



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**Caracterización molecular del portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa “Agroinnovación S.A.” mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS).**

**Autora:** Recalde Paredes, Mishell Carolina

**Director:** Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

Sangolquí, 14 de Julio de 2022



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

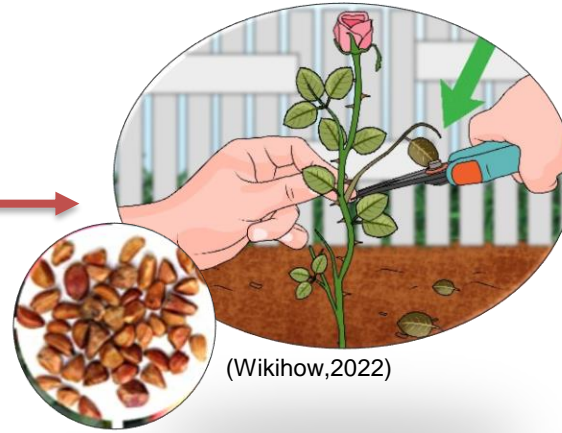
# INTRODUCCIÓN



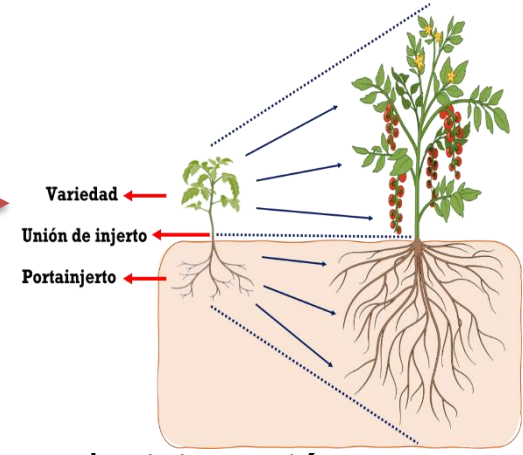
Fotografía de M. Recalde, 2022



(Darwinek,2008)



(Wikihow,2022)



La injertación (Frey, 2022)



Fotografía de M. Recalde, 2022.

## AGROINNOVACIÓN



Fotografías de M. Recalde, 2022.



Retribuir  
**SENADI**  
SERVICIO NACIONAL DE  
DERECHOS INTELECTUALES  
Inversión → Variedades  
Tiempo, dinero, recursos ,etc.



**ESPER**  
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
CAMINO A LA EXCELENCIA

Unión Internacional para la  
Protección de las  
Obtenciones Vegetales

Protección de  
variedades de rosas

**UPOV**

CUESTIONARIO TÉCNICO	
FECHA DE LA SOLICITUD: .....	USO OFICINA
NÚMERO DEL EXPEDIENTE DE LA SOLICITUD: .....	

**Directrices**

### Métodos Basados en la Aplicación de Marcadores Moleculares

- Evaluación desde etapas iniciales de desarrollo.
- Aplicación a cualquier parte vegetal
- Análisis independiente de la época del año
- Identificación sin el uso de varias características
- Expresión no sujeta al ambiente

RFLP, VNTR; RAPD, AFLP; SSR, SNP



(Eveil, 2018)

## Descriptorios Morfológicos

**Ventajas**

Fácilmente  
cuantificables e  
identificables

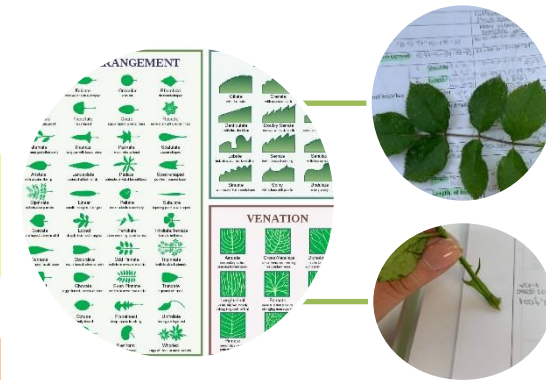
Fenotipos  
observables a  
simple vista

Discriminación  
rápida

**Desventajas**

Expresión sujeta  
a factores  
ambientales

Evaluación  
→ planta en  
estado adulto



Fotografías de M. Recalde, 2022.

### PORTAINJERTOS

Injerto realizado → No  
hay material disponible  
a simple vista

Diferencias  
morfológicas mínimas  
entre las diferentes  
variedades.



