



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga

**“Caracterización molecular de la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador”.**

Elaborado por: POLO CALVA, MELANIE NOHELI

Directora: KARINA PROAÑO, Ph. D.

SANGOLQUÍ - ECUADOR

2024



- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

## Bosques y páramos andinos del Ecuador



Figura 1. Mapa de bosques Andinos en Latinoamérica. Recuperado de Hofstede et al. (2014)

- Su gradiente montañoso se extiende desde los 3000 hasta 4500 m s.n.m.
- Tres pisos altitudinales: subpáramo transicional, páramo y superpáramo.
- Ecuador cuenta con 628 especies endémica, 273 especies están restringidas a los páramos ecuatorianos

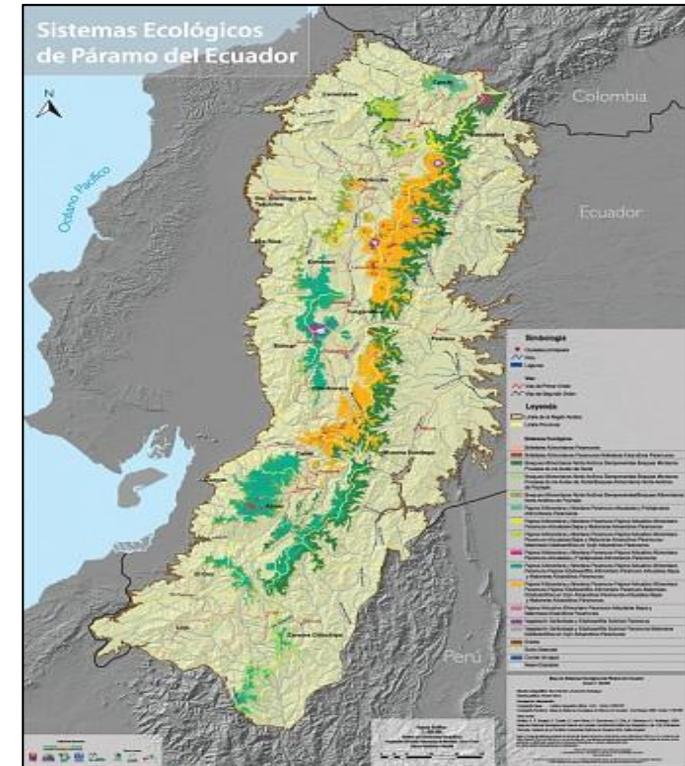


Figura 2. Mapa de bosques Andinos en Ecuador. Recuperado de Anónimo (2012)

## Bosques y páramos andinos del Ecuador

### Importancia

- Flora con características fenotípicas únicas
- Fuente de recursos hídricos
- Sumideros de carbono



Figura 4. Foto Parque Nacional Cayambe-Coca

### Amenazas

- Actividad agropecuaria: agricultura y ganadería
- Quema
- Cambio climático



Figura 5. Quema páramos andinos. Tomado de Zenteno (2022)

## Estudios de diversidad andina del Ecuador

### Biodiversidad

- Situación ecuatorial
- Presencia de la cordillera de los Andes
- Fuente perhúmeda amazónica
- Corrientes marinas



Figura 4. Foto Parque Nacional Cayambe-Coca

### Biobancos

- La flora presenta gran diversidad de genotipos
- Los estudios de variabilidad genética permite evaluar la pérdida de recursos genéticos.

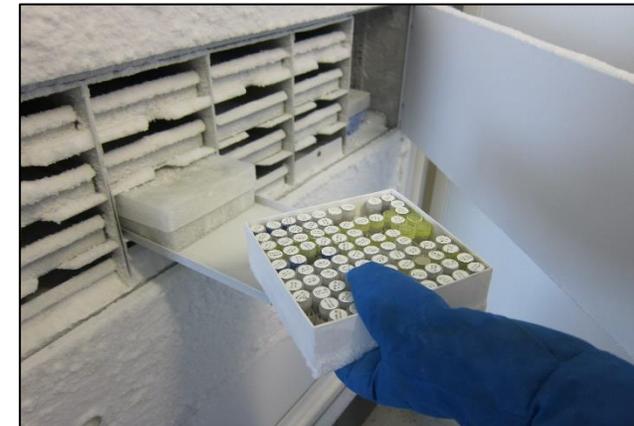


Figura 5. Ejemplo biobanco. Recuperado de: poner

## Familia *Ericaceae*

- Crecen entre los 1000 a 4000 m s.n.m
- Una de las familias más estudiadas es *Vaccinium floribundum*

