

## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

### CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

#### TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA

**“Caracterización molecular de la especie *Valeriana adscendens Turcz* mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador”**

**Elaborado por:**

GANGOTENA HERRERA, CYNTHIA NAOMI

**Directora:**

PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL. PhD.

SANGOLQUÍ-ECUADOR

2023





Introducción



Objetivos



Metodología



Resultados y Discusión



Conclusiones



Recomendaciones





## Introducción



## Objetivos



## Metodología



## Resultados y Discusión



## Conclusiones



## Recomendaciones

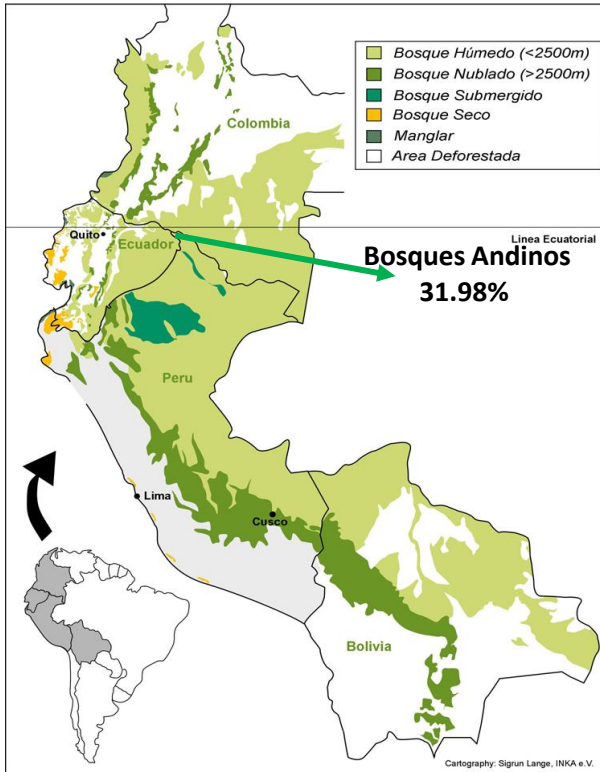


# Bosques Andinos

## Introducción

### Distribución

Rango latitudinal de 2400 - 3500 m s.n.m



### Importancia

Servicios ecosistémicos



Biodiversidad



### Amenazas

Antropogénicas



Reducción de la biodiversidad



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

## *Valeriana adscendens* Turcz

## Introducción

### Subfamilia Valerianaceae

Familia Caprifoliácea  
35 especies Ecuador



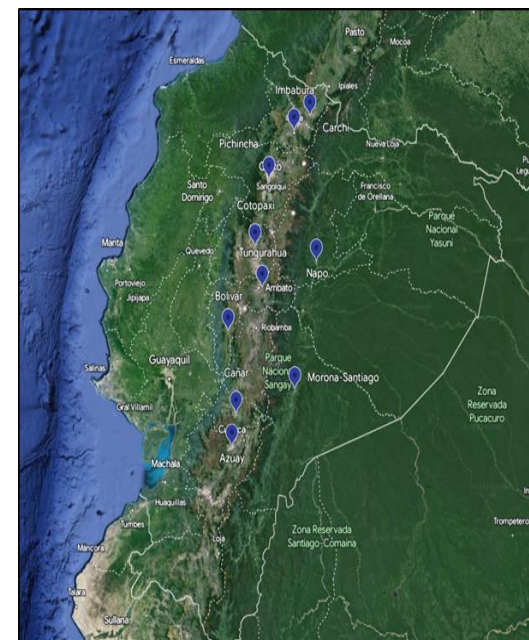
### Genero Valeriana

Valepotriatos  
Ácido isovalérico



### Distribución

10 provincias del Ecuador  
Altitud 2500 - 4500 m s.n.m



# Caracterización Molecular

## Introducción

### Diversidad genética

Recombinación de ADN



Proceso de herencia



Adaptaciones



### Importancia

Mantenimiento de genes



Caracterización



Biodiversidad



### Técnicas moleculares

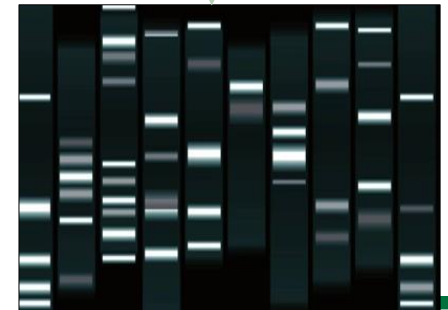
Marcadores moleculares



ISSRs



Cloroplástico





Introducción



**Objetivos e Hipótesis**



Metodología



Resultados y Discusión



Conclusiones



Recomendaciones



## Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular la especie *Valeriana adscendens* Turcz mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador.





## Objetivos específicos

- Obtener material vegetal de la especie *Valeriana adscendens* Turcz mediante la recolección de hojas al azar en Bosques Andinos del Ecuador, para la extracción de material genético.
- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN en muestras foliares de *Valeriana adscendens* Turcz, a partir de diferentes protocolos descritos en bibliografía para la amplificación de marcadores moleculares.
- Amplificar marcadores moleculares a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras foliares, para caracterizar la especie *Valeriana adscendens* Turcz en Bosques Andinos del Ecuador.



