

ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE AGUAJE DE *MAURITIA FLEXUOSA* (ARECACEAE) MEDIANTE MARCADORES MICROSATELITES

ANALYSIS OF AGUAJE *MAURITIA FLEXUOSA* (ARECACEAE) GENETIC DIVERSITY BY MICROSATELLITE MARKERS

OLIVERA J. E., GONZALES M. S., MEJÍA K., PINTAUD J. C. & RAMÍREZ R.

Resumen

Se evaluó la diversidad biológica de una población de veinte individuos de aguaje provenientes de Iquitos. Se probaron cuatro marcadores microsatélite: mf13, mf19, mf30 y mf33, que rindieron en promedio 3.33 alelos, siendo el marcador mf13 aquel con el mayor número de alelos encontrados. El conteo del índice polimórfico fue mayor para el alelo mf13 y mf30 con un valor de 0.71, y menor para el marcador mf33 (PIC=0.65). Considerando a los veinte individuos como una sola población, en equilibrio Hardy-Weinberg, muestran una diversidad genética promedio de 0.433, como una medida generalizada de la variación entre los loci evaluados, pero poca diferenciación entre los individuos evaluados, (Fst 0.021). El análisis de agrupamiento muestra dos grupos bien diferenciados pero con muy poca distancia genética entre ellos. No hay una diferenciación genética clara entre los individuos femeninos y masculinos considerándose por tanto que se encuentran ambos en equilibrio.

Palabras claves: *Mauritia flexuosa*, diversidad biológica, microsatélite, PCR, electroforesis.

Abstract

We assessed the diversity of a population of twenty individuals of aguaje from Iquitos. Four microsatellite markers were tested: mf13, mf19, and mf33 mf30, which yielded an average of 3.33 alleles. Marker mf13 exhibited the highest number of alleles found. The polymorphic allele count was higher for mf13 and mf30, with a value of 0.71, and lower for the marker mf33 (PIC = 0.65). Considering the 20 individuals as a single population in HardyWeinberg equilibrium shows 0.433 average genetic diversity as a general measure of the variation among the tested loci, but little variation between individuals (Fst 0.021). Cluster analysis shows two distinct groups with little genetic distance between them. There was no clear genetic differentiation between male and female individuals, and both are considered to be genetically balanced.

Keywords: *Mauritia flexuosa*, biodiversity, microsatellite, PCR, electrophoresis.

Introducción

La Amazonía peruana es un centro importante de diversidad genética del aguaje, pero también de mayor depredación debido a una selección negativa de los frutos (Freitas *et al.*, 2006).

Mauritia flexuosa, se clasifica dentro de la familia *Palmae*, (*Arecaceae*, *Palmae*), subfamilia *Calamoideae*, Subtribu, *Mauritiinae* (Dransfield, J. *et al.*, 2005). Es la palmera con mayor significación económica en la Re-

gión Loreto, el cual es intensamente explotada en estado natural (Valdivia, 1995).

Para conocer el impacto de esta sobreexplotación, así como entender cómo trabaja la selección sobre la variabilidad genética de las poblaciones de aguaje, y las oportunidades que tiene la especie para perpetuarse en el tiempo, es menester primeramente caracterizar a la especie genéticamente (Bassan *et al.*, 1991, Sosa *et al.*, 2002, Ramanatha *et al.*, 2002, Bhat *et al.*, 2010)).

Los marcadores moleculares han sido extensivamente

y satisfactoriamente usados para el análisis genético de plantas, y para caracterizar la variabilidad entre plantas. Uno de ellos son los marcadores microsatélites o SSR. Sin embargo, no existen antecedentes del uso de este tipo de marcador para el aguaje en nuestro medio. Solo recientemente se han publicado iniciadores SSR para aguaje (Ferderman, *et al.*, 2012, Menezes, *et al.*, 2012), por lo que es posible comenzar a aplicar estos marcadores en *M. flexuosa*. Los marcadores microsatélites son ideales para el mapeo genético y en estudios de población debido a su abundancia en el genoma de todos los eucariotes (Bhat *et al.*, 2010).