## Género *Pernettya*

- Conformado por 20 especies, 15 son americanas
- Investigaciones fitoquímicas, etnobotánicas y biológicas



Figura 7. *Pernettya prostrata* Parque Cayambe-Coca

## *Pernettya Prostrata*

- En Ecuador se la encuentra desde los 2900 m s.n.m.
- Su fruto es comestible en pequeñas cantidades

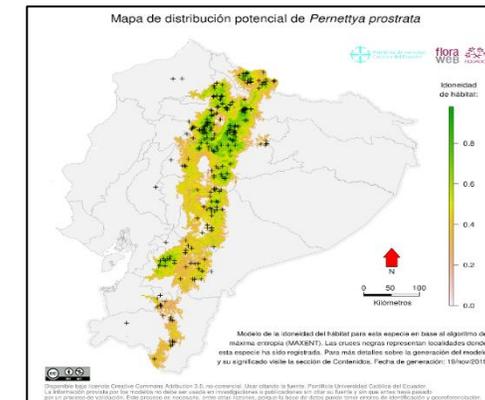


Figura 8. Mapa ubicación *Pernettya prostrata*. Recuperado de Romoleroux et al., (2019)

## Técnicas moleculares

### Marcadores moleculares

- Estudiar regiones específicas del ADN
- Generar gran número de marcadores y utilizar cantidades mínimas de material genético

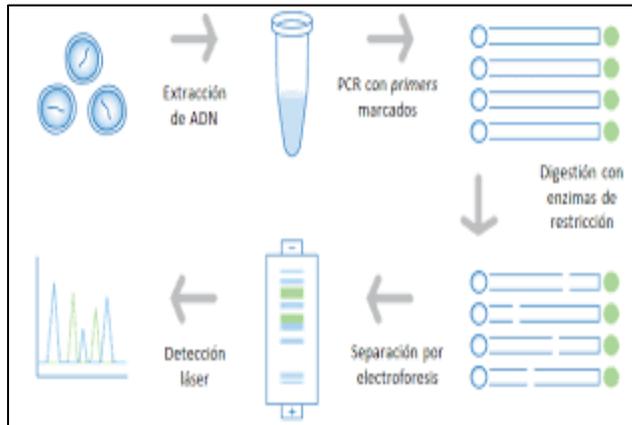


Figura 10. Técnicas moleculares. Recuperado de Diz, (2020)

### Barcoding

- Herramienta taxonómica que permite identificar y describir especies
- CBOL definió a los genes *rbcl* y *matK*

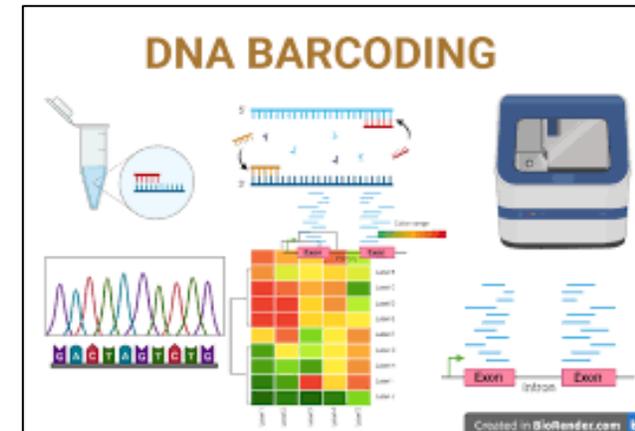


Figura 11. Barcoding DNA. Recuperado de Sciencevidid, (2022)

- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

## Objetivo General

Caracterizar a nivel molecular la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. Mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador.

## Objetivos Específicos

Obtener material vegetal de la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. mediante la recolección de hojas en Bosques Andinos del Ecuador, para la extracción de material genético.

Estandarizar el protocolo de extracción de ADN en muestras foliares de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. 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 polimerasa (PCR) en muestras foliares, para caracterizar la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. en Bosques Andinos del Ecuador.