## Hipótesis

El análisis con marcadores moleculares permite caracterizar la especie *Valeriana adscendens* Turcz.





Introducción



Objetivos



Metodología



Resultados y Discusión



Conclusiones



Recomendaciones



## Fase de campo

## Metodología

C1



## Zona de Estudio

C2



“Virgen del Páramo-Papallacta”



C4



C3



Parque Nacional Cayambe-Coca



## Fase de campo

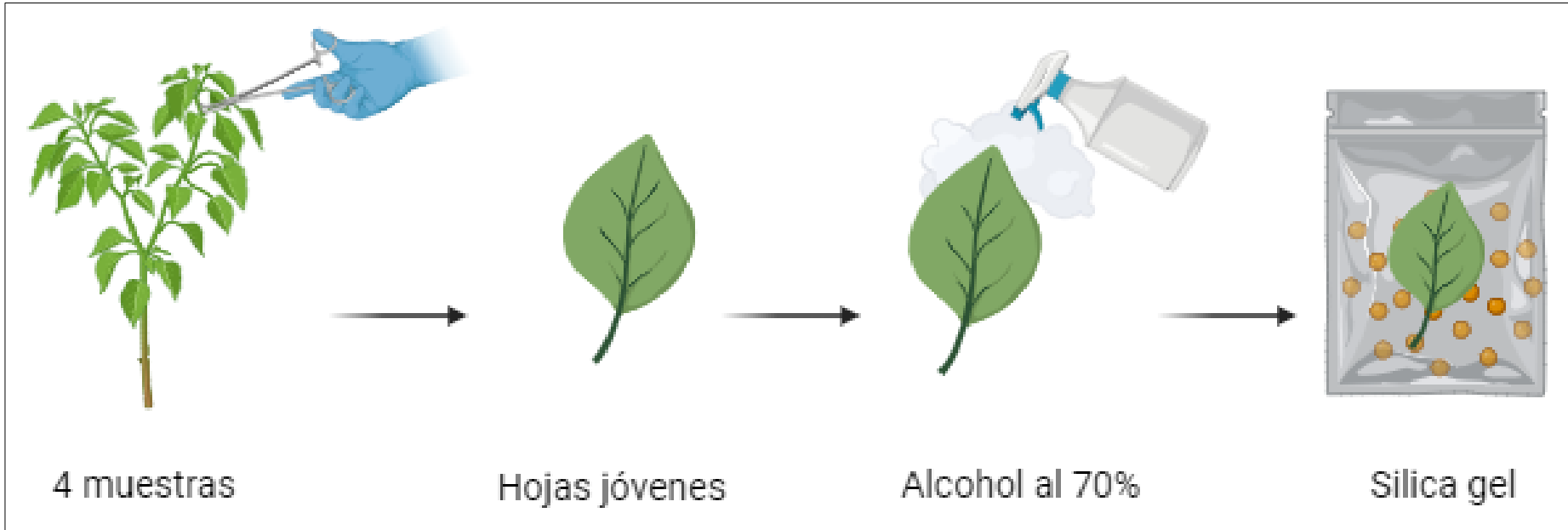
## Metodología

### Recolección y Conservación

#### Recolección

#### Desinfección

#### Secado

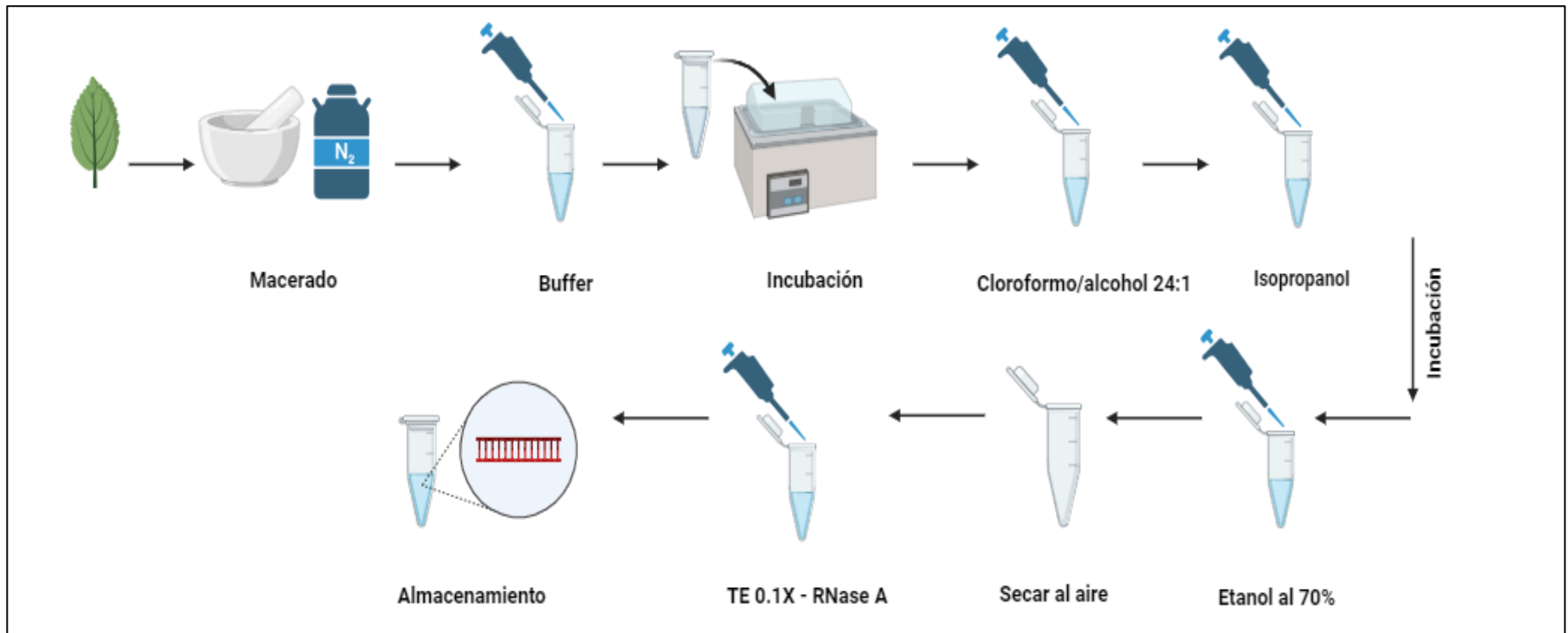


