

AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN *Peltophorum dubium* (Spreng.) TAUB. (CAÑA FISTOLA) Y *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) (TIMBO), UTILIZANDO CEBADORES DE LA ESPECIE *Koompassia malaccensis* Benth. Y *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb.

AMPLIFICATION OF MICROSATELITE
MARKERS IN *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.
(CAÑA FISTOLA) *Andenterolobium*
Contortisiliquum (Vell.) (TIMBO), USING
Koompassia Malaccensis Benth. *Andenterolobium*
Cyclocarpum (Jacq.) Griseb as primers.

Fecha de recepción: 01/11/2017 // Fecha de aceptación: 12/12/2017

RESUMEN

La fragmentación del hábitat es una realidad global, presente en la Selva paranaense. Entre las especies vulnerables y/o amenazadas por la fragmentación del hábitat, en este ecosistema, podemos mencionar a *Peltophorum dubium* (Caña fístula) y *Enterolobium contortisiliquum* (Timbó) que particularmente en Misiones, son de interés para la industria forestal y consideradas especies multipropósitos. No obstante, un uso sostenible de estas especies depende del manejo de la diversidad de especies presentes en estos paisajes y la variación genética dentro de estas. En Argentina no existe información acerca de la calidad genética que se conjuga con las características fenotípicas de dichas especies.

SUMMARY

The habitat fragmentation is a global reality, and very present in the Atlantic Forest. Among the species vulnerable and / or threatened by habitat fragmentation, in the Atlantic Forest, we can mention *Peltophorum dubium* (Cañafistula) and *Enterolobium contortisiliquum* (Timbó), which particularly in Misiones, are among the most interest for the forest industry, considered as well as, multipurpose species. However, a sustainable use of these species depends on the management of the diversity of tree species present in landscapes and the genetic variation within them. In Argentina, there is no information about the genetic quality correlated with the phenotypic characteristics of these species.

Fernando Niella

Patricia Rocha

Docentes de la Facultad de Ciencias Forestales (FCF) - UNaM
procha910@gmail.com

Paola Ojeda

Becaria del Instituto de Biología Molecular de Misiones (InBioMis) de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales - UNaM.

Guido Petruszynski

Ing. Forestal-FCF-UNaM

Pedro Zapata

Mónica Otegui

Docentes de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales- UNaM - CONICET-InBioMis

En este sentido, los microsatélites son herramientas útiles para estudiar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones. El objetivo del presente trabajo fue la amplificación inter-específica de regiones de microsatélites de *E. contortisiliquum*, utilizando cebadores diseñados para *E. cyclocarpum*, y de *P. dubium*, utilizando cebadores diseñados para *Koompassia malaccensis*. Los resultados obtenidos confirmaron la transferibilidad de los cebadores utilizados para *E. contortisiliquum* y *P. dubium*, amplificando regiones microsatélites de las especies estudiadas en poblaciones argentinas. Este es el primer estudio en Argentina que presenta microsatélites candidatos para *E. contortisiliquum* y *P. dubium*, que podrían ayudar en la caracterización del germoplasma.

Palabras clave: Timbo; Caña fistula; marcadores genéticos; diversidad genética; ADN

In this sense, microsatellites are very useful tools to study genetic diversity and the structure of populations. The aim of the present work was to achieve the inter-specific amplification of microsatellite regions in *E. contortisiliquum*, using primers designed for *E. cyclocarpum*, and in *P. dubium*, using primers designed for *Koompassia malaccensis*. The obtained results confirmed the transferability of the primers used for *E. contortisiliquum* and *P. dubium*, amplifying microsatellites of the species under study for Argentina ecosystem. This being the first report in Argentina, which presents microsatellite candidates for *E. contortisiliquum* and *P. dubium*, which could help in germplasm characterization.