## Hipótesis

El análisis con marcadores moleculares permite caracterizar la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. de Bosques Andinos del Ecuador

H0: El análisis con marcadores moleculares no permite caracterizar la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. de Bosques Andinos del Ecuador

- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

## Metodología

Fase de Campo	Fase de laboratorio	Análisis Estadístico
Muestreo y Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estandarización extracción de ADN</li> <li>• Cuantificación y visualización de ADN</li> <li>• Validación de ADN</li> <li>• Diseño de primers</li> <li>• Amplificación de primers</li> </ul>	Análisis de datos obtenidos durante la fase de laboratorio



Figura . Recolección de muestras

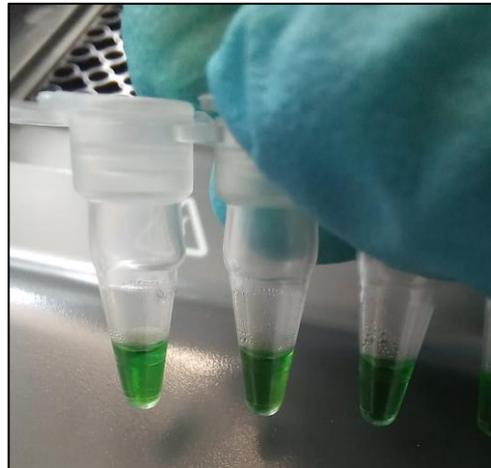


Figura . Amplificación de muestras

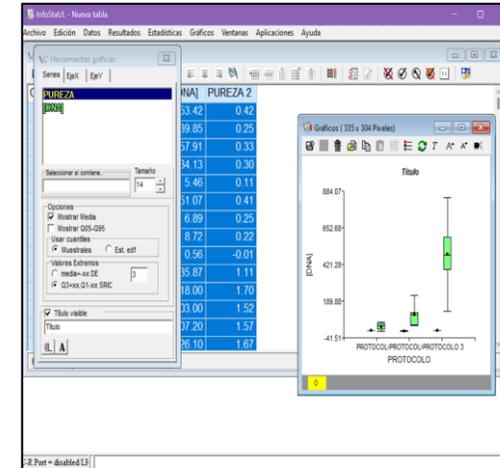


Figura . Análisis de datos

Fase de Campo

Zona de muestreo

Parque Nacional Cayambe-Coca

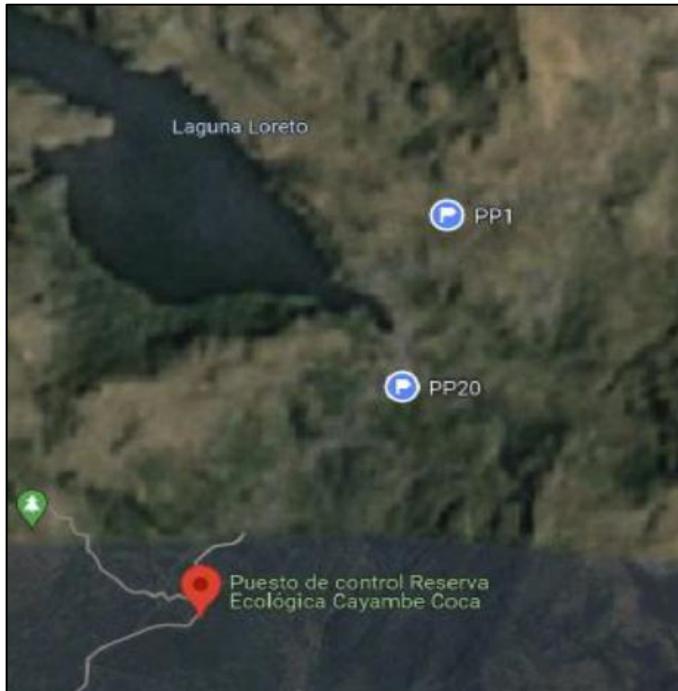


Figura 12. Zona de recolección

Recolección y Almacenamiento

Recolección: Laguna de Loreto-Oyacachi  
Almacenamiento: Laboratorio de Biotecnología Vegetal