## Fase de laboratorio

## Metodología

### Extracción de ADN

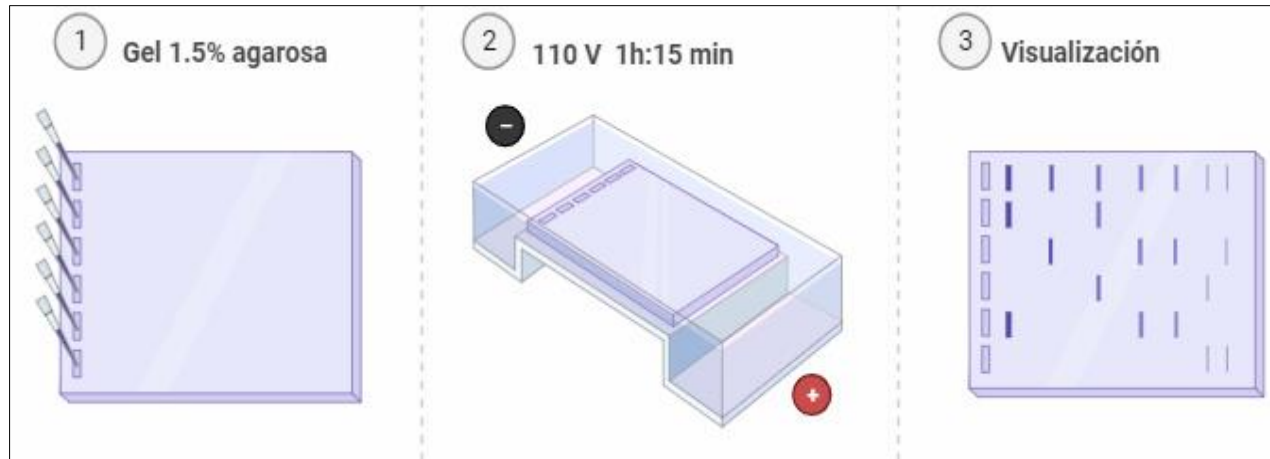
#### Método de CTAB



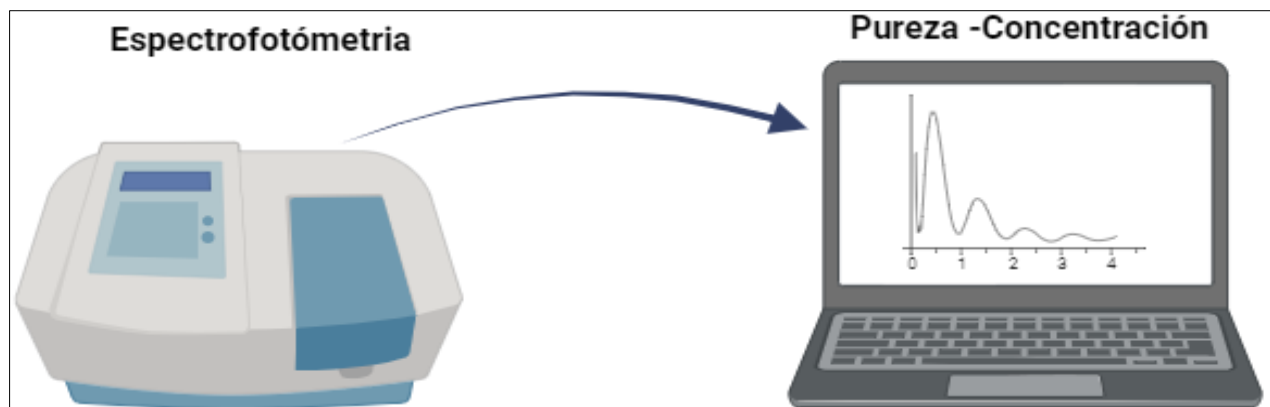
## Fase de laboratorio

## Metodología

### Visualización



### Cuantificación de ADN



## Fase de laboratorio

## Metodología

### Amplificación

#### Marcador trnG

#### *In silico*

##### Secuencia

Gen tRNA-Gly

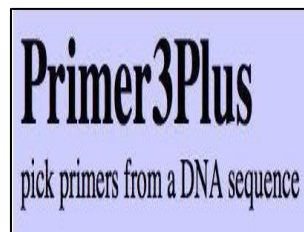
National Library of  
Medicine (NCBI)



