verosimilitud (Figura 5) y por el metodo de Máxima Parsimonia (Figura 6). Estas fueron corregidas, editadas, alineadas y posteriormente se realizaron los árboles filogenéticos.

Estos árboles se realizaron con la prueba de Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia, Neighbour-Joining y UPGMA, cada uno de ellos con 1.000 réplicas, con el fin de que el árbol tuviese un fuerte peso estadístico; sin embargo, los árboles que fueron tenidos en cuenta son los obtenidos con Máxima Parsimonia.

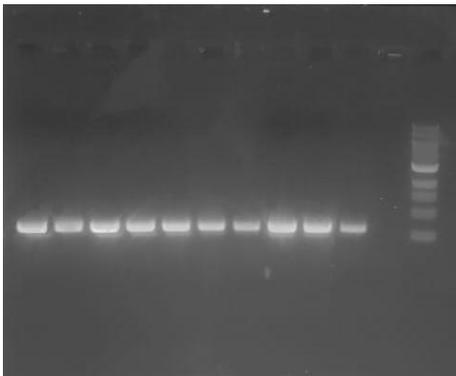


Figura 1. Electroforesis en gel agarosa 0,8% de la región *rbcL*. Marcador de peso molecular 1Kb

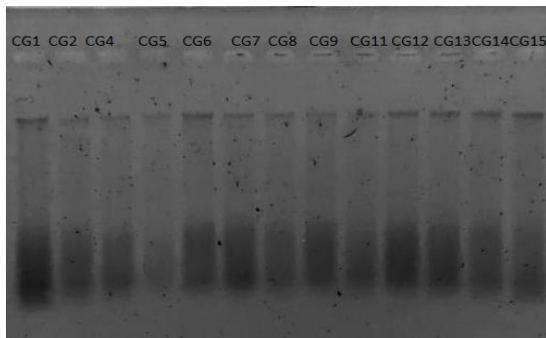


Figura 2. Extracción de ADN genómico de la especie *Carapa guianensis*

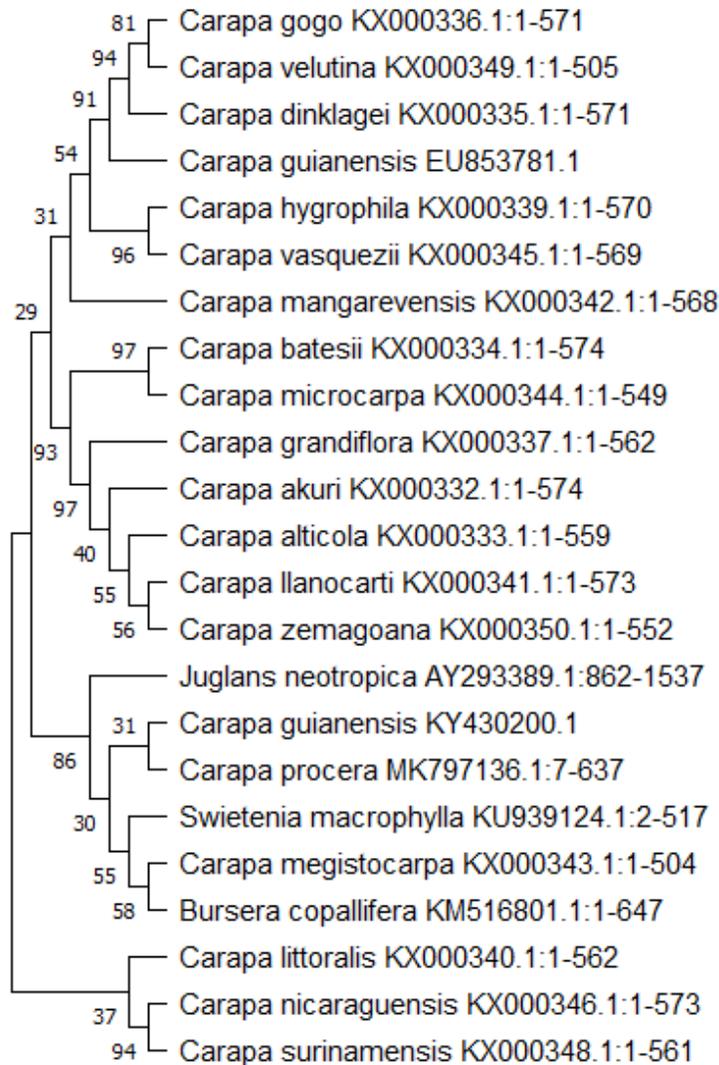


Figura 3. Árbol consenso por el método Máxima Verosimilitud, de la región trnL-trnF. Modelo evolutivo GTR+G+I y 1.000 réplicas.