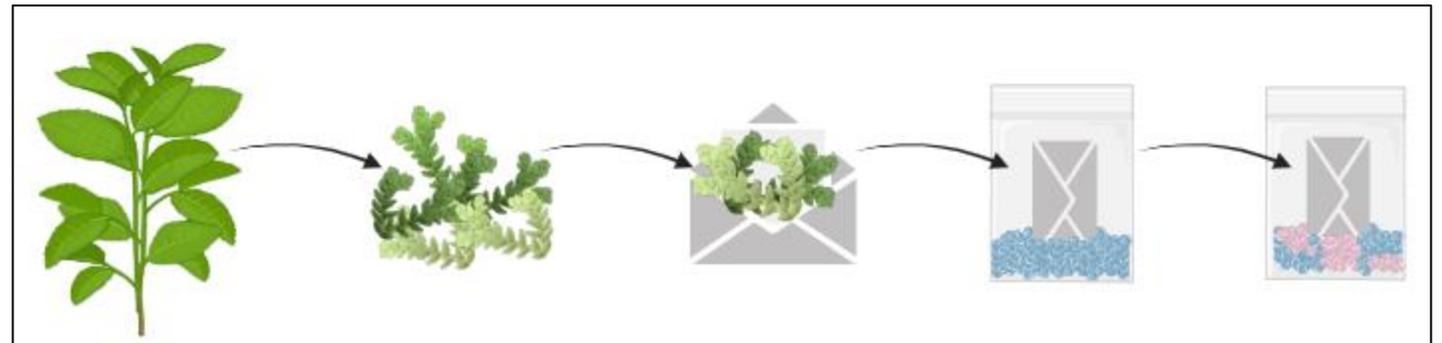


Figura 13. Proceso de recolección y almacenamiento

Fase de Laboratorio

Extracción de ADN

Tabla 1. Protocolos empleados para extracción de ADN

<b>Protocolo 1: Doyle &amp; Doyle (1991)</b>	Protocolo estándar para la extracción de ADN	Buffer Cetiltrimetilamonio Bromuro (CTAB) al 2%
<b>Protocolo 2: Mojica et al. (2018)</b>	Protocolo modificado de Doyle & Doyle (1991)	Buffer CTAB al 2%
<b>Protocolo 3: Souza et al. (2012)</b>	Protocolo modificado de Russell et al. (2010)	Buffer Sorbitol y CTAB 3%

Cuantificación ADN

Espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific Multiskan SkyHigh*

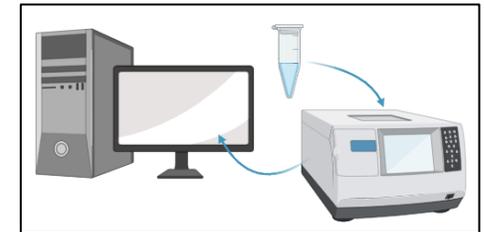


Figura 14. Cuantificación de ADN

Electroforesis

Gel de agarosa al 1% para visualización de ADN (60-100 mL)

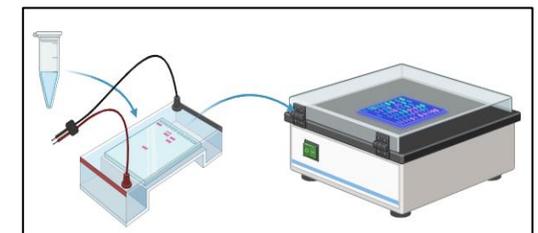


Figura 15. Integridad de ADN

Fase de Laboratorio

Extracción de ADN

Tabla 1. Protocolos empleados para extracción de ADN

<b>Protocolo 1: Doyle &amp; Doyle (1991)</b>	Protocolo estándar para la extracción de ADN	Buffer Cetiltrimetilamonio Bromuro (CTAB) al 2%
<b>Protocolo 2: Mojica et al. (2018)</b>	Protocolo modificado de Doyle & Doyle (1991)	Buffer CTAB al 2%
<b>Protocolo 3: Souza et al. (2012)</b>	Protocolo modificado de Russell et al. (2010)	Buffer Sorbitol y CTAB 3%

Cuantificación ADN

Espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific Multiskan SkyHigh*

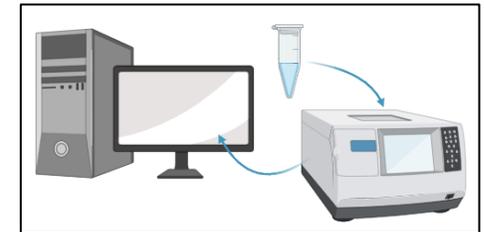


Figura 14. Cuantificación de ADN

Electroforesis

Gel de agarosa al 1% para visualización de ADN (60-100 mL)

