



REVISTA IMPACTO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Artículo de investigación

Regiones cloroplásticas como herramientas para la identificación molecular de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. en Paraguay

Liliana Noelia Talavera Stefani^{1*} y Cinthia Noemí Burgos Cantoni¹

¹Facultad de Ciencias y Tecnología-Universidad Nacional de Itapúa, Paraguay.

*Autor de correspondencia: Liliana Noelia Talavera Stefani; ltalavera@cyt.uni.edu.py

Recibido: 29/12/2020 Aceptado: 19/10/2022

Resumen

El género *Campomanesia* (Myrtaceae) tiene varios representantes en Paraguay, entre los que se encuentran *C. xanthocarpa* (guavira pytã), especie destacada por su utilización en medicina tradicional y alimentación, y que junto con otras especies co-genéricas forma parte de la dieta de comunidades mbya guaraní. El objetivo de este trabajo fue seleccionar regiones cloroplásticas de *C. xanthocarpa* que puedan utilizarse para *DNA barcoding* y como herramientas para estudios filogeográficos. La búsqueda de secuencias disponibles en el GenBank permitió identificar que hay disponibles solo 12 accesiones de regiones cloroplásticas para esta especie, ninguna correspondiente a especímenes de Paraguay. El análisis de las mismas permitió identificar cinco sitios polimórficos para *C. xanthocarpa* en secuencias del gen *matk*, pudiendo esta región ser utilizada para estudios filogeográficos. En las accesiones correspondientes al gen *RuBisCO* no se encontró ningún sitio polimórfico. El alineamiento con secuencias de especies cogenéricas identificó sitios que podrían ser específicos. Este análisis deja en evidencia la utilidad de estas regiones cloroplásticas y la necesidad de analizar estas y otras, en poblaciones de Paraguay, de manera de identificar polimorfismos y sitios variables interespecíficos útiles para caracterizar poblaciones de esta especie, así como en la identificación y trazabilidad de la misma.

Palabras clave: Cloroplasto, Código de barras genético, guavira pytã, *Campomanesia xanthocarpa*



Abstract

The genus *Campomanesia* (Myrtaceae) has several representatives in Paraguay, among which are *C. xanthocarpa*, a species noted for its use in traditional medicine and food, along with other co-generic species is part of the diet of Mbya Guaraní communities. The aim of this work is to select chloroplastic regions of *C. xanthocarpa* that is used for DNA barcoding and as tools for phylogeographic studies. The search for sequences available in GenBank identified that there are only 12 accessions of chloroplastic regions available for this species, none corresponding to specimens from Paraguay. The analysis of them allowed to identify 5 polymorphic sites for *C. xanthocarpa* in sequences of the *matk* gene, being able this region to be used for phylogeographic studies. In the accessions corresponding to the *RuBisCO* gene, no polymorphic sites were found. Alignment with cogeneric species sequences identified sites that could be specific. This analysis shows the usefulness of these regions and the need to analyze these and others in populations of Paraguay, in order to identify polymorphisms and interspecific variable sites useful to characterize populations of this species, as well as in the identification and traceability of the same.

Keywords: Chloroplast, DNA barcoding, guavira pytã, *Campomanesia xanthocarpa*.

1. Introducción

El género *Campomanesia* Ruiz y Pav. (Myrtaceae) está representado por arbustos o árboles, perennes o caducifolios, con hojas simples, opuestas, membranosas, duras o coriáceas, con venación usualmente broquidódroma y numerosas venas laterales. Sus flores son hermafroditas, axilares, pedunculadas, con dos bractéolas pequeñas, no foliáceas, caducas o persistentes. Su fruto es una baya subglobosa generalmente dulce, con una o cuatro semillas (1, 2).