**ESPE**  
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
CAMINO A LA EXCELENCIA

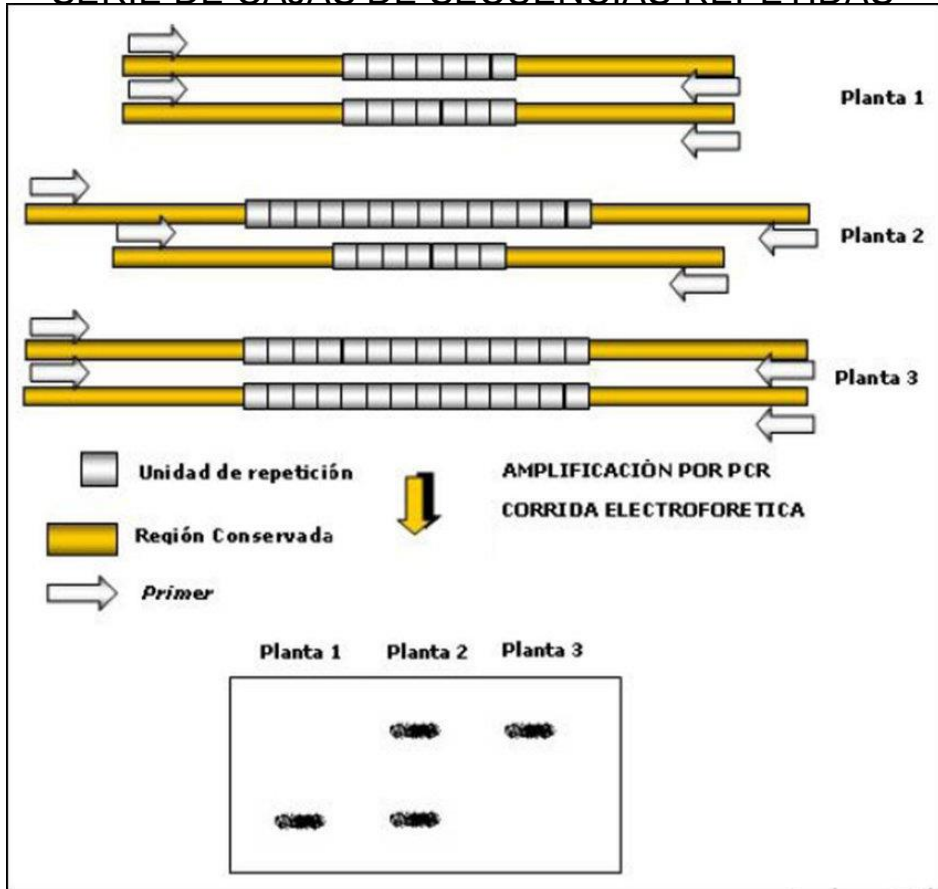
## MICROSATÉLITES

### Repeticiones en Tándem

Unidades de 2-6 nucleótidos

Repetidas de 3-50 veces

### SERIE DE CAJAS DE SECUENCIAS REPETIDAS



Regiones Flanqueantes – De copia única -Se analiza la variación en un único locus

(Costa, 2014)

### SSR, STS, STMS, SSRP, etc.

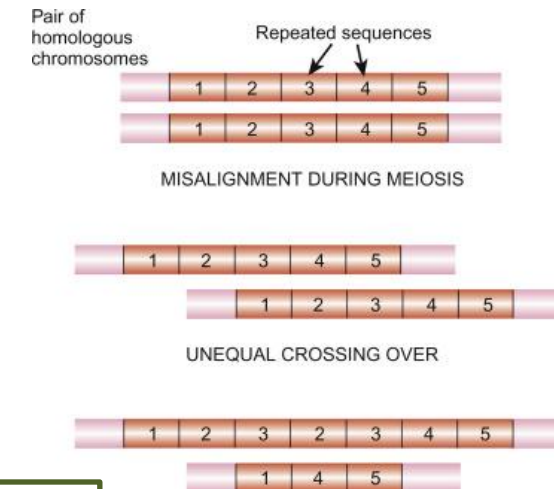
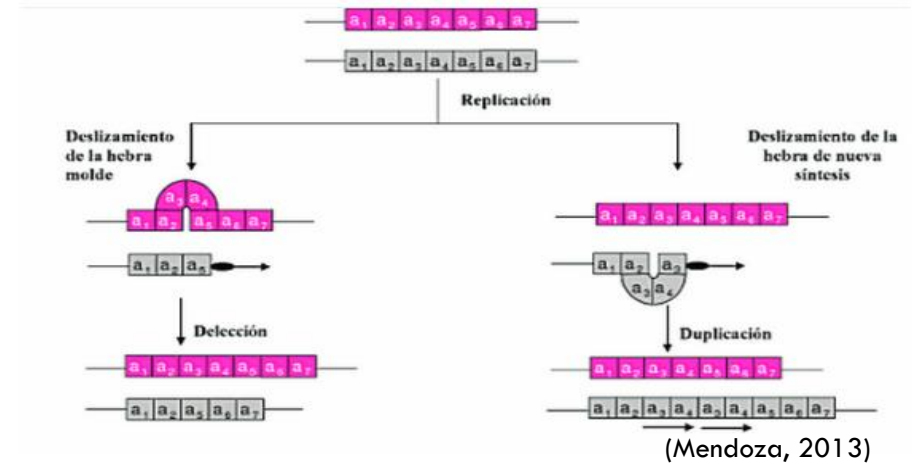
Son altamente polimórficos y proporcionan un sistema de marcador codominante