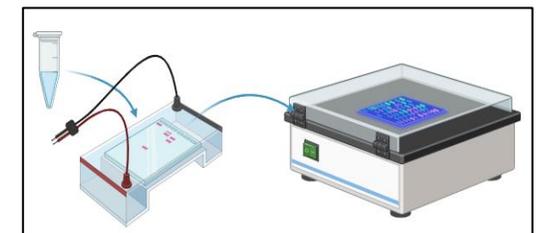


Figura 15. Integridad de ADN

### Extracción de ADN protocolo 3 (Souza et al., 2012)

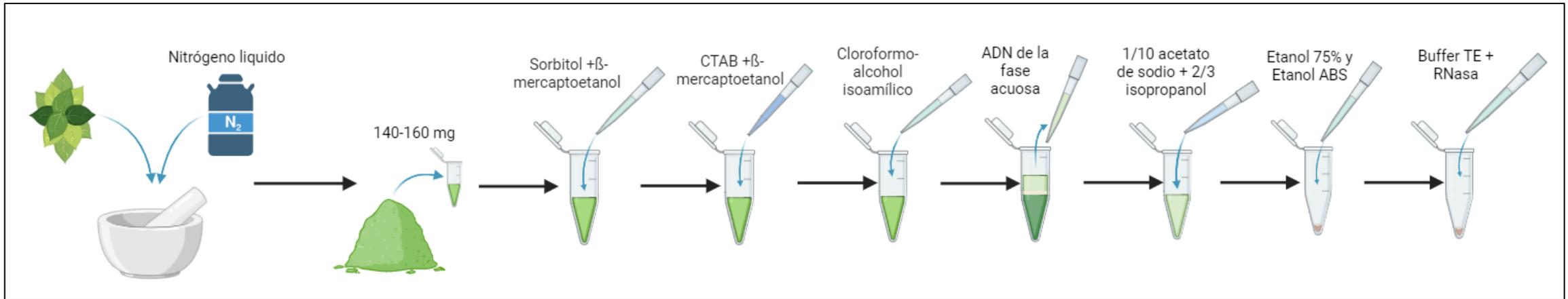


Figura 16. Protocolo extracción de ADN

### Cuantificación ADN

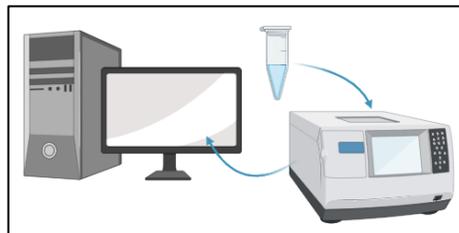


Figura 14. Cuantificación de ADN

### Electroforesis

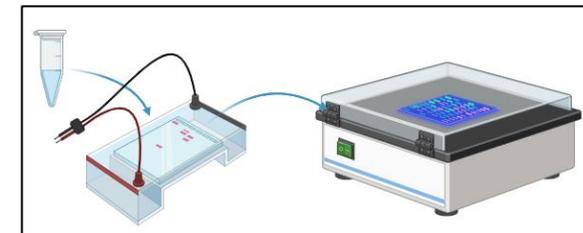


Figura 15. Integridad de ADN

### Validación de ADN (ISSR 17898A)

Tabla 2. Concentración de los reactivos para la amplificación del ISSR 17898A

Reactivos	Concentración Stock	Concentración final	Volumen final
Master Mix	2X	0.2X	5 µL
<b>ThermoScientific</b>			
Agua	hasta 10 µL	2 µL	2 µL
Primer ISSR (17898A)	10 µM	1 µM	1 µL
ADN	20 ng/ µL	4 ng/ µL	2 µL
Volumen total (µL)			10 µL

Tabla 3. Condiciones de amplificación para el marcador molecular ISSR 17898A

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	41.9	45 s	35
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	7 min	1

Diseño primers

Gen *rbcl*

Tabla 4. Cebadores forward y reverse diseñados para el gen *rbcl* de *Pernettya prostrata*