##### Diseño

Cebadores

Primer3 (v. 0.4.0)



##### PCR

Longitud del amplicón

FastPCR 6.8.62



##### Alineamiento

Secuencias similares

BLAST





## Fase de laboratorio

## Metodología

### Amplificación

### Marcador trnG

#### *In vitro*

#### Condiciones

Protocolo-Bell et al  
(2012)

NEB Tm Calculator

T alineamiento

Temperatura

49 y 50 °C

Concentración

10, 20, 25 ng/μL.

#### Análisis de datos

Eficacia de los cebadores

ANOVA

Duncan

$\alpha : 0.05$



## Fase de laboratorio

## Metodología

### Amplificación

### Marcadores ISSRs

*In vitro*

#### Condiciones

Protocolo-Vargas  
(2021)

Cebadores

17898A-17898B

#### Análisis de datos

Marker Efficiency  
Calculator (iMEC).

PIC, IM, R, D

Matriz Binaria

Índice de Jaccard

Darwin v 6.0.2.1

Dendrograma

PcoA





Introducción



Objetivos



Metodología



**Resultados y Discusión**



Conclusiones



Recomendaciones



## Recolección y Conservación



**Figura 1.** Hojas de *Valeriana adscendens* Turcz. A) Muestra foliar seca con silca después de 48 horas. B) Muestra foliar en estado natural.

## Conservación

Protocolo Di Sacco et al  
(2020)

Modificación del tiempo

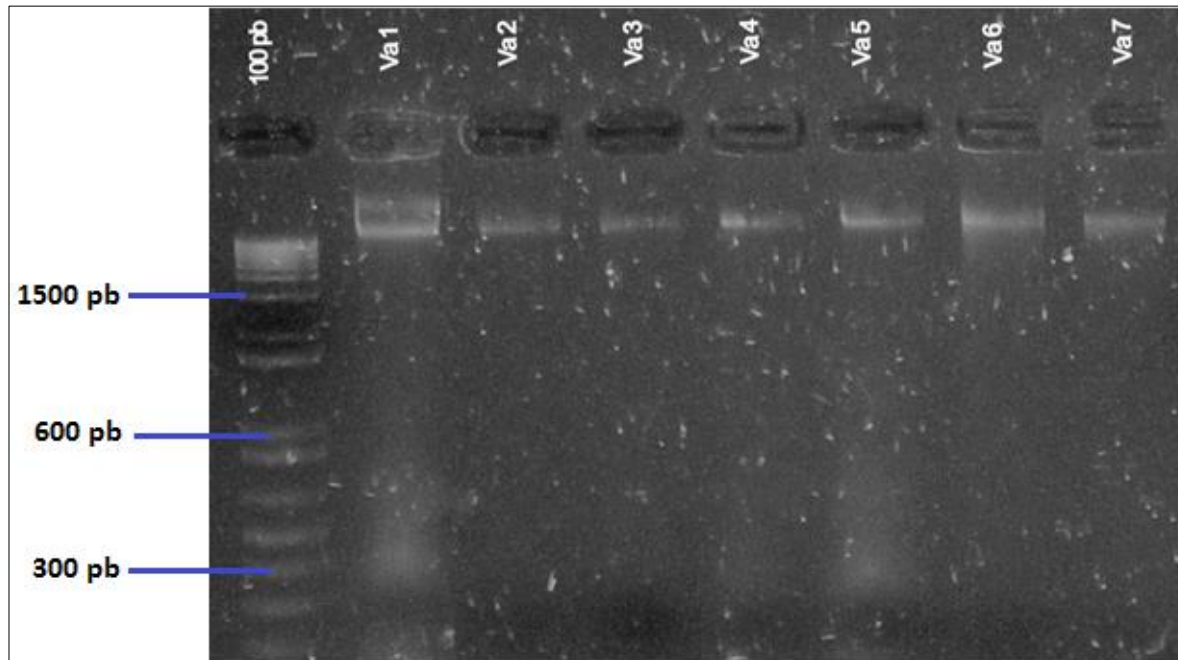
Sin evidencia de oxidación o quemadura

Hoja esta preservada correctamente.



## Extracción y Cuantificación de ADN

Bandas visibles



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa del ADN de *Valeriana adscendens* Turcz obtenidas con el método de Semagn (2013) modificado. ADN para 7 individuos de *Valeriana adscendens* Turcz en un gel de agarosa al 1% y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder).