Forma abundante en plantas

### ¿POR QUE SON VARIABLES EN LONGITUD?

Desplazamiento de la polimerasa en la Replicación

Entrecruzamiento desigual



(Clark et al., 2019)

Estudios previos → factibilidad de la identificación de variedades de rosas basada en la variabilidad de microsatélites



**ESPE**  
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
CAMINO A LA EXCELENCIA

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

## Objetivo General



Caracterizar molecularmente el portainjerto de rosa #BG-1177 de la empresa “Agroinnovación S.A.” mediante el uso de microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS).

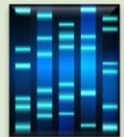
## Objetivos Específicos



Estandarizar un protocolo para la extracción de ADN de hojas del portainjerto de rosa #BG-1177.



Establecer las condiciones óptimas para la amplificación de marcadores moleculares STMS a partir de ADN de hojas del portainjerto de rosa #BG-1177.



Determinar las frecuencias alélicas específicas del portainjerto de rosa #BG-1177 mediante el uso de marcadores moleculares STMS.

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos





## Recolección del Material Vegetal

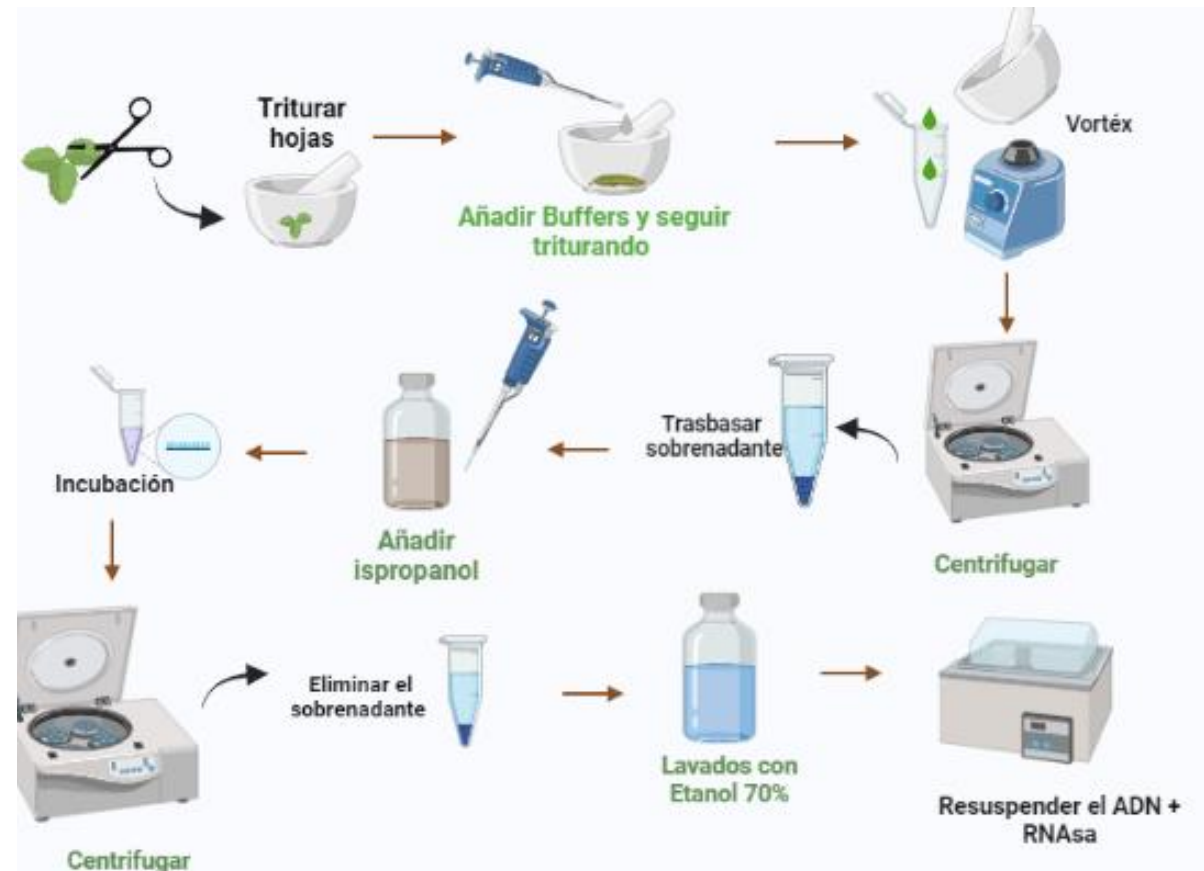
Portainjerto	#BG
1	1177
2	881
3	744
4	553
5	1178
6	837
7	1041
8	882
9	883
10	746



Fotografía de M. Recalde, 2022.