En cuanto a las especies que representan a este género en Paraguay se encuentran discrepancias en la bibliografía, en el Manual de Familias y Géneros de árboles del Paraguay se menciona que son cuatro (1), en cambio, en el Informe sobre el estado de la biodiversidad para la alimentación y la agricultura de Paraguay se menciona que son seis las especies silvestres de este género, *C. xanthocarpa* O. Berg. (guavira pytã), *C. adamantium* (Cambess) O. Berg (guaviroba), *C. guazumaefolia* (Cambess) O. Berg (ñandu apysa ñu), *C. obversa* y *C. pubescens* (D.C.) Berg (guavira pytã) (3). Entre las especies mencionadas, *C. xanthocarpa* se destaca por su utilización en la medicina tradicional y como comestible, dado que sus frutos poseen alto valor nutricional y son consumidos, por ejemplo, junto a los de *C. guazumifolia* y



C. pubescens por las comunidades Mbyá - Guaraní de la Reserva Parque Nacional San Rafael de Itapúa, aunque en el caso del “guavira pytã” también se consume el tallo (3, 4).

En un relevamiento de la flora de los bosques degradados del Bosque Atlántico del Alto Paraná (BAAPA), se ha encontrado al “guavira pytã” formando parte de estos relictos (5). El BAAPA representa el remanente del Bosque Atlántico en Paraguay, un área de gran diversidad biológica pero que ha perdido por lo menos el 70 % de cobertura vegetal, quedando hoy en día solo remanentes boscosos (6, 7), entonces, es probable que las poblaciones naturales de esta especie se encuentren reducidas.

En hábitats degradados, los programas de manejo de poblaciones arbóreas utilizan marcadores moleculares como herramientas para analizar la variabilidad genética existente, entender patrones filogeográficos y la historia de las poblaciones (8, 9).

Las plantas poseen, además del genoma nuclear, genoma citoplasmático, tanto en mitocondrias como en cloroplastos, cada uno de ellos posee genes esenciales para sus funciones, ambos genomas citoplasmáticos difieren tanto en tamaño como en estructura (10). La diferencia en la forma de transmisión y en patrones de evolución, hace que el análisis de genealogías a través de estos dos tipos de ADN refleje diferentes aspectos de la historia y biología de una población (11, 12). El genoma citoplasmático más utilizado, tanto para análisis filogenéticos como filogeográficos o estructuración espacial, es el cloroplástico (ADNcp) (12, 13). El ADNcp es haploide, de herencia uniparental, exhibe poca o ninguna recombinación y presenta una tasa evolutiva diferente a la observada en el ADN nuclear (ADNn) (14). Además, ciertas regiones cloroplásticas son utilizadas como código de barras genético (*DNA barcoding*) en la identificación molecular de plantas (12).

Actualmente, son pocos los estudios que abordan la caracterización de esta especie en la región, no obstante, la necesidad para el manejo y el uso de la especie (15, 17). En Paraguay no existen aún estudios enfocados en caracterizar estas poblaciones remanentes, si bien se está llevando a cabo otro tipo de análisis con el fin de establecer la utilidad de los extractos de plantas de *C. xanthocarpa* procedentes de Itapúa (16). Por ello, el objetivo de este trabajo es seleccionar regiones cloroplásticas de *Campomanesia xanthocarpa* para ser empleadas en la identificación de la especie (*DNA barcoding*) y como posibles herramientas para analizar la variabilidad genética de las poblaciones de *C. xanthocarpa* de Paraguay y el establecimiento de relaciones filogeográficas entre mismas.



2. Materiales y Métodos

Se realizó una búsqueda en la base de datos GenBank de las accesiones disponibles con secuencias cloroplásticas de *C. xanthocarpa* y especies cogenéricas.

Para los análisis subsiguientes se seleccionaron los accesos que poseen el mayor número de secuencias disponibles para *C. xanthocarpa*.

Con las secuencias se prepararon archivos multifasta de las regiones a analizar para ser utilizados como archivos de entrada. El alineamiento múltiple fue realizado utilizando la herramienta Clustal W dentro del software BioEdit, utilizando los parámetros de alineamiento múltiple completo con 1000 *bootstraps* (18), posteriormente fue utilizado el software DnaSP (19) para la búsqueda de polimorfismos y análisis de las regiones.

3. Resultados y Discusión

3.1. Secuencias cloroplásticas disponibles de *C. xanthocarpa* en el GenBank.

Existen 12 accesiones de secuencias cloroplásticas de *C. xanthocarpa* en el Genbank, entre las que se encuentran:

- KY392760, acceso correspondiente al genoma cloroplástico completo, secuenciado a partir de un espécimen de Brasil (14).
- MG973217.1 y MG973216.1, secuencias microsátelites cloroplásticas polimórficas (21).
- MG718417.1, KF561906.1, KF561905.1 y KF561904.1, secuencias parciales de la subunidad larga del gen de la *RuBisCO* (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) (18, 19).
- MG718927.1, KF555387.1 y KF555386.1, secuencias parciales del gen *MatK* (*Maturasa k*) (18, 19).
- KF421071.1 y KF421071.1, secuencias parciales del gen *PsbA* y región intergénica *psbA-trnH* (23).