Key words: Timbó; Caña fistula; genetic markers; genetic diversity; DNA

INTRODUCCION

La fragmentación de los hábitats es una realidad global y muy presente en la Selva paranaense. Las especies forestales, tanto en bosques tropicales como templados, son propensas a sufrir cuando la fragmentación reduce el tamaño de la población suficiente para que los efectos genéticos negativos como son la pérdida de variabilidad genética y depresión por endogamia, afectan su supervivencia a largo plazo, pudiéndolas llevar a un estatus de vulnerabilidad o extinción. La abundancia de las especies en los bosques tropicales y subtropicales es baja (de 0.1-1 árbol/ha), en fragmentos de bosques menores a 10 ha, por lo cual el efecto negativo de la fragmentación es un hecho inevitable (MAINAY HOWE, 2000). Entre las especies vulnerables y/o amenazadas por la fragmentación del hábitat, en la *Selva paranaense* podemos mencionar a *Peltophorum dubium* (Caña fistula) y *Enterolobium contortisiliquum* (Timbó), que particularmente en Misiones, se encuentran entre las de mayor interés para la foresto-industria por la calidad de su madera, situación que ha contribuido a la erosión genética de sus poblaciones por el aprovechamiento extractivo que se ha venido realizando en la provincia (MORI *et al*, 2013; NIELLA *et al*, 2016). Actualmente existe un progresivo interés en utilizarlas para plantación, por parte de pequeños y medianos productores rurales. Son especies identificadas como melíferas y de buena calidad para restauración de áreas degradadas y/o en sistemas consorciados agro-ganaderos o silvícola. Los municipios las demandan, en forma creciente, como ornamentales y representativas de la selva misionera en proyectos de parquización en áreas urbanas. Los productos y servicios proporcionados por los árboles en los bosques y tierras de cultivo, cubren las necesidades y promueven el bienestar de las personas en la región. Su valor depende del manejo de la diversidad

de especies de árboles presentes en el paisaje y la variación genética dentro de estas especies. Los beneficios de los árboles y sus recursos genéticos, sin embargo, a menudo no están bien cuantificados, dado que el comercio está frecuentemente fuera de los mercados formales, existe una multiplicidad de especies y formas en que los árboles son utilizados y gestionados, y la diversidad genética dentro de las especies a menudo no recibe la debida consideración (DAWSON *et al*, 2013).

Una combinación de indicadores ecológicos y moleculares proporcionarían herramientas para el monitoreo genético de los bosques (THOMAS *et al*, 2014). En Brasil se han llevado a cabo estudios de diversidad genética de *P. dubium* y *E. contortisiliquum*, utilizando marcadores isoenzimáticos y RAPD (DA CRUZ SANTANA *et al*, 2007; KAGEYAMA *et al*, 2003 y 2004). No obstante, en Argentina no existe información acerca de la calidad genética que se conjuga con las características fenotípicas de dichas especies. En este sentido, los microsatélites son herramientas muy útiles para estudiar la diversidad genética y la estructura de las poblaciones, con la particularidad de que pueden amplificarse mediante cebadores específicos complementarios a las regiones flanqueantes, que a menudo se conservan entre especies congénicas (OLIVEIRA *et al*, 2006 y PEAKALLET *et al*, 1998). La conservación de las regiones flanqueantes permite utilizar cebadores aislados de una especie particular, en otra estrechamente relacionada, lo que reduce el costo del aislamiento de cebadores específicos de especie (SOARES *et al*, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue lograr la amplificación inter-específica de regiones de microsatélites en *E. contortisiliquum*, utilizando cebadores diseñados para *E. cyclocarpum*, descritos por PETERS *et al* (2008); y en *P. dubium*, utilizando cebadores diseñados para *Koompassia malaccensis*, descritos por LEE *et al* (2006). Los microsatélites obtenidos permitirán posteriormente, evaluar la

diversidad genética y contribuir a la conservación y manejo sustentable del recurso en estudio.

MATERIALES Y METODOS

Extracción de ADN

El ADN fue obtenido de las plúmulas de plántulas *E. Contortisiliquum* y *P.dubium*, germinadas in vitro según protocolo descrito por NIELLA *et al* (2013 y 2015).