## Extracción de ADN

Extracción de ADN rápido sin Nitrógeno Líquido, por Ferdous et al., (2012).



Análisis por duplicado

## Análisis de la Cantidad, Calidad e Integridad del ADN

Cantidad del ADN →  
fluorómetro (Qubit™ 4)



Calidad del ADN →  
espectrofotómetro  
Thermo Scientific™  
NanoDrop 2000.



La integridad del ADN → Gel de  
agarosa al 1%



**ESPE**  
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
CAMINO A LA EXCELENCIA



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

## Extracción y cuantificación de ADN

**Nitrógeno Líquido** <sup>X</sup> → Conservación, almacenamiento y costos

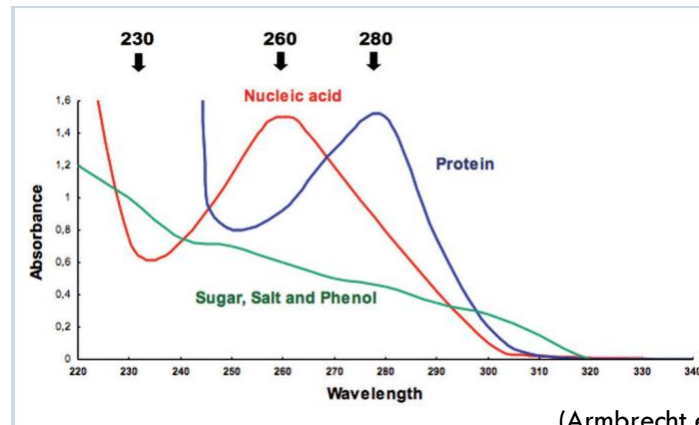
**Método CTAB** <sup>✓</sup> → Resultados favorables

Polifenóles,  
polisacáridos y  
ARN



PVP y Buffers  
de lisis con NaCl

Nº. Muestra	ID de la Muestra	Concentración- Qubit (ng/ µL)	260/280	260/230
1	1177	35,6	1,85	1,44
2	881	14,1	1,78	1,14
3	744	88,6	1,9	1,54
4	553	16,4	1,88	1,44
5	1178	39,4	1,95	1,71
6	837	15,5	1,88	1,49
7	1041	15,4	1,78	1,07
8	882	28,04	1,81	1,22
9	883	34,6	1,8	1,16
10	746	21,5	1,70	0,8