## Método de CTAB

Concentración ng/μL	Pureza 260/280
959.81	1.64

Abdel y Osman (2017)

Pureza 260/280	ADN
1.8-2.0	Óptimo
>1.60	Aceptable



## Amplificación

### Marcador trnG

#### PCR In silico

Amplicón 106 pb

```
In silico Primer(s) search for: hg878191.1 valeriana adscendens voucher
f 5'-actgctgaactacaaacttctgt
Position: 19->40 22bp 100% Tm = 54,4°C

5-actgctgaactacaaacttctgt->
|||||
tatgacgacttgatgtttgaagcaagta
r 5'-accttggatgacacaataacga
Position: 102<-124 23bp 100% Tm = 54,2°C

<-agcaataaacacagtaggttcca-5
|||||
tctcgttatttgggtcatccaaggttgac

f 5'-actgctgaactacaaacttctgt
r 5'-accttggatgacacaataacga
PCR product size: 106bp
```

#### Alineamiento

Query cover del 100%  
E-value  $1 \times 10^{-46}$

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Valeriana adscendens voucher Bell #FC006 (YU) rRNA-Gly (trnG) gene_intron_chloroplast	<a href="#">Valeriana adscendens</a>	198	190	100%	1e-46	100.00%	584	<a href="#">HQ878191.1</a>
Valeriana secunda voucher Bell #FC015 (YU) rRNA-Gly (trnG) gene_intron_chloroplast	<a href="#">Valeriana secunda</a>	191	191	99%	2e-44	99.06%	588	<a href="#">HQ878282.1</a>

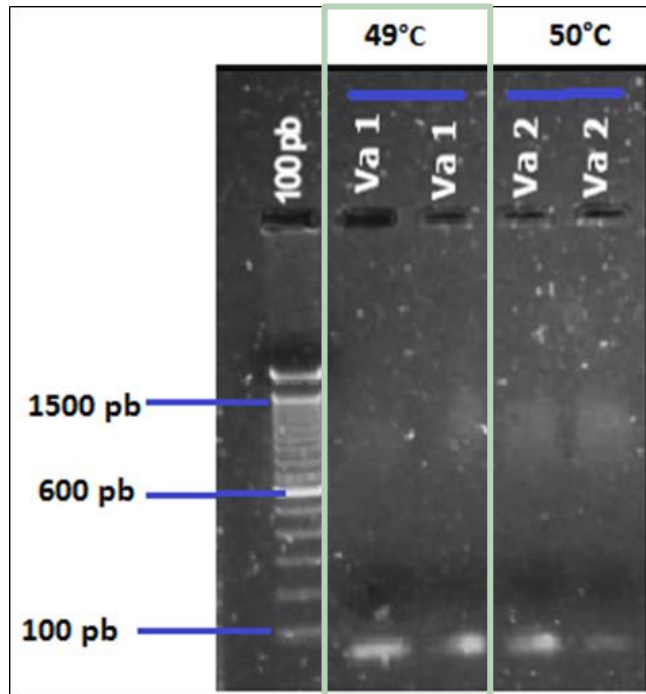
Figura 3. PCR in silico con los cebadores diseñados para tRNA-Gly (trnG).

Figura 4. Nucleotide Blast para la secuencia obtenida en la PCR in silico.