Materiales y métodos

Se colectaron hojas frescas de veinte individuos adultos que crecen a lo largo de la carretera Iquitos-Nauta, entre los kilómetros 25 y 28, por la ruta al Centro de Conservación Alpuhuallo del Instituto de Investigación de la Amazonía (IIAP). Las hojas se almacenaron en tubos de centrifuga de 50 ml conteniendo deshumecedor comercial (carbonato de calcio granulado), y de esta forma se trasladaron hasta el laboratorio ubicado en Lima. Las muestras carecen de datos descriptivos y de pasaporte y solo se clasificaron según el sexo en femeninos y masculinos.

El aislamiento del ADN se realizó pulverizando las hojas con nitrógeno líquido y se sometió al protocolo de extracción con CTAB según propuesto por Doyle y Doyle (1990) con ligeras modificaciones. Trabajando en tubos de 1.5 ml, aproximadamente 2 mg de polvo fue combinado con 1 ml de buffer CTAB preparado justo al momento de la extracción (1.9% de CTAB, 0.02 M EDTA, 1.4 M NaCl, 2.8% PVP, 0.3% β -mercaptoetanol, 0.1 M Tris-Cl, pH 8.0) y se incubó por una hora a

65°C, agitándose varias veces durante el periodo de incubación. Luego se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue combinado con 700 μ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Al sobrenadante obtenido se le agregó 50 μ l de buffer CTAB (10% de CTAB, 0.02 M EDTA, 0.7 M NaCl, 0.1 M Tris-Cl, pH 8.0), y 700 μ l de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1) y se agitó antes de centrifugar a 13,000 rpm por 5 minutos. El nuevo sobrenadante es tratado con 500 μ l isopropanol frío y 30 μ l de acetato de sodio 3M, agitándose varias veces para luego refrigerarse hasta el día siguiente. Luego, cada tubo es centrifugado a 13,000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante es eliminado por inversión del tubo, dejándolo así breves segundos para secar las últimas gotas con papel toalla. Luego se agrega 1 ml de alcohol absoluto helado, al 70 %, y se lava por agitación. Se centrifuga a 13,000 rpm por 10 minutos, para eliminar el sobrenadante, y se repite dos veces más con alcohol helado al 95%. El pellet es secado a temperatura ambiente dejando los tubos abiertos en un recipiente limpio y seco. Luego, se agrega 50 μ l de buffer Tris-EDTA (0.5 M EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0) y 1 μ l de RNAasa 10mg/ml (Fermentas), y se incubó a 37°C por una hora. Se guarda en congelación agregando 50 μ l más de agua pura a cada tubo. Cada tubo es cuantificado usando un espectrofotómetro Nanodrop™ (Thermo Sci.).

Para los trabajos de PCR se utilizaron *primers* de microsatélites publicados por Federman *et al.* (2011). Los *primers* escogidos se muestran en la tabla 1. La reacción de PCR se hizo con 20-60 ng de ADN, 0.2 μ M de cada oligo, 1.5 mM de DNTPS y 0.5 unidades de Taq polimerasa. El *master mix* fue colocado en un termociclador modelo 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EE. UU.) usando el siguiente programa de amplificación: 94°C de denaturación inicial por 5 minutos, seguido de

TABLA 1
CARACTERIZACIÓN DE LOS MARCADORES MICROSATÉLITE SELECCIONADOS (*) PARA EL ESTUDIO DE VEINTE INDIVIDUOS DE MAURITIA FLEXUOSA, DE LA COLECCIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA ALPUHAYO-IIAP.

Código	T _m	Nº Alelos	Tamaño pb	Secuencia repetitiva	Iniciador izquierdo	Iniciador derecho
Mf13	57°C	10	230-264	(CT)14	TTACAAGCGACCCCTCGT	CGTCGAATAGGGTTTCAGTGG
Mf17	54°C	10	210-232	(GA)18	GACAGCTTGTCATCCTCG	TTCCATCCCAGTTCTCCCC
Mf19	57°C	7	239-261	(CT)10	AGCCACGTGACACTCTAC	CTATAGGACCGGCCACCTG
Mf28	57°C	8	184-200	(GA)9(GC) (GA)11	TCCCACACTCTCTTGCCA C	TGAGGGCTGCGTTATGGTC
Mf30	57°C	6	231-245	(CT)14	GAGGGGAGCTTCCTTGCT	ATTGGCGAAGGTCCAGGG
Mf33	57°C	6	215-229	(CT)10	TGCCGCATTTAGGCTTTG	GGCCGGCGATTATAACGG