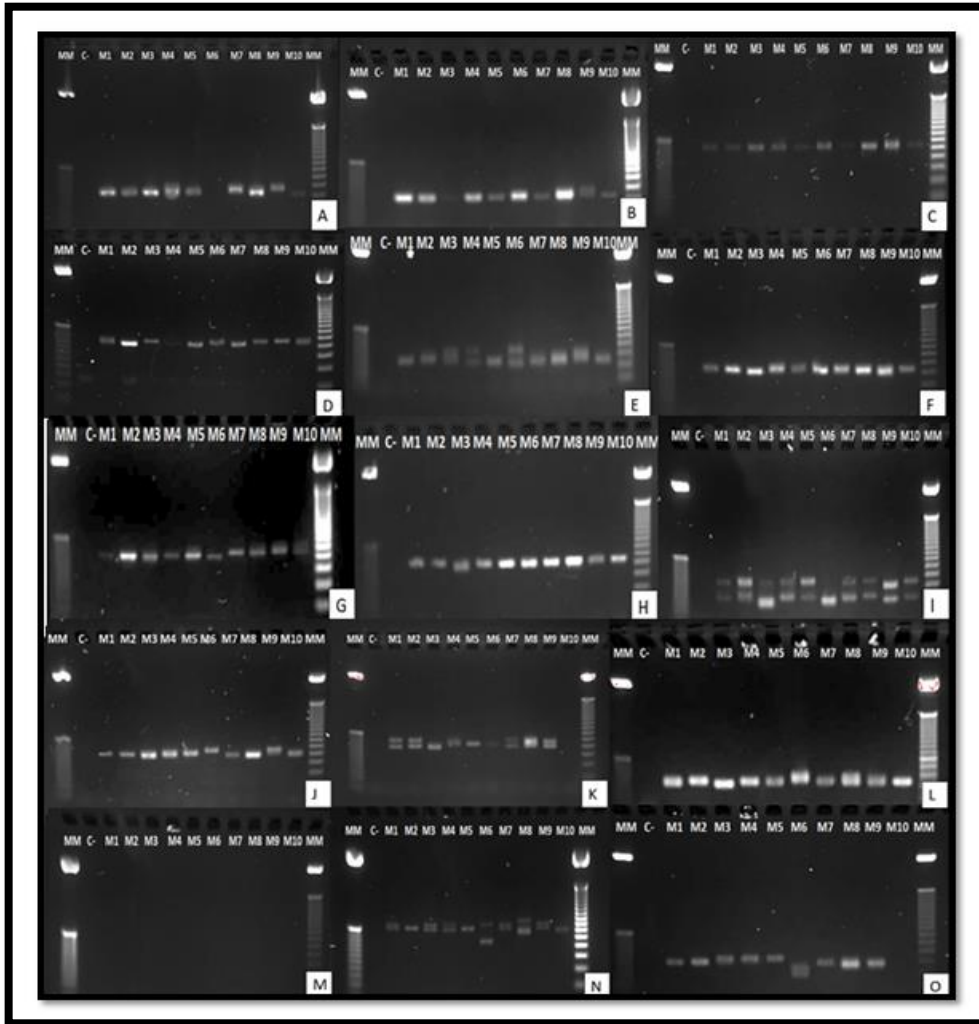


(Armbrecht et al., 2019)



**ESPE**  
ESCUOLA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
CAMINO A LA EXCELENCIA

## Geles de agarosa de los productos de amplificación de 15 marcadores STMS



Imágenes procesadas en el software Image Lab

Poca variabilidad  
alélica

- (A) RhO517
- (B) RhEO506
- (C) RhD221
- (D) RhE2b
- (E) RhB303
- (F) RhP519
- (G) RhAB40
- (H) RhD201
- (I) RhAB22
- (J) RhP50
- (K) RhP518
- (L) RhAB73
- (M) RhM405
- (N) RhAB15
- (O) RhO507

Nº. Muestra	Id de la Muestra	RhO517 (pb)	RhEO506 (pb)	RhD221 (pb)	RhE2b (pb)	RhB303 (pb)	RhP519 (pb)	RhAB40 (pb)	RhD201 (pb)
1	1177	155	102	256	204	110	165	200	186
2	881	155	102	256	190	110	165	200	186
3	744	155	102	256	204	150 - 110	150	200	173
4	553	155	102	256	204	150 - 110	165	200	186
5	1178	155	102	256	190	110	165	200	186
6	837	-	102	256	204	160-110	165	200	186
7	1041	170	102	262	204	110	165	215	186
8	882	155	114	256	221	110	165	215	200
9	883	180	130-114	262	221	150 - 110	150	232	209
10	746	155	102	262	221	110	165	232-215	209

Nº. Muestra	Id de la Muestra	RhAB22 (pb)	RhP50 (pb)	RhP518 (pb)	RhAB73 (pb)	RhM405 (pb)	RhAB15 (pb)	RhO507 (pb)
1	1177	157-100	183	239- 194	164	-	338- 300	143
2	881	157-100	183	239- 194	164	-	300	143
3	744	157-70	183	194	154	-	338- 300	161
4	553	157- 100	183	209	164	-	338- 300	161
5	1178	157-100	183	209	164	-	300	161
6	837	70	222	209	183- 164	-	345- 221	112- 91
7	1041	157- 100	183	239- 194	164	-	338- 300	143
8	882	157- 100	183	229- 194	183- 164	-	380- 293	134
9	883	145- 85	222	229- 194	175- 164	-	338- 300	134
10	746	157- 100	183	-	164	-	300	-

Se comprueba la naturaleza codominante de los marcadores

(Cadima et al.,2013; Vishwakarma et al., 2019; Vosman et al., 2006).