## Amplificación

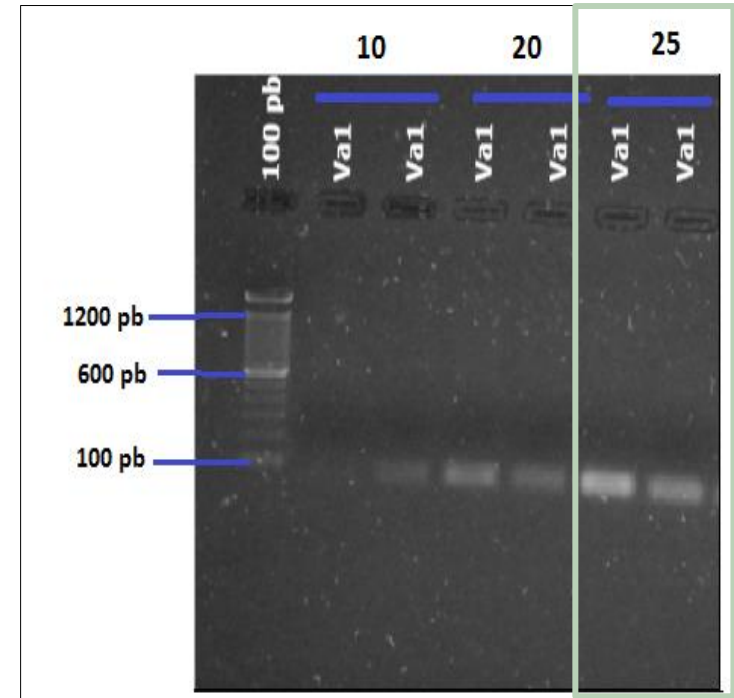
### Marcador trnG

#### Temperatura



**Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del marcador tRNA-Gly (trnG) con variación de temperatura.

#### Concentración

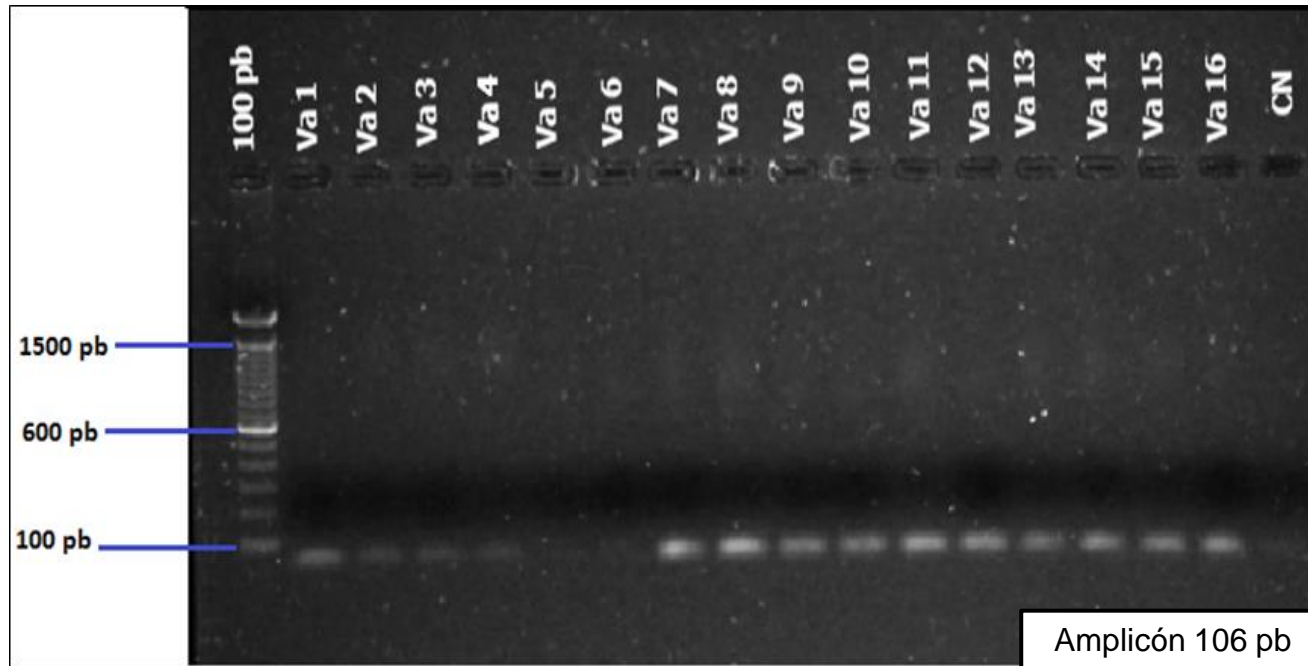


**Figura 6.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de ADN del marcador tRNA-Gly (trnG) con variación de concentración.

## Amplificación

### Marcador trnG

Marcador monomórfico



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los cebadores diseñados para tRNA-Gly (trnG) en muestras de *Valeriana adscendens* Turcz. Amplificaciones para 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz en gel de agarosa al 1.5% y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 pb Plus DNA Ladder). CN) Control negativo.



## Amplificación

### Marcador trnG

#### Análisis de resultados

Tabla 1. Análisis estadístico para el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG).

Cuadrante	C1	C2	C3	C4
N°	6	5	7	6
% A	75%	63%	88%	75%
E	0.30	0.33	0.23	0.33
LI	45.15%	29.12%	64.70%	41.62%
LS	100%	96%	100%	100%

#### ANOVA

p-valor  $>\alpha=0.05$

#### Duncan

No existe diferencias significativas

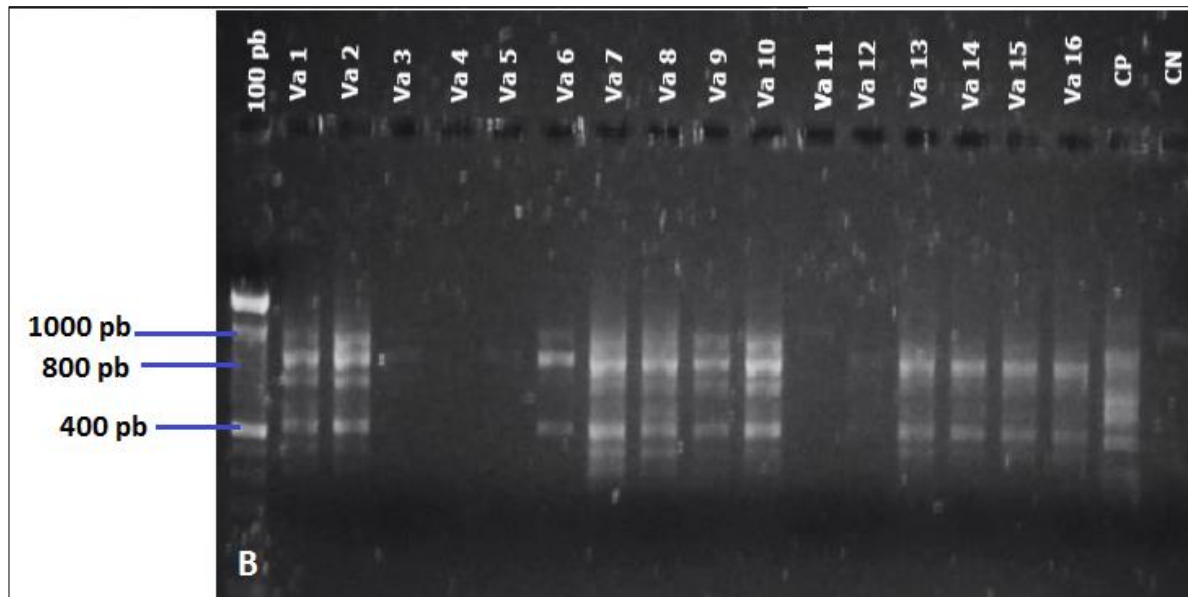
Nota. N°) Numero de bandas presentes por cuadrante. % A) % de amplificación. E) Margen de error Muestral. LI) Límite inferior. LS) Límite superior.