(*) Ferderman, S. *et al.* (2012)

35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54-57°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los amplicones se evaluaron ya sea en geles de agarosa al 3% teñidos con sybr® Safe dna Gel Stain (Invitrogen), o en geles de poliacrilamida al 6%, teñidos con nitrato de plata según el método de Bassam *et al.* (1991). El registro de los alelos se hizo mediante el tamaño de pares de bases usando un patrón de pesos moleculares de 50 pb (estándares 50-1000 pb). Para las frecuencias de alelos y genotipos se asumió que la observación de un solo alelo corresponde a la condición de homocigosis, por tanto no hay alelos nulos (Martínez y Vega, 2002). Se utilizó el programa GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) para los análisis genéticos. Se usó una matriz de 0/1 para calcular la similitud genética con el coeficiente dice usando el subprograma simqual y la matriz resultante empleada para construir el dendrograma usando Sequential Agglomerative Hierarchical Nesting (SAHN) basada en el método de agrupamiento UPGMA implementada en el programa NTSYS-PC (versión 2.1) (Rohlf, 1992) para inferir las relaciones genéticas.

Resultados y discusión

La extracción fue relativamente óptima para cada muestra obteniéndose en promedio 135 ng/ul de ADN, y una relación A260/A230 mayor a 1.5 ideal para trabajos con PCR. La figura 1 muestra la calidad de la extracción antes de la cuantificación.

Para los trabajos con PCR se logró amplificar cuatro marcadores microsatélite de los seis seleccionados. La figura 2 muestra el patrón de bandas de los marcadores mf13, mf30 y mf33.

El número de alelos por locus estuvo entre cuatro a ocho, con un promedio de 3.3 en los cuatro loci evaluados (tabla 2). Asimismo muestra al marcador mf13 como el loci con mayor cantidad de alelos y cercano al reportado en el trabajo de Federman *et al.*; y al marcador mf19 con menor número de alelos ubicados.

Pocillos:

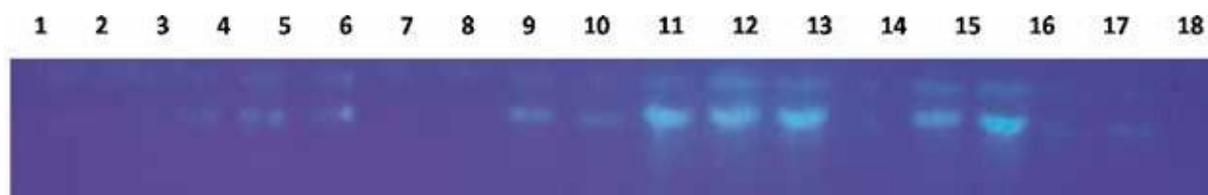


Figura 1. Calidad del ADN extraído de *Mauritia flexuosa*, por el método CTAB. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Safe® (Invitrogen).

TABLA 2
NÚMERO DE ALELOS DETECTADOS POR LOCUS

MARCADOR	Nº ALELOS	REFERENCIA
Mf13	8	10
Mf19	4	7
Mf30	4	6
Mf33	4	6
Total	20	29
Promedio	3.33	
DS	2	

El valor del PIC para cada alelo que se registró en este estudio preliminar, está en el orden de 0.65 a 0.71, casi homogéneo en cuanto a la variabilidad entre los marcadores microsatélite utilizados, considerándose aceptable para su uso para estudios posteriores con otras poblaciones de aguaje. Los loci mf13 y mf30 produjeron los máximos valores PIC.

En este estudio no se detectaron alelos nulos, es decir ausencia de un producto de amplificación por PCR. Algunos microsatélites no se pudieron amplificar en su momento debido especialmente a la falta de tiempo para el proceso de estandarización, por ello no podemos descartar aún el uso de los marcadores mf17 y mf28.