	STMS	Secuencias repetidas	Grupo de ligación
1	RhO517	(GAC) <sub>7</sub>	1
2	RhEO506	(CAG) <sub>8</sub> (CAA) <sub>10</sub> - 7(CAG) <sub>6</sub>	2
3	RhD221	(TCT) <sub>21-1</sub>	4
4	RhE2b	(TGT) <sub>20-8</sub>	6
5	RhB303	(GA) <sub>11</sub>	Desconocido
6	RhP519	(TGA) <sub>11-1</sub>	Desconocido
7	RhAB40	(TC) <sub>14</sub> (AC) <sub>11-1</sub>	4
8	RhD201	(TCT) <sub>33</sub>	Desconocido
9	RhAB22	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>13</sub>	6
10	RhP50	-	3
11	RhP518	(CAT) <sub>4</sub> CAATT(CAT) <sub>6</sub>	5
12	RhAB73	-	7
13	RhM405	(TCTGAT) <sub>5</sub>	Desconocido
14	RhAB15	(GT) <sub>19-2</sub> (GA) <sub>16</sub>	2
15	RhO507	-	4

	STMS	Número de alelos observados					
		A1	A2	A3	A4	A5	A6
1	RhO517	155	170	180			
2	RhEO506	102	114	130			
3	RhD221	256	262				
4	RhE2b	204	190	221			
5	RhB303	110	150	160			
6	RhP519	165	150				
7	RhAB40	200	215	232			
8	RhD201	186	173	200	209		
9	RhAB22	157	100	70	145	85	
10	RhP50	183	22				
11	RhP518	239	194	209	229		
12	RhAB73	164	154	183	175		
13	RhM405	-	-	-	-		
14	RhAB15	338	300	345	221	380	293
15	RhO507	143	161	112	91	134	

Vosman et al. (2001), Esselink et al. (2003) y Vosman et al. (2006).

(Cadima et al., 2013; Perez, 2004; Cornejo et al., 2014).



# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	STMS	Secuencias repetidas	Grupo de ligación
1	RhO517	(GAC) <sub>7</sub>	1
2	RhEO506	(CAG) <sub>8</sub> (CAA) <sub>10</sub> - 7(CAG) <sub>6</sub>	2
3	RhD221	(TCT) <sub>21-1</sub>	4
4	RhE2b	(TGT) <sub>20-8</sub>	6
5	RhB303	(GA) <sub>11</sub>	Desconocido
6	RhP519	(TGA) <sub>11-1</sub>	Desconocido
7	RhAB40	(TC) <sub>14</sub> (AC) <sub>11-1</sub>	4
8	RhD201	(TCT) <sub>33</sub>	Desconocido
9	RhAB22	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>13</sub>	6
10	RhP50	-	3
11	RhP518	(CAT) <sub>4</sub> CAATT(CAT) <sub>6</sub>	5
12	RhAB73	-	7
13	RhM405	(TCTGAT) <sub>5</sub>	Desconocido
14	RhAB15	(GT) <sub>19-2</sub> (GA) <sub>16</sub>	2
15	RhO507	-	4

Valores prácticamente idénticos

	STMS	PIC	Probabilidad de confusión (C <sub>j</sub> )	Poder discriminante (D)
1	RhO517	0,370	0,588	0,412
2	RhEO506	0,314	0,652	0,348
3	RhD221	0,420	0,533	0,467
4	RhE2b	0,620	0,311	0,689
5	RhB303	0,439	0,512	0,488
6	RhP519	0,320	0,644	0,356
7	RhAB40	0,595	0,339	0,661
8	RhD201	0,580	0,356	0,644
9	RhAB22	0,659	0,267	0,733
10	RhP50	0,320	0,461	0,539
11	RhP518	0,704	0,218	0,782
12	RhAB73	0,485	0,461	0,539
14	RhAB15	0,678	0,246	0,754
15	RhO507	0,760	0,156	0,844
	Media	0,519	0,410	0,590