3.2. Secuencias parciales del gen *matK*

Se obtuvo un alineamiento de 771 pb, con las tres secuencias parciales del gen *matk* y la región correspondiente al gen *matk* obtenida del genoma completo de *C. xanthocarpa*, encontrándose cinco sitios polimórficos (Tabla 1).



Tabla 1. Sitios polimórficos encontrados en el alineamiento de las regiones parciales del gen *matK* para *C. xanthocarpa*.

Número de acceso	Posición ¹				
	652	748	929	942	1019
MG718927.1	G	G	C	A	C
KF555387.1	A	G	C	C	T
KF555386.1	A	A	G	A	C
KY392760.1:c3698-2184v	G	G	C	A	C

¹Las posiciones hacen referencia al acceso KY392760.1:c3698-2184v

Se realizó además un alineamiento con secuencias disponibles para *C. guazumifolia* (MG718926.1) y *C. guavirova* (MG718609.1). Analizando los sitios variables, se identificaron tres variantes, A/C, A/G y T/G solo en la secuencia correspondiente al *C. guazumifolia* (posición 729, 772 y 1177, respectivamente, en referencia a KY392760.1:c3698-2184v), estos sitios podrían utilizarse para el diseño de cebadores específicos que diferencien entre *C. xanthocarpa* y *C. guazumifolia*, aunque sería necesaria la caracterización de esta región en poblaciones paraguayas para definir la utilización de estos sitios. Los genes *matK*, *psbA-trnH* y *trnL* son mencionados como herramientas interesantes para DNA *barcoding* para estudios de plantas tropicales, debido a su amplia disponibilidad en las bases de datos (22).

3.3. Secuencias parciales de la RuBisCO

Se alinearon las cuatro secuencias disponibles para *C. xanthocarpa* de la RuBisCO, obteniéndose un alineamiento de 537 pb, no encontrándose a lo largo de esta región ni un solo sitio variante. Del alineamiento obtenido (505 pb) agregando secuencias de *C. guaviroba* (MG833623.1 y MG718057.1) y *C. guazumifolia* (MG718416.1), se observaron tres sitios polimórficos (Tabla 2).

Tabla 2. Sitios polimórficos encontrados en el alineamiento de las regiones parciales de la RuBisCO para géneros de *Campomanesia* identificados en Paraguay y disponibles en el GenBank.

Número de acceso	Posición ¹		
	73	245	246
MG718417.1, KF561906.1, KF561905.1 y KF561904.1	A	C	C
MG833623.1- <i>C. guaviroba</i>	A	G	G
MG718416.1- <i>C. guazumifolia</i>	C	G	C
MG718057.1- <i>C. guaviroba</i>	A	C	C

¹Las posiciones hacen referencia al acceso KF561906.1



Considerando la ausencia de variantes en las secuencias correspondientes a *C. xanthocarpa*, esta región podría ser utilizada como *DNA barcoding*. Además, la variante encontrada únicamente en la secuencia correspondiente a *C. guazumifolia* podría también servir para el diseño de cebadores específicos que permitan la identificación de la especie por medio de amplificación y posterior electroforesis sin necesidad de secuenciación.

La utilización de cebadores universales permite la amplificación de estas regiones cloroplásticas en casi todas las especies vegetales (24–26), lo que las convierte en herramientas útiles para ser empleadas como *DNA barcoding*, y para estudios filogeográficos. Con relación a *C. pubescens*, también utilizada en Paraguay, se ha establecido que no posee accesos para las regiones analizadas, ni tampoco tiene secuenciado el genoma cloroplástico, de manera que no se pudieron realizar comparaciones.

El análisis del genoma cloroplástico completo de varias especies de la familia Myrtaceae incluida *C. xanthocarpa*, señaló a la región *ycf2* como prometedora para la identificación de especies (20), sin embargo, en este trabajo no se pudo evaluar la variación intraespecífica debido a la falta de otras secuencias disponibles.