Para la correcta extracción y purificación del ADN se utilizó el protocolo desarrollado por MURRAY y THOMPSON (1980) introduciendo modificaciones para estandarizar la técnica. La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1% teñido con Gel Red. Posteriormente los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta y fotografiada con cámara digital *Canon PowerShot G10*. Estas muestras fueron empleadas posteriormente en la amplificación por PCR.

Amplificación de los marcadores microsatélites

Para la amplificación de marcadores microsatélites se ensayó la transferencia de 9 pares de cebadores de *E. cyclocarpum* descrito por PETERS *et*

al (2008) en 7 individuos de *E. contortisiliquum*; y de 8 pares de cebadores de *Koompassia malaccensis* descritos por LEE *et al*, (2006) en 4 individuos de *P. dubium*. Para ello, se estandarizaron las condiciones de amplificación (PCR) descritas por PETERS *et al* (2008), teniendo en cuenta principalmente: concentración de Cl_2Mg , concentración de desoxirribonucleótidos (dNTPs), concentración de cebadores, concentración de ADN y temperatura de hibridación. La visualización de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Gel Red utilizando un patrón de pesos moleculares (100 bpLadderPromega), visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiada con cámara digital *Canon PowerShot G10*.

RESULTADOS

A partir de semillas germinadas *in vitro* de *E. contortisiliquum*, se logró extraer 204,6 $\mu g/\mu l$ de ADN y 1,7 de pureza. Se estandarizaron las condiciones para amplificar 9 regiones microsatélites obteniéndose alelos dentro del rango esperado, con bandas de 206, 208, 182, 223, 262, 285, 149, 154 y 192 pb, respectivamente (Figura 1).

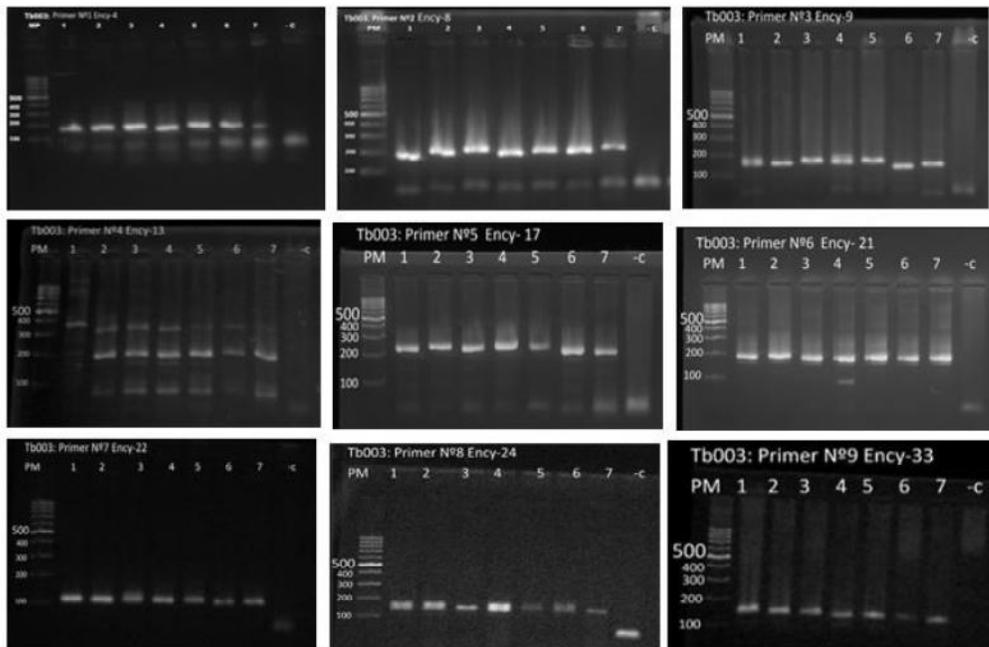


Figura 1: Gel de agarosa al 2% mostrando la amplificación, mediante la utilización de los 9 cebadores, a partir de ADN de la mues TB003 de Misiones. PM: Peso molecular (100 pb); Carriles 1-7: Amplificación de bandas; Carril 8: -C control negativo.