De acuerdo a Nei (), entre los veinte individuos, el nivel superior de diversidad genética fue observado con el loci mf13 (0.8) y el nivel más bajo con el loci mf33 (0.45), con un promedio de diversidad genética de 0.462. Faltaría determinar la diversidad genética de otras poblaciones para tener una mayor noción de la diversidad de nuestra población estudiada.

Considerando que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, el F_{st} de la población fue en promedio 0.021, muy por debajo de lo encontrado por Aspajo *et al.* (2008) que estudió poblaciones de aguaje de tres localidades amazónicas. El encontró mayor diferenciación genética entre las poblaciones con un promedio de F_{st} de 0.23. Igual valor hallan Picanco *et al.* (2011) en un estudio con AFLP().

El análisis de agrupamiento usando UPGMA se muestra en la figura 3. Se observa variación genética con una distancia promedio de 0.59. El análisis dividió dos grupos similares uno a una distancia promedio de 0.8 y otro una distancia de promedio de 0.65. En ambos grupos tanto individuos femeninos (muestras R1 a R10) y masculinos (R11- R20) se encuentran mezclados uniformemente.

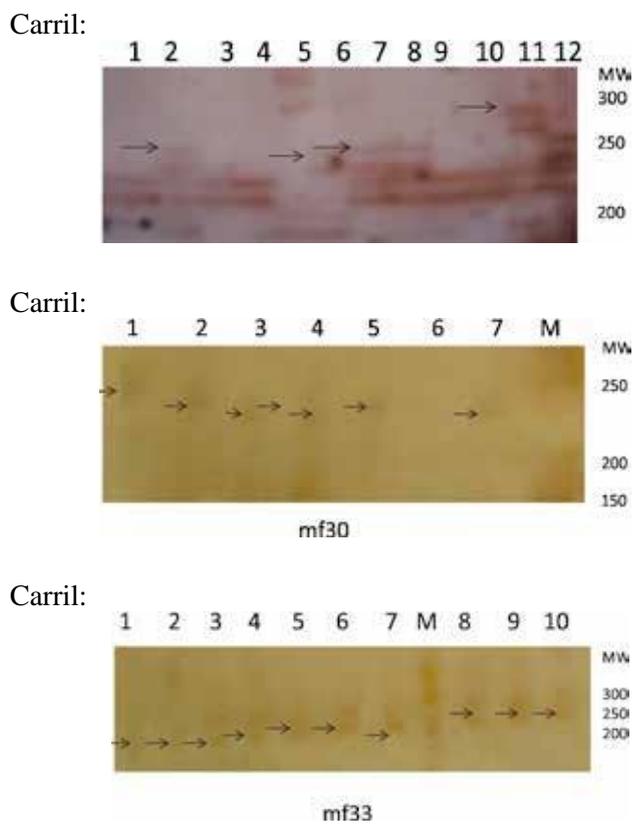


Figura 2. Patrón de bandas de microsatélites mf13, mf30 y mf33 en geles de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata.

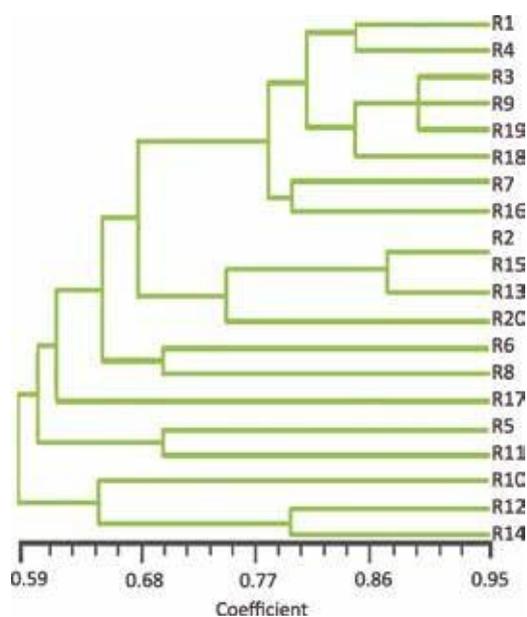


Figura 3. Análisis de agrupamiento de las relaciones genéticas de los veinte individuos (R1-R20) de *Mauritia flexuosa* según el método UPGMA: distancia estándar