4. Conclusiones

La especie *C. xanthocarpa* tiene disponibles únicamente 12 accesiones de regiones cloroplásticas en la base de datos del GenBank, ninguna de ellas corresponde a especímenes de Paraguay. Mediante la comparación de las secuencias disponibles de varios especímenes de “guavira pytã” para la región RuBisCO y *matK*, se identificaron regiones polimórficas únicamente en la región parcial *matK*, y ningún polimorfismo para RuBisCO, pudiendo ser la región *matk*, además de utilizada para identificación molecular de la especie, un marcador para análisis filogeográficos. En cuanto a sitios variables entre las secuencias disponibles para especies cogenéricas se encontraron algunas posiciones que podrían ser específicas, aunque se deben caracterizar estas regiones, así como otras, por ejemplo, las regiones *trnL*, tanto para poblaciones paraguayas de *C. xanthocarpa* como especies cogenéricas de interés y simpátricas, tanto para búsqueda de sitios polimórficos, como de variaciones específicas de especie.

Conflicto de interés: Los autores declaran que no existen conflictos de interés en la información presentada.



Agradecimientos: A la Facultad de Ciencias y Tecnología por el apoyo y fomento a la investigación.

Bibliografía

1. PEREZ DE MOLAS, Lidia Forencia. *Manual de Familias y Géneros de Árboles del Paraguay*. San Lorenzo, 2016. ISBN 9789253094028.
2. ROTMAN, Alicia D. Revisión del género *Campomanesia* en la Argentina (Myrtaceae). *Darwiniana*. 1976. Vol. 20, no. 3/4, p. 327–340.
3. FAO. *El estado de la biodiversidad para la alimentación y la agricultura. Informe de país: Paraguay*. 2017.
4. DUJAK, Marcelo, FERRUCCI, M.S., VERA JIMENEZ, M., PINEDA, J., CHAPARRO, E. and BRÍTEZ, M. Registros sobre las especies vegetales alimenticias utilizadas por dos comunidades indígenas Mbyá-Guaraní de la Reserva Parque Nacional San Rafael, Itapúa-Paraguay. *Steviana*. 2015. Vol. 7, p. 25–47.
5. BARNI, M.M., DÍAZ LEZCANO, M.I. and VERA DE ORTÍZ, M. Composición florística y abundancia de los bosques degradados del BAAPA. In : *III Congreso Nacional de Ciencias Agrarias*. 2014. p. 408–410. ISBN 3494226636.
6. MYERS, Norman, MITTERMEIER, Russell A, MITTERMEIER, Cristina G, DA FONSECA, G A B and KENT, Jennifer. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000. Vol. 403, no. 6772, p. 853–858. DOI 10.1038/35002501.
7. SEAM. *Informe Nacional Áreas Silvestres Protegidas del Paraguay*. 2007.
8. HOFNER, Johannes, KLEIN-RAUFHAKE, Theresa, LAMPEI, Christian, MUDRAK, Ondrej, BUCCHAROVA, Anna and DURKA, Walter. Populations restored using regional seed are genetically diverse and similar to natural populations in the region. *Journal of Applied Ecology*, 2022, vol. 59, no 9, p. 2234-2244.
9. YANG, Jing, CAI, Lei, LIU, Detuan, CHEN, Gao, GRATZFELD, Joachim and SUN, Weibang. China's conservation program on Plant Species with Extremely Small Populations (PSESP): Progress and perspectives. *Biological Conservation*. 1 April 2020. Vol. 244. DOI 10.1016/j.biocon.2020.108535.
10. MORLEY, Stewart A., AHMAD, Niaz and NIELSEN, Brent L. Plant organelle genome replication. *Plants*. 1 October 2019. Vol. 8, no. 10. DOI 10.3390/plants8100358.
11. SUNNUCKS, Paul. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 2000. Vol. 15, no. 5, p. 199–203. DOI 10.1016/S0169-5347(00)01825-5.
12. SCARCELLI, Nora. Population Genomics of Organelle Genomes in Crop Plants. 2020.
13. MORRIS, Ashley B, SHAW, Joey and ASHLEY MORRIS, Correspondence B. Markers in time and space: A review of the last decade of plant phylogeographic approaches. *Molecular Ecology*. 2018. Vol. 27, p. 2317–2333. DOI 10.1111/mec.14695.