## Amplificación

### Marcadores ISSRs

Bandas visibles en 11 muestras



17898A

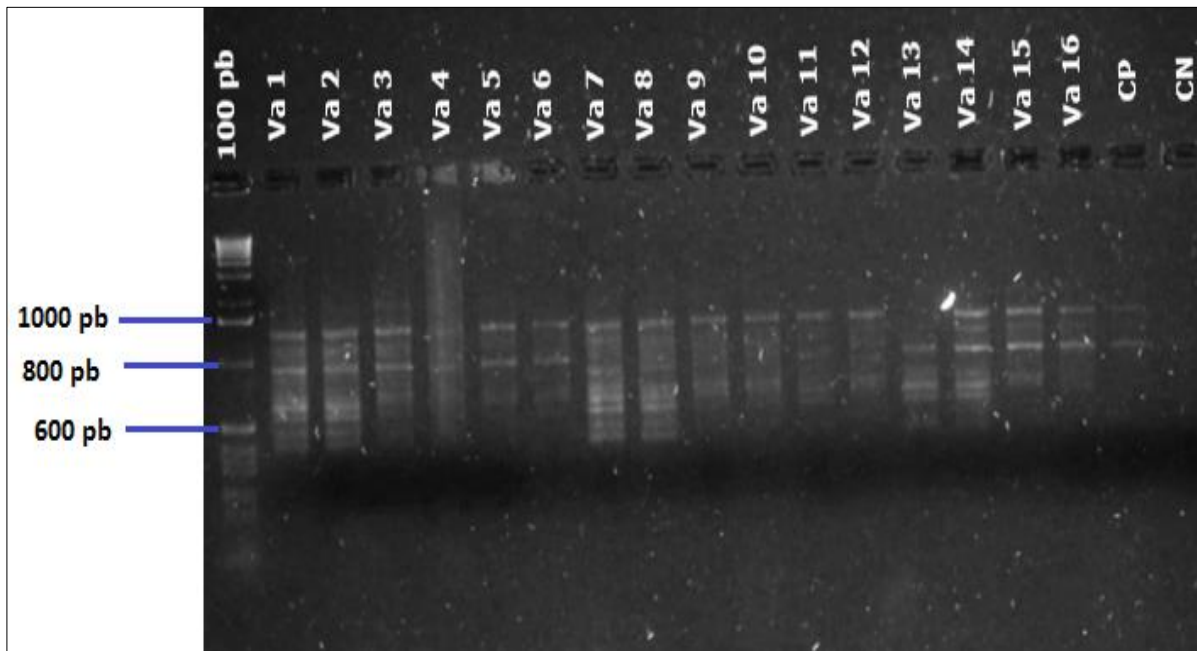
Bandas	Longitud
41	376- 1171 pb

**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con el cebador 17898A en muestras de *Valeriana adscendens* Turcz

## Amplificación

### Marcadores ISSRs

Bandas visibles 16 muestras



17898B

Bandas	Longitud
41	425-1560 pb

**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con el cebador 17898B en muestras de *Valeriana adscendens* Turcz

## Amplificación

### Marcadores ISSRs

#### Análisis de resultados

**Tabla 2.** Análisis resultados para marcadores ISSRs 17898A y 17898B

Cebador	PIC	IM	D	R
17898B	0.1742	0.0068	5.37	0.98
17898A	0.1317	0.0013	10.37	0.99

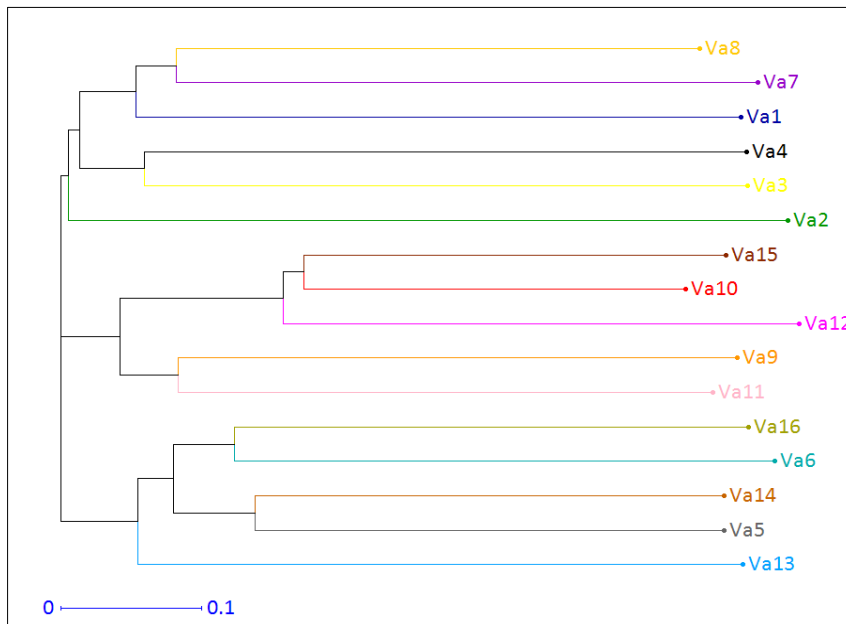
*Nota.* Contenido de información polimórfica (PIC), Índice del marcador (IM), Poder de resolución (R), Poder de discriminación (D).