Figure 1: 2% agarose gel showing the amplification, using the nine primers, from DNA of the TB003 sample of Misiones. MW: Molecular weight (100 bp); Lanes 1-7: Amplification of bands; Lane 8: -C negative control.

Mientras que se amplificaron solo dos regiones microsatélites en *P. dubium*, de los 8 descriptos por Lee y col. (2006) en *K. malaccensis*. La Figura 2 (a y b) muestra las amplificaciones de la región microsatélite a partir de los cebadores Kma017a y Kma172a. En el carril número 9 (de la imagen a) a la temperatura de 59,7 °C se observa una banda única sin productos inespecíficos de aproximadamente 300 pb según comparación con el peso molecular de 100 pb del último carril; mientras que en la imagen b, en el carril número 14 a la temperatura de 51,5 °C se observa una banda única sin productos inespecíficos de aproximadamente 300 pb según comparación con el peso molecular de 100 pb del primer carril.

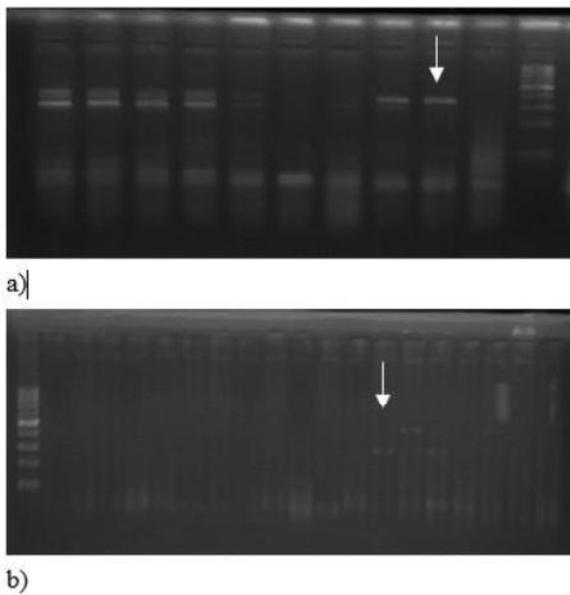


Figura 2: Corrida electroforética en gel de agarosa. Carriles 1 al 10 amplificaciones en gradiente creciente de temperatura. La flecha en la imagen a) indica el Locus: Kma017a y en b) indica el Locus: Kma172a.

Figure 2: Electrophoretic run on agarose gel. Lanes 1 to 10 amplifications in increasing temperature gradient. The arrow in the image a) indicates the Locus: Kma017a and in b) indicates the Locus: Kma172a.

DISCUSION

El presente trabajo consiguió extraer ADN de buena calidad y cantidad que permitió estandarizar las condiciones de ciclado de PCR para la amplificación de los microsatélites Ency-4, Ency-8, Ency-9, Ency-13, Ency-17, Ency-21, Ency-22, Ency-24, Ency-33 en *E. contortisiliquum*; y Kma017a y Kma 172a en *P. dubium* proporcionando los cebadores heterólogos. Los resultados fueron los esperables en cuanto al tamaño de amplicones, y se comprobó la transferibilidad de cebadores de *E. cyclocarpum* y *K. malaccensis* para

realizar estudios preliminares de microsatélites en las especies *E. contortisiliquum* y *P. dubium*.