$$D = 1 - C_j$$

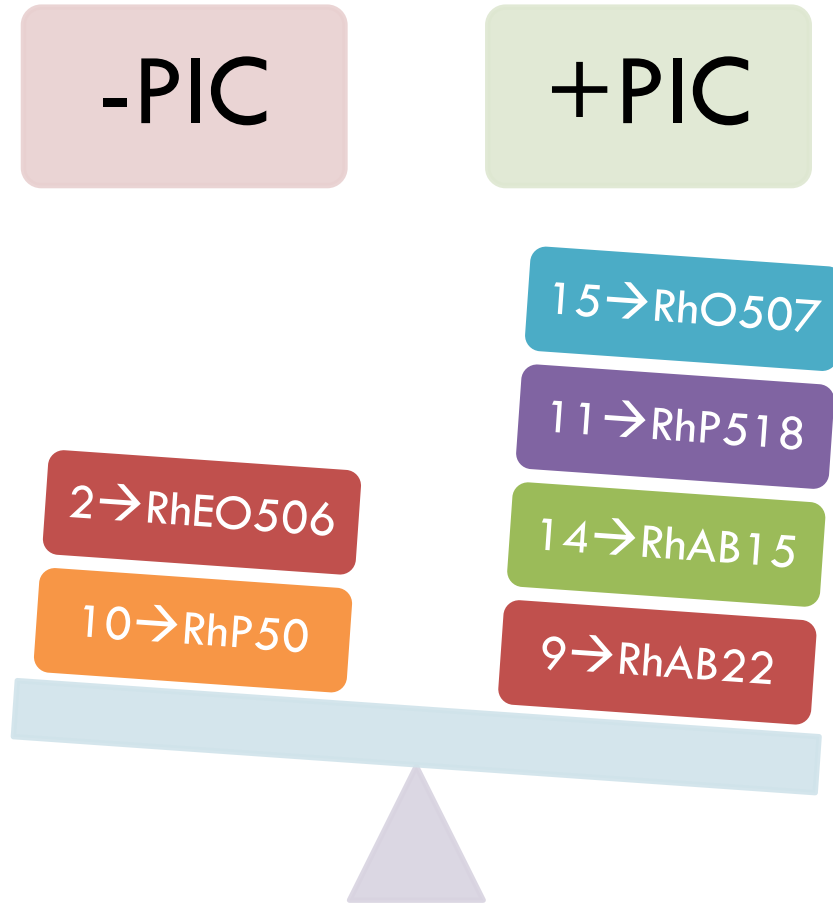
$$c_i = P_i \frac{(NP_i - 1)}{N - 1}$$

$$C_j = \sum_{i=1}^I c_i$$

Marcador excelente para la estimación de las variaciones alélicas en los genotipos

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + \sum_{i=1}^n p_i^4$$





$$Xk = \frac{N(N-1)}{2} \prod_{j=1}^k C_j$$

$$C_j = \sum_{i=1}^I c_i$$

$$c_i = P_i \frac{(NP_i - 1)}{N - 1}$$

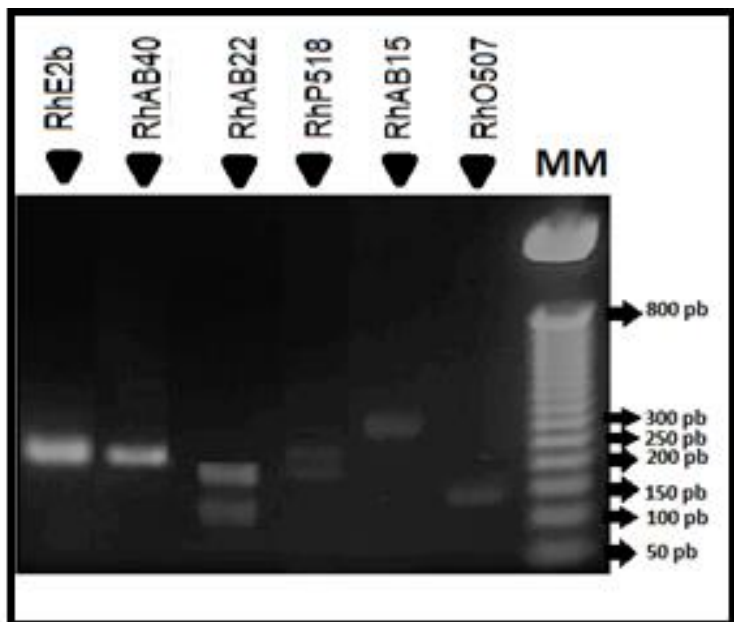
Combinaciones de Marcadores STMS	Número esperado de pares de genotipo no diferenciados (Xk)
A	7,00
A+B	1,52
A+B+C	0,38
A+B+C+D	0,10
A+B+C+D+E	0,03
A+B+C+D+E+F	0,01
A+B+C+D+E+F+G	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I+J	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I+J+K	0,00
A+B+C+D+E+F+G+H+I+J+K+L	0,00

A: RhO507, B: RhP518, C: RhAB15, D: RhAB22, E: RhE2b, F: RhAB40, G: RhD201,  
H: RhAB73, I: RhB303, J: RhD221, K: RhO517, L: RhP519