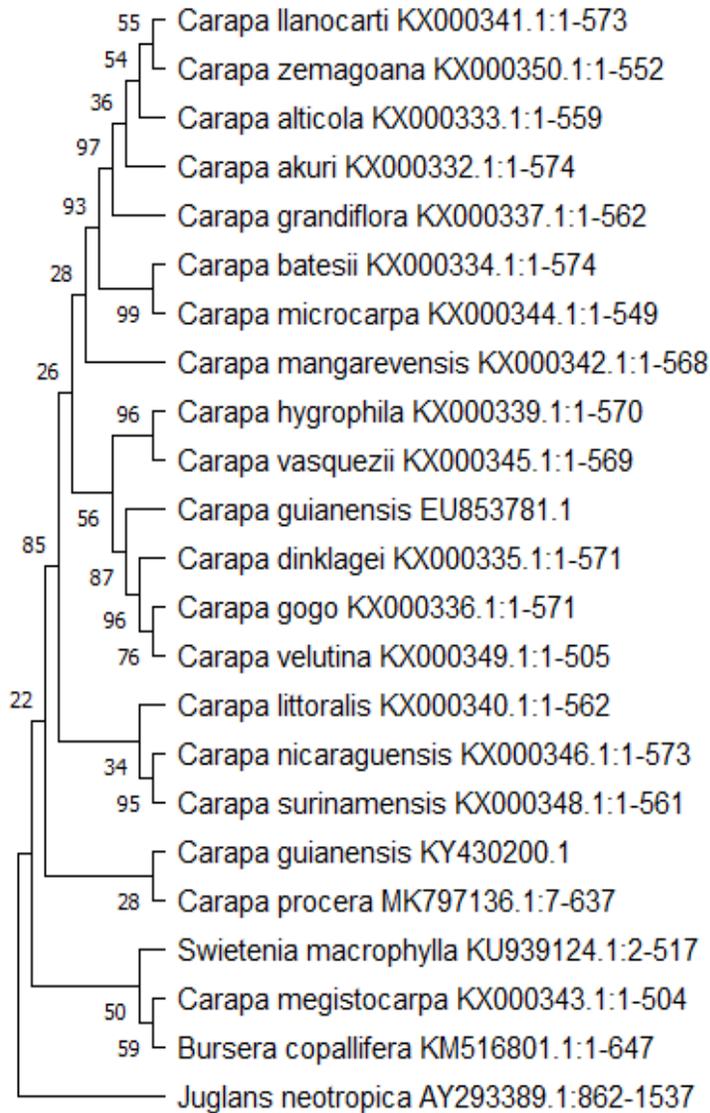


Figura 4. Árbol consenso de la región trnL-trnF, por el método Parsimonia. Modelo evolutivo GTR+G+I y 1000 réplicas.

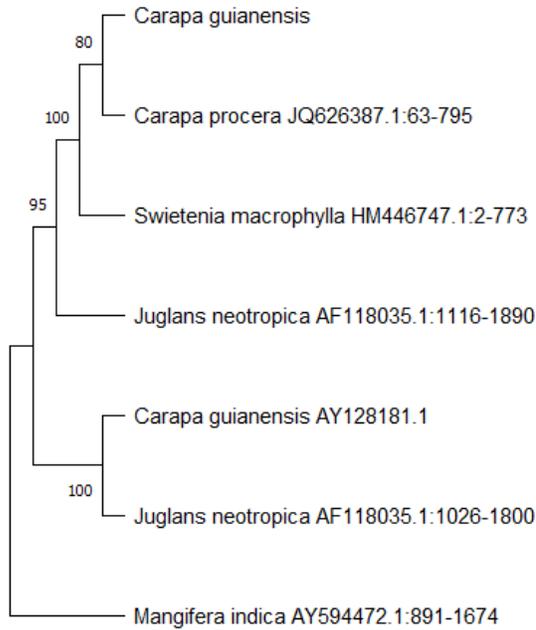


Figura 5. Árbol de la región del gen cloroplastidial maturase K (matK), por el método Máxima Verosimilitud. Modelo evolutivo GTR+G+I y 1000 réplicas.