	Primer (5'-3')	Longitud	%GC	Tm (°C)	Ubicación	Hairpin (kcal/mol)	Producto (pb)
<b>Forward</b>	ACAGAGACTAAAGCAA GTGT	20	40	50,6	1-20	-0.14	
<b>Reverse</b>	GGTCCTTGAAAGTTT TAGCAT	22	40.9	53,0	419-440	-0.49 -0.03 -0.01	440



Diseño primers

Gen *matK*

Tabla 5. Cebadores forward y reverse diseñados para el gen *matK* de *Pernettya prostrata*

	Primer (5'-3')	Longitud	%GC	Tm (°C)	Ubicación	Hairpin (kcal/mol)	Producto (pb)
<b>Forward</b>	TGGGCTCAACCAAGAA	23	52.2	59.7	406-428	-1.45	253
	GGATCCA					-1.02	
						-0.49	
<b>Reverse</b>	AACCGCTCCAGACCGG	22	59.1	62.0	637-658	-1.52	
	CTTACT						



## Amplificación de ADN con primers diseñados

Tabla 6. Concentración de reactivos para la amplificación de los marcadores *rbcl* y *matK*.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final
DreamTaq Master Mix	2X	0.2X
Agua	Hasta 10 µL	Hasta 10 µL
Forward	10 µM	0.1 - 1 µM
Reverse	10 µM	0.1 - 1 µM
ADN	20 ng/ µL	4 ng/ µL
<b>Volumen total</b>		10 µL

Concentraciones de primer probadas: 0.75, 0.5, 0.25, 0.20, 0.15 y 0.10 µM.

Tabla 7. Condiciones de amplificación para los marcadores moleculares *rbcl* y *matK* para *Pernettya prostrata*

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Alineamiento	*	45 s	35
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	7 min	1

$$T_{a\ opt} = 0.3x(T_{m\ cebador}) + 0.7x(T_{m\ producto\ PCR}) - 14.9$$

T(°C) Alineamiento	<i>rbcl</i>	54
	<i>matK</i>	55

## Análisis Estadístico

Análisis de intervalos de confianza

Gráfico de cajas y bigotes (Blox-Plot)

Prueba de Shapiro Wilks (Alpha=0.05)

Análisis de la Varianza (ANOVA)

Prueba de Duncan (Alpha=0.05)



Tabla 1. Variables analizadas

Variable	Opción
Pureza (A260/280)	Protocolo 1 Protocolo 2 Protocolo 3
Concentración de ADN	

- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

Resultados Extracción de ADN

Tabla 1. Protocolos probados en la extracción de *Pernettya prostrata*

Protocolo	Protocolo 1: Doyle & Doyle (1991)	Protocolo 2: Mojica et al. (2018)	Protocolo 3: Souza et al. (2012)
Pureza (A260/280)	2.034	1.429	1.842
Pureza (A260/230)	0.254	1.529	1.726
Concentración (ng/ $\mu$ L)	28.668	104.136	486.766