Los microsatélites, o secuencia de repeticiones simples (SSR, por sus siglas en inglés), han sido la clase de marcadores más ampliamente utilizados en estudios genéticos, con aplicaciones en la conservación genética, la genética de poblaciones, la reproducción molecular y las pruebas de paternidad. Según OLIVEIRA *et al* (2006), esta gama de aplicaciones se debe al hecho de que los marcadores de microsatélites son codominantes y multialélicos, altamente reproducibles, alta resolución y se basan en la reacción en cadena de la polimerasa. A su vez, remarca que la tasa de éxito de transferibilidad de los microsatélites entre las especies relacionadas depende de la similitud genética entre ellos. Es así, que TOPCU *et al* (2016), estudiando la transferibilidad de 110 pares de cebadores SSR desarrollados para *Pistacia vera* L. a especies silvestre de *Pistacia*, observaron que 100 pares fueron transferidos a por lo menos una de las especies de *Pistacia*, con una tasa de transferibilidad del 81%. En *Dalbergiasp.*, DE OLIVEIRA BUZATTI *et al* (2016) utilizaron 18 marcadores microsatélites, desarrollados y caracterizados para dos especies del género *Dalbergia* (*Dalbergia nigra* y *Dalbergia monticola*), para su transferencia a otras seis especies de *Dalbergia*; si bien la transferencia fue exitosa para las seis especies, el número de microsatélites transferidos fue variable según la especie, con una tasa de éxito promedio de transferibilidad del 60%. PEAKOLL *et al* (1998) investigando la transferibilidad de 31 marcadores SSR entre especies del género *Glycine*, observaron que un 65% de los marcadores amplificaron en especies pertenecientes al género *Glycine*, mientras que la transferibilidad en otros géneros, de leguminosas, fue muy baja (3-13%). Lo expuesto más arriba, concuerda con nuestros resultados, dado que entre *E. contortisiliquum* y *E. cyclocarpum*, se pudieron transferir el 100% de los microsatélites, mientras que entre *P. dubium* y *K. malaccensis*, solo el 25% de los microsatélites han sido transferidos.

El presente trabajo, confirma la transferibilidad de los cebadores utilizados para *E. contortisiliquum* y *P. dubium*, reconociendo secuencias conservadas y permitiendo establecer microsatélites de la especie estudiada para las poblaciones argentinas. Siendo este el primer estudio, en Argentina, que presenta microsatélites candidatos para *E. contortisiliquum* y *P. dubium*, que podrían ayudar en la caracterización del germoplasma.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue desarrollado en el marco del proyecto SILVA 17, financiado por Proyecto Conservación de la Biodiversidad en Paisajes Productivos Forestales-GEF 090118 y la Convocatoria Especial UNaM 2015.