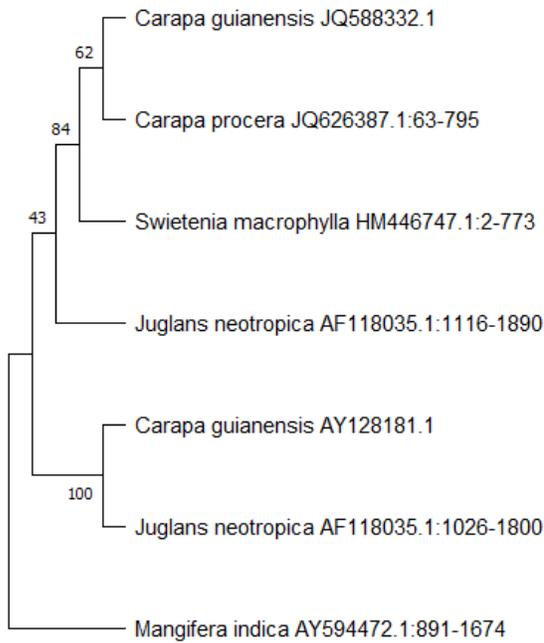


Figura 6. Árbol de la región del gen cloroplastidial maturase K (matK), por el método Máxima Parsimonia. Modelo evolutivo GTR+G+I y 1000 réplicas.

4. Discusión

El protocolo usado para la extracción de ADN usado inicialmente no permitió la amplificación de ningún gen, por tal motivo fue necesario hacerle modificaciones a esta. Esto debido a que el protocolo empleado de base para la extracción fue diseñado para una especie de uva el cual al aplicarlo con la especie maderable *C. guianensis* no permitió obtener ADN de calidad. La muestra de tejido se disminuyó a 10-15mg, el buffer utilizado estaba compuesto por EDTA 0,02 M, TRIS 0,1M CTAB 2% y betamercaptoetanol 2%, en este nuevo protocolo además se realizaron 3 extracciones orgánicas con cloroformo:alcohol isoamílico, a fin de que el ADN estuviese limpio y de calidad (Figura 7). Dando que no se contó con un espectrofotómetro para cuantificar el ADN, se amplificó el gen *rbcL* debido a que el gen *rbcL* es un gen muy conservado.