Conclusiones

- i. Se han evaluado cuatro marcadores microsatélites de seis escogidos, del artículo de Federman *et al.* (2012).
- ii. Se observa una variación alélica de 3.3 alelos por locus, bajo a lo esperado en el artículo de Federman para los cuatro alelos evaluados (4.83).
- iii. Hay una heterocigocidad entre los individuos evaluados de 4.33 en promedio.
- iv. Sin embargo, se pueden diferenciar dos grupos muy similares entre sí, con poca distancia genética entre ellos.
- v. La población estudiada presenta *Fst* promedio de 0.021 indicando poca diferenciación genética entre los individuos.

Bibliografía

- ASPAJO, F., A. RODRÍGUEZ, M. CORAZÓN-GUUVIN, L. FREITAS, D. DEL CASTILLO, D. CASTRO, M. GARCÍA, J-F. RENNO, GARCÍA-DÁVILA. (2008). «Caracterización genética de los morfotipos de aguaje *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae) y análisis de la variabilidad de tres poblaciones naturales en la Amazonía peruana». *Folia Amazónica* 17: 75-82.
- BASSAM, B. J., G. CAETANO-ANOLLÉS, P. M. GRESSHOFF. (1991). «Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels». *Anal Biochem* 196: 80-83.
- BHAT, Z., W. DHILLON, R. RASHID, W. DAR BHAT Y M. GA- NAIK. (2010). «The role of molecular markers in improvement of fruit crops». *Not. Sci. Biol.* 2:22-30.
- DOYLE, J. J. Y J. L. DOYLE. (1987). «A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue». *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- DRANSFIELD J., N.W. UHL, C. B. ASMUSSEN, W. J. BAKER, M. M. HARLEY, C. E. LEWIS (2005). «A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae». *Kew Bull.* 60: 559-569.
- FEDERMAN, S., CH. HYSENI, W. CLEMENT Y A. CACCONE. (2012). «Isolation of 13 novel highly polymorphic microsatellite loci for the Amazonian Palm *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae)». *Conservation Genet Resource* 4: 355-357.
- FREITAS, L., M. PINEDO, C. LINARES, Y T. DEL CASTILLO. (2006). *Descriptores para el aguaje (Mauritia flexuosa L.f.)*. Documento Técnico N° 30. IQUITOS: IIAP.
- MARTÍNEZ, A., Y J. L. VEGA. (2002). «Estudios de variación genética utilizando microsatélites de ADN». IV Curso Internacional sobre la Conservación y Utilización de las Razas de Animales Domésticos Locales en Sistemas de Explotación Tradicionales. Universidad de Córdoba, España. 10pp.

- MENEZES, E. V., W. F. S. SOUTO, A. Y. CIAMPI, V. C., R. AZEVEDO, H. M. VALÉRIO Y M. A. S. PIMENTA. (2012). «Development and characterization of DNA microsatellite primers for buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.)». *Gen Mol Res.*
- PEAKALL, R. Y P. SMOUSE. (2012). «GenAlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-un update». *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- PICANCO, L., M. GOMES, J. DA SILVA, W. SILVA, P. COSTA Y L. SERRAO. (2011). «Genetic diversity in natural population of Butiri (*Mauritia flexuosa* L.f.)». *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 11: 216-223.
- RAMANATHA, V. Y T. HODKING. (2002). «Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- ROHFL, F. J. (1992). «NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis systems». Version 2.1. *Exeter Publishing*. Nueva York.
- SOSA, P., F. BATISTA, N. BOUZA Y M. GONZALES. (2002). «La conservación genética de las especies vegetales amenazadas». En *Biología de la conservación de plantas amenazadas*, pp. 133-160. Disponible en <<http://hdl.handle.net/10553/1285>>.
- VALDIVIA, I. G. (1995). «Variación de la densidad poblacional de *Mauritia flexuosa* L.f. aguaje, según asociación florística en la quebrada Yanacurio Marañón». Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 73 pp.