BIBLIOGRAFIA

- DA CRUZ SANTANA, G.; Silva Mann, R.; Ferreira, R. A.; BomfimGois, I.; Dos Santos Oliveira, A.; De JesusBoari, A.; Alvares Carvalho, S. V.;Árvore, R. 2008. Diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum*(vell.) morong. nobaixo rio são francisco, por meio de marcadores RAPD. Viçosa-MG, v.32, N°3: 427-433.
- DE OLIVEIRA BUZATTI, R. S; Chicata, F. S. L.; M;Lovato, M. B. 2016. Transferability of microsatellite markers across six *Dalbergia* (Fabaceae) species and their characterization for *Dalbergia miscolobium*. BiochemicalSystematics and Ecology 69: 161-165
- DAWSON, I.K., Guariguata, M.R., Loo, J., Weber, J.C., Lengkeek, A., Bush, D., Cornelius,J., Guarino, L., Kindt, R., Orwa, C., Russell, J., Jamnadass, R., 2013. What is the relevance of smallholders' agroforestry systems for conserving tropical treespecies and genetic diversity in circa situm, in situ and ex situ settings? Areview. Biodivers. Conserv. 22, 301–324.
- FERRERO, BRIAN. 2005. Estudio de la gestión territorial y de los recursos naturales, de la población rural del Área de Influencia de la Reserva de Biosfera Yabotí –Argentina-. Buscando alternativas para un desarrollo local sustentable en torno a una Reserva de Biosfera. Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales Universidad Nacional de Misiones. 184 pp.
- KAGEYAMA, P.; Caron, D; Gandara, F; Dagoberto do Santos, J. 2004. Capítulo 9: Conservación de fragmentos silvícolas de Mata Atlántica en el Estado de São Paulo, Brasil. In: Challenges in Managing Forest Genetic Resources for Livelihoods: Examples from Argentina and Brazil. Eds.: Vicenti, B.; Amaral, W.; Meillur, B. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- KAGEYAMA, P.Y.;Sebbenn, A.M.; Ribas, L.A.; Gandara, F.B.; Castellen, M.; Perecin, M.B.; Vencovsky, R.2003 Diversidade genética emespecies arbóreas tropicais de diferentes estágiosuccionais por marcadores genéticos. ScientiaForestalis, N° 64: Pp.: 93-107
- LEE, C. T.; Lee, S. L.; Faridah Q. Z; Siraj, S. S.2006. Isolationandcharacterizationofmicrosatellitemarkers in*Koompassiamalaccensis*(Leguminosae), na important tropical timberspecies. Molecular Ecologynotes, 6: 1198–1201.
- MAINA, G. G.; Howe, H. F. 2000. Inherent Rarity in Community Restoration. Conservation Biology, Vol. 14, No. 5: 1335-1340
- MORI, E.; Sebbenn, A.; Tambarussi, E.y Gurie, R.2013. Sistema de reprodução em populações naturais de *Peltophorum dubium*. Sci. For., Piracicaba, v. 41, n. 99, p. 307-317.
- PETERS,M. B.; Hagen,C.; Trapnell,D. W.; Hamrick,J. L.; Rocha,O.;Smouse, P. E. Glenn, T. C. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Guanacaste tree, *Enterolobiumcyclocarpum*.Molecular Ecology Resources N°8: 129–131.
- MURRAY M. G.;Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. NucleicAcidsResearch N°8: 4321-4326.
- NIELLA,F.; Rocha, P.; Eibl, B.; Bohren, A.; Ayala, L.; Conti, P.; Franco, M. 2016. Sección Propagación.Desarrollo de técnicas de propagación clonal para la utilización sostenible de especies forestales nativas multipropósitos y/o fijadoras de nitrógeno y productos forestales no madereros.En: Investigación Forestal 2011-2015: Los Proyectos de Investigación Aplicada. Buenos Aires: Ministerio de Agroindustria. Unidad para el cambio rural -UCAR. Pp.: 386 - 389.
- NIELLA, F.; Rocha, P.; Eibl, B.; Bohren, A.; Ayala L.; Conti, P.; Franco, M.; Radins, M. 2013. Desarrollo de técnicas de propagación clonal para la utilización sostenible de especies forestales nativas multipropósitos y/o fijadoras de nitrógeno y productos forestales no madereros. Publicado en el 4to Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano Iguazú-Informe Técnico PIA 10031-UCAR-MINAGRI-Buenos Aires-Argentina.
- OLIVEIRA, E.J., Padua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R., Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genet. Mol. Biol.Ribeirao Preto 29-2, 294-307
- PEAKALL, R.; Gilmore, S.; Keys, W.; Morgante, M.;Rafalski, A. 1998. Cross-Species Amplification of Soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) Within the Genus and Other Legume Genera: Implications for the Transferability of SSRs in Plants. Molecular Biology and Evolution, Volume 15, Issue 10, Pages 1275–1287
- THOMAS, E.; Jalonen, R.; Loo, J.; Boshier, D.; Gallo, L.; Cavers, S.; Bordács, S.; Smith, P.; and Bozzano, M. 2014. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. Forest Ecology and Management 333 (2014) 66–75
- TOPCU, H.; Coban, N. and Kafkas, S. 2016. Novel microsatellite markers in *Pistacia vera* L. and their transferability across the genus *Pistacia*. Scientia Horticulturae 198 (2016) 91-97.

SOARES, T. N.; Sant'Ana, L. L.; Oliveira, L. K.; Telles, M. P. C.; Collevatti, R. G., 2013. Transferability and characterization of microsatellite loci in *Anacardiumhumile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). Genet. Mol. Res. 12, 3146-3149.