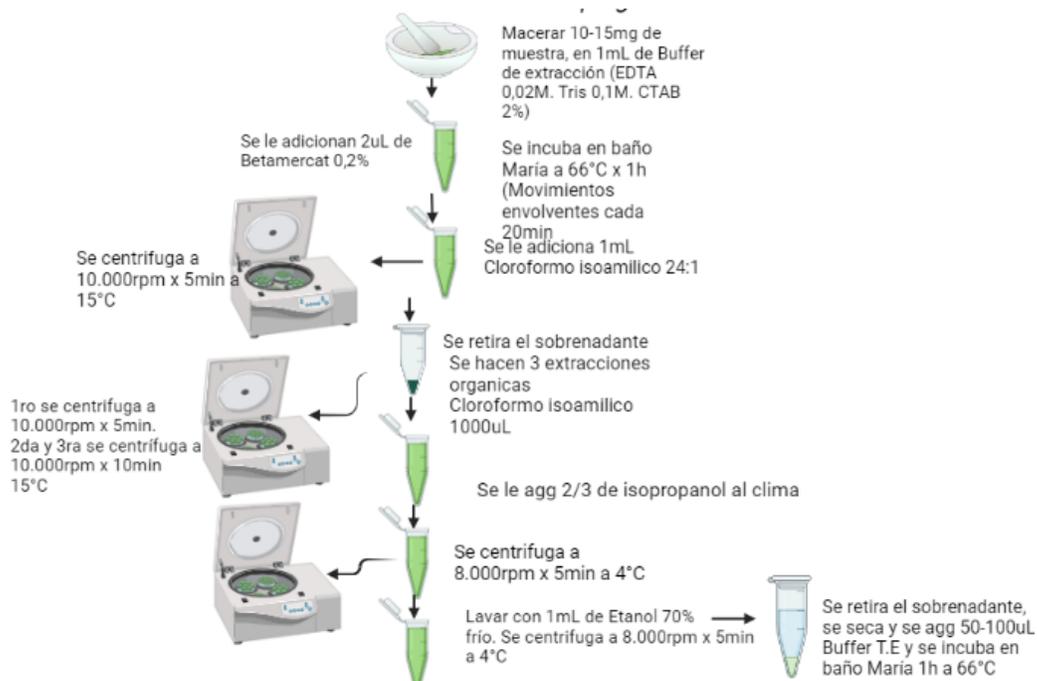


Figura 7. Protocolo de extracción de ADN de *C. guianensis*

Por otra parte, en los árboles filogenéticos del gen *matk* se observó una topología poco sentido biológico, puesto que *C. guianensis* se agrupó con *Mangifera indica* en medio de la especie maderable *Junglans neotropica*. Este resultado que no corresponde con las características taxonómicas ya que, este es un árbol frutal de la familia *Anacardiaceae*, y por tanto debía estar en un clado fuera de las especies maderables (Figura 8). Este resultado, indica que existe la necesidad de continuar con el estudio, es decir, se requiere continuar evaluando marcadores genéticos,

todo esto a fin de obtener secuencias de calidad un análisis filogenético mucho más robusto y poder dar un resultado más conciso de la filogenia del árbol *C. guianensis*.

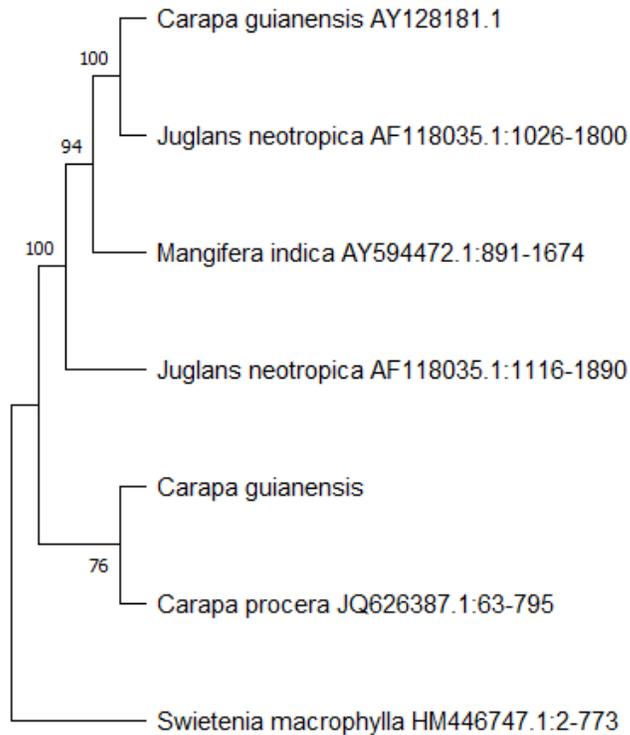


Figura 8. Árbol de la región del gen cloroplastidial maturase K (mtK), por el método Máxima Parsimonia. Modelo evolutivo GTR+G+I y 1000 réplicas.

5. Conclusión.

La información genética que se encuentra en las bases de datos, no es la suficiente para hacer una identificación de análisis filogenético de la especie *Carapa guianensis*; por tal motivo es necesario la realización de más estudios genéticos, así como también la caracterización de más marcadores moleculares. De esta manera, se podrá conocer la identidad y la estructura de las poblaciones y el estado de conservación en el cual se encuentra *C. guianensis* en Colombia.