14. MCCAULEY, D E. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)*. 1995. Vol. 10, no. 5, p. 198–202. DOI 10.1016/S0169-5347(00)89052-7.
15. CORNACINI, Maiara R., MANOEL, Ricardo O., ALCANTARA, Marcelo A.M., MORAES, Mário L.T., SILVA, Edvaldo A.A., PEREIRA NETO, Leonel G., SEBBENN, Alexandre M., ROSSINI, Bruno C. and MARINO, Celso L. Detection and application of novel SSR markers from transcriptome data for *Astronium fraxinifolium* Schott, a threatened Brazilian tree species. *Molecular Biology Reports*. 1 April 2021. Vol. 48, no. 4, p. 3165–3172. DOI 10.1007/s11033-021-06338-5.
16. BURGOS CANTONI, Cinthia Noemí. Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos y aceite esencial de *Campomanesia xanthocarpa* (guavirá). *REVISTA IMPACTO*. 2021. Vol. 1, no. 1, p. 35–46.
17. HOMCZINSKI, Isabel, LERNER, Jocasta, PERES, Fabiana Schmidt Bandeira, GASPARIN, Ezequiel, MACHADO, Sebastião Do Amaral and TAMBARUSSI, Evandro Vagner. Molecular and quantitative genetic analysis of the neotropical tree *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg. *Annals of Forest Research*. 2022. Vol. 65, no. 1, p. 111–126. DOI 10.15287/afr.2022.2223.
18. HALL, T.A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. 1999. ISBN 0261-3166.
19. LIBRADO, P. and ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009. Vol. 25, no. 11, p. 1451–1452. DOI 10.1093/bioinformatics/btp187.
20. MACHADO, Lilian de Oliveira, VIEIRA, Leila Do Nascimento, STEFENON, Valdir Marcos, FAORO, Helisson, PEDROSA, Fábio de Oliveira, GUERRA, Miguel Pedro and NODARI, Rubens Onofre. Molecular relationships of *campomanesia xanthocarpa* within myrtaceae based on the complete plastome sequence and on the plastid *ycf2* gene. *Genetics and Molecular Biology*. 2020. Vol. 43, no. 2, p. 1–14. DOI 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0377.
21. PETRY, Vanessa Samara. *VALIDAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE Campomanesia xanthocarpa (Mart.) O. Berg Dissertação*. Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
22. DE LIMA, Renato A.Ferreira, DE OLIVEIRA, Alexandre Adalardo, COLLETTA, Gabriel Dalla, FLORES, Thiago Bevilacqua, COELHO, Rubens L.Gayoso, DIAS, Pedro, FREY, Gabriel Ponzoni, IRIBAR, Amaia, RODRIGUES, Ricardo Ribeiro, SOUZA, Vinícius Castro and CHAVE, Jérôme. Can plant DNA barcoding be implemented in species-rich tropical regions? A perspective from São Paulo State, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 2018. Vol. 41, no. 3, p. 661–670. DOI 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0282.



23. BOLSON, Mônica, DE CAMARGO SMIDT, Eric, BROTTTO, Marcelo Leandro and SILVA-PEREIRA, Viviane. ITS and trnH-psbA as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLoS ONE*. 2015. Vol. 10, no. 12, p. 1–18. DOI 10.1371/journal.pone.0143049.
24. YU, Jing, XUE, Juan-Hua and ZHOU, Shi-Liang. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution*. 2011. Vol. 49, no. 3, p. 176–181.
25. TABERLET, Pierre, GIELLY, Ludovic, PAUTOU, Guy and BOUVET, Jean. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecula*. 1991. Vol. 17, p. 1105–1109.
26. BIENIEK, Wojciech, MIZIANTY, Marta and SZKLARCZYK, Marek. Sequence variation at the three chloroplast loci (matK, rbcL, trnH-psbA) in the Triticeae tribe (Poaceae): comments on the relationships and utility in DNA barcoding of selected species. *Plant Systematics and Evolution*. 1 April 2015. Vol. 301, no. 4, p. 1275–1286. DOI 10.1007/s00606-014-1138-1.