## Amplificación

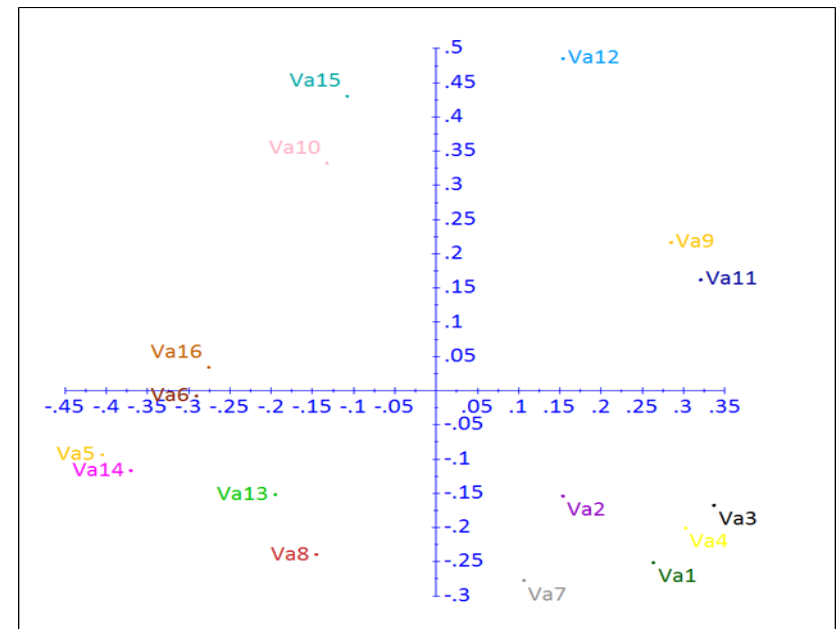
### Marcadores ISSRs

#### Coeficiente de Jaccard

Valores de : 1- 0.57



**Figura 9.** Dendrograma generado mediante el método “Neighbor Joining”.



**Figura 10.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) generado para las 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz.



Introducción



Objetivos



Metodología



Resultados y Discusión



**Conclusiones**



Recomendaciones



- Los marcadores ISSRs (17898A y 17898B) y el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG) permitieron obtener **información a nivel molecular útil para la caracterización molecular** de *Valeriana adscendens* Turcz.
- La recolección del material vegetal de muestras foliares de *Valeriana adscendens* Turcz en el Parque Nacional Cayambe-Coca y el almacenamiento con el método de silica gel permitió **obtener muestras adecuadas para la extracción de ADN genómico.**
- El método de extracción con CTAB para obtener ADN genómico de *Valeriana adscendens* Turcz permitió obtener una buena calidad de ADN con **una pureza 1.64 y con una concentración de 959.81 ng/μL.**



- La amplificación de las 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz con marcadores moleculares ISSRs (17898B y 17898A) mostraron una **diversidad de bandas** de entre 376 a 1176 para el marcador B y una diversidad de bandas de 425 a 1560 para el marcador A.
- El análisis de los marcadores moleculares ISSRs evidencio que el **marcador 17898B** tiene un Contenido de Información Polimórfica (PIC) de 0.1742 por lo tanto esta secuencia es un tipo de **marcador informativo**, útil para la caracterización molecular de *Valeriana adscendens* Turcz.
- Los **porcentajes de amplificación** para el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG) en cada cuadrante presentaron valores entre el **63% hasta el 88%** por lo tanto este **marcador es útil para los ensayos de caracterización molecular** de la especie *Valeriana adscendens* Turcz.







Introducción



Objetivos



Metodología



Resultados y Discusión



Conclusiones



Recomendaciones



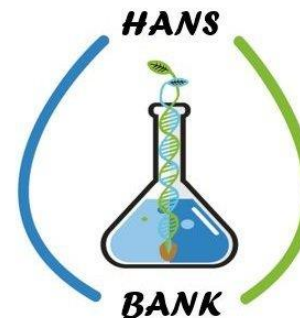
- Se recomienda emplear un mayor número de marcadores informativos para mejorar la caracterización molecular de la especie *Valeriana adscendens* Turcz.
- Se sugiere mejorar la etapa de purificación de la extracción de ADN para obtener material genético de mejor calidad que permita optimizar este proceso.
- Se sugiere aumentar la cantidad de individuos analizados con el propósito de mejorar la precisión y la confiabilidad de los resultados de la amplificación con marcadores moleculares.
- Se sugiere ampliar el muestreo a una mayor variedad de ubicaciones donde se encuentre *Valeriana adscendens* Turcz, con el fin de reducir posibles sesgos en los datos.



## Agradecimientos

Karina Isabel, Proaño Tuma, PhD.  
María Claudia, Segovia Salcedo, PhD.

Ing. Gabriela Miño, Mg.  
Ing. Joselin Caiza



37



**GRACIAS POR  
SU ATENCIÓN**



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