6. Referencias.

- Ajawatanawong, P. (2017). Molecular Phylogenetics: Concepts for a Newcomer. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 160(January), 185–196. https://doi.org/10.1007/10_2016_49
- Cabral, E. L., Cabaña Fader, A. A., Cardoso, D., Casco, S., Medina, W. A., Salas, R. M., Ferber, O. F., Martín L P Queiroz, S. G., López Dra Elsa L Cabral, E. S., & Miguel, L. M. (2009). *Biotaxonomía de Spermatofitas. Diversidad Vegetal*. 106. <http://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/8-Rosideas.pdf>
- Camacho, Lopez, R & Montero, M. (2005). Manual de identificación de especies forestales con manejo certificable por comunidades. *Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI y la Fundación Chemonics-Colombia*, 1–128. <https://books.google.com/books?id=CHkbMwAACAAJ&pgis=1>
- Cloutier, D., Póvoa, J. S. R., Procopio, L. C., Leão, N. V. M., Wadt, L. H. D. O., Ciampi, A. Y., & Schoen, D. J. (2005). Chloroplast DNA variation of *Carapa guianensis* in the Amazon basin. *Silvae Genetica*, 54(6), 270–274. <https://doi.org/10.1515/sg-2005-0039>
- Criterion, S. (2016). Back Matter. *Time*, 1–3. <https://doi.org/10.1214/aos/1176344136.MR468014>.
- CUPROFOR. (2018). PROPIEDADES Y USOS DE LA MADERA *Virola*. *Sereal Untuk*, 51(1), 51.
- Etter, A. (2014). *Ecosistemas de Bosque Húmedo Tropical. October 1998*.
- González Sánchez, Y., Fernández Díaz, Y., & Gutiérrez Soto, T. (2013). El cambio climático y sus efectos en la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 51(3), 331–337.
- IDEAM. (2015). Ecosistemas - IDEAM. *Ecosistemas de Colombia*, 60, 34–54. <http://www.siac.gov.co/web/siac/ecosistemas>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Machado da Rosa, J., Carissimi Boff, M. I., Gonçalves, P. A., Boff, P., & Zanelato Nunes, M. (2013). Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) in the capture of the fruit fly (*Anastrepha fraterculus* Wiedemann) in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Idesia (Arica)*, 31(3), 97–101. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292013000300013>
- Macho, C. (2021). *TANGARE , ANDIROBA (Carapa guianensis)*. 412, 1–16.

- Montero, M., Barrera, J., Giraldo, B., & Lucena, A. (2015). *Fichas Tecnicas de Especies de uso Forestal y Agroforestal de la Amazonia Colombiana-ilovepdf-compressed.pdf*.
- Monterroza, E. L., Cepeda, M. O., Paola, W., & Rodriguez, O. (2019). *Filogenia del reino Chromista Phylogeny of kingdom Chromista*. 21, 125–142.
- Morales, E. (1997). *El genero Carapa en Colombia*. 19(3), 397–407.
- Ramsay, L., Macaulay, M., Degli Ivanissevich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K. J., Tuveesson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmioli, N., Sjakste, T., Ganal, M., Powell, W., & Waugh, R. (2000). A simple sequence repeat-based linkage map of Barley. *Genetics*, 156(4), 1997–2005. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1997>
- Víctor, A. (2016). *Redalyc.MINIPREP FOR CHLOROPLAST AND MITOCHONDRIA ENRICHMENT AND DNA EXTRACTION*.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
- Corantioquia. (2017). Bosques: Ordenamiento forestal sostenible y derecho a la Tierra en los Bosques. Medellín, Colombia. Recuperado de: <https://www.corantioquia.gov.co/Paginas/VerContenido.aspx?List=MenuSuperior&item=61#:~:text=El%20gran%20bioma%20del%20bosque.et%20al.%2C%202007>.
- Rivers, M.C., Barstow, M. & Mark, J. 2017. *Carapa guianensis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T61794008A61794012. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T61794008A61794012.en>. Downloaded on 10 June 2021.
- Lodhi, M. A., Ye, G.-N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6–13. <https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- Machado da Rosa, J., Carissimi Boff, M. I., Gonçalves, P. A., Boff, P., & Zanelato Nunes, M. (2013). Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) in the capture of the fruit fly (*Anastrepha fraterculus* Wiedemann) in Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Idesia (Arica)*, 31(3), 97–101. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292013000300013>
- Montero, M., Barrera, J., Giraldo, B., & Lucena, A. (2015). *Fichas Tecnicas de Especies de uso Forestal y Agroforestal de la Amazonia Colombiana-ilovepdf-compressed.pdf*.
- Morales, E. (1997). *El género Carapa en Colombia*. 19(3), 397–407.
- Macrogen. (2021). Universal Primer. Recuperado de: https://dna.macrogen-europe.com/eng/support/ces/guide/universal_primer.jsp