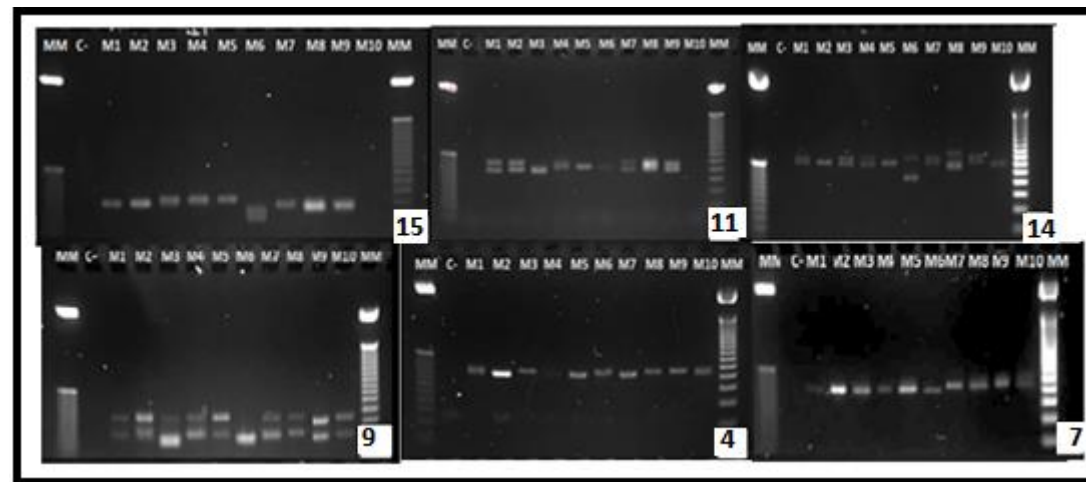


4) RhE2b, 7) RhAB40, 9) RhAB22, 11) RhP518, 14) RhAB15; 15) RhO507

Huella genética del portainjerto de rosa #BG-1177 mediante el uso de 6 STMS



Marcadores STMS que permiten diferenciar al portainjerto #BG-1177 de las diferentes muestras estudiadas



Productos de amplificación del conjunto de los 6 marcadores STMS más informativos.

Nº. Muestra	ID de la Muestra	Marcadores STMS que permiten su diferenciación
2	881	RhAB15; RhE2b
3	744	RhO507; RhP518; RhAB22
4	553	RhO507; RhP518
5	1178	RhO507; RhP518; RhAB15; RhE2b
6	837	RhO507; RhP518; RhAB15; RhAB22
7	1041	RhAB40
8	882	RhO507; RhAB15; RhAB40
9	883	RhO507; RhP518; RhAB22; RhE2b; RhAB40
10	746	RhO507; RhP518 ; RhAB15; RhE2b; RhAB40

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



- Se estandarizó un protocolo para la extracción de ADN de hojas de 10 variedades de portainjertos de rosa por un método de CTAB, sin la necesidad de usar nitrógeno líquido, obteniendo un valor medio de pureza 260/280 de 1,83 y una concentración media de 30,91 [ng/  $\mu$ L], ambos valores fueron óptimos para la amplificación de los marcadores moleculares microsatélites STMS.
- Se logró la estandarización de las condiciones para la amplificación por PCR de 14 marcadores moleculares STMS. Los loci microsatélites RhAB15, RhO507 y RhAB22, resultaron ser los más polimórficos en nuestro germoplasma evaluado, dado que presentaron de 6 a 5 alelos por locus y obtuvieron valores de PIC superiores a 0,5.
- La caracterización molecular de 10 muestras de portainjertos de rosas pertenecientes al banco de germoplasma de la empresa “Agroinnovación S.A.”, utilizando 14 marcadores microsatélites, revelo una riqueza de 49 alelos en donde el número de alelos amplificados por marcador molecular estuvo entre 2 a 6 alelos/locus.
- La identificación del conjunto de marcadores STMS más informativos, permitió la obtención de la huella genética del portainjerto de rosa #BG-1177 con tan solo 6 microsatélites, permitiendo así su fácil diferenciación entre las otras variedades analizadas en el presente estudio.



- ✓ Introducción
- ✓ Objetivos
- ✓ Materiales y métodos
- ✓ Resultados y discusión
- ✓ Conclusiones
- ✓ Recomendaciones
- Agradecimientos

- Evaluar un germoplasma de portainjertos de rosa más amplio para evitar la poca variabilidad alélica de algunos marcadores STMS estudiados.
- Para evitar el grado de error generado en la detección de alelos mediante estimación visual, se recomienda utilizar sistemas de digitalización de geles.
- Se recomienda la combinación de caracteres morfológicos y marcadores moleculares para la identificación genotípica de las diferentes variedades.
- Realizar PCR-multiplex para detectar más de una secuencia a la vez, permitiendo ahorrar tiempo, recursos y dinero en la caracterización.

- ✓ Introducción
- ✓ Objetivos
- ✓ Materiales y métodos
- ✓ Resultados y discusión
- ✓ Conclusiones
- ✓ Recomendaciones
- ✓ Agradecimientos





**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

  
genviv®

**ID**  **en**  
Identificación Molecular

Flores Flor, Francisco Javier, Ph.D.  
**Director del proyecto**

Montenegro Puga Johanna Pamela  
**Asesora externa**

**FAMILIA Y AMIGOS**



**ESPE**  
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO  
CAMINO A LA EXCELENCIA