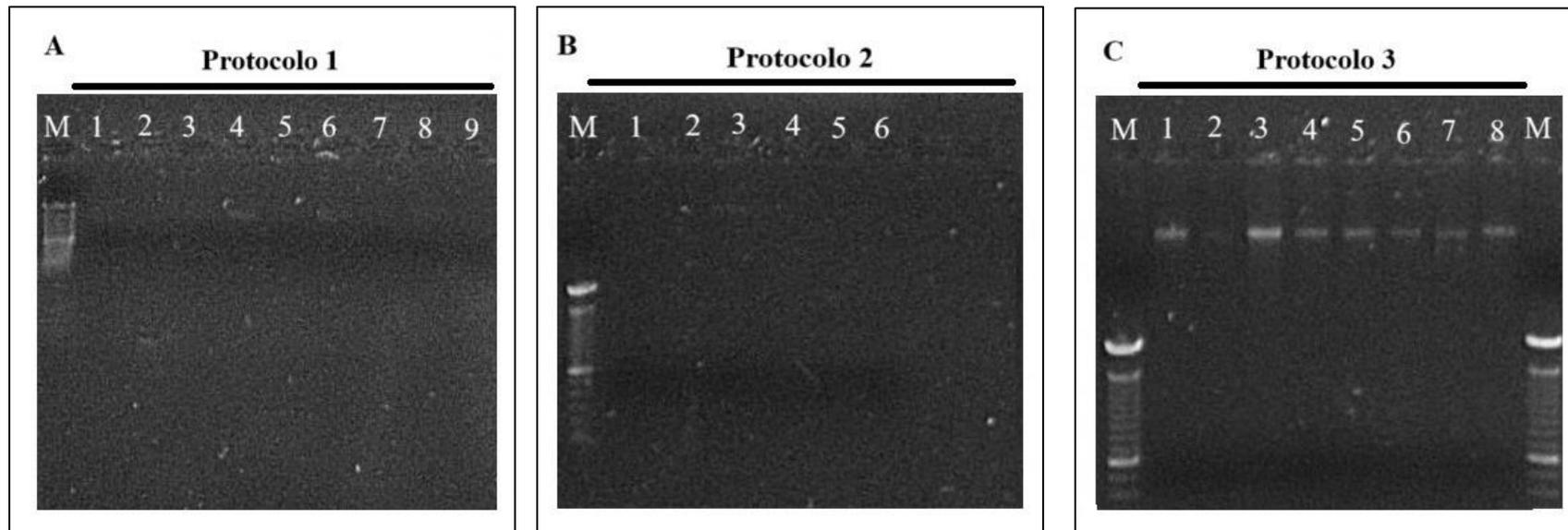


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de *Pernettya prostrata*

Análisis estadístico extracción ADN

Intervalos de Confianza

Tabla 8. Intervalos de confianza de pureza y concentración de ADN de los protocolos estudiados.

Protocolo	Variable	Parámetro	E.E.	LI (95%)	LS (95%)
Protocolo 1	Pureza	Media	0.11	1.79	2.28
	Concentración ADN	Media	7.75	10.79	46.54
Protocolo 2	Pureza	Media	0.12	1.12	1.74
	Concentración ADN	Media	28.62	30.57	177.70
Protocolo 3	Pureza	Media	0.01	1.82	1.86
	Concentración ADN	Media	31.18	423.01	550.54

Gráfico de cajas y Bigotes

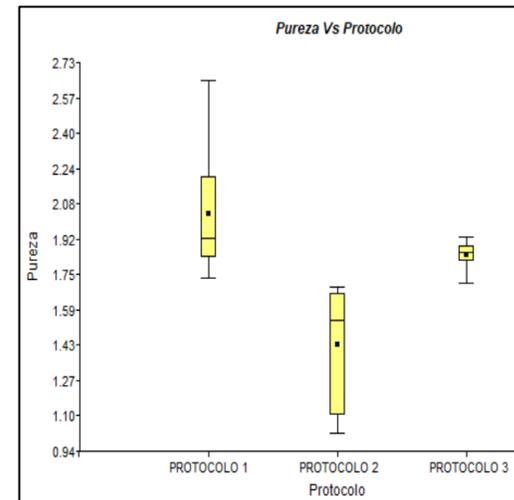


Figura 18. Box-plot purezas

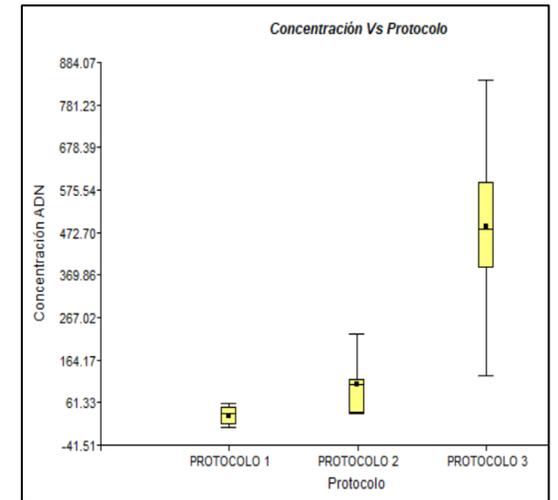


Figura 19. Box-plot concentraciones

### Prueba de Shapiro Wilks (Alpha=0.05)

Tabla 9. Prueba de Shapiro-Wilks para las variables de pureza y concentración de ADN.

Protocolo	Variable	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Protocolo 1	Pureza	2.03	0.32	0.84	0.09
	Concentración ADN	28.67	23.25	0.82	0.06
Protocolo 2	Pureza	1.43	0.29	0.81	0.09
	Concentración ADN	104.14	70.1	0.88	0.31
Protocolo 3	Pureza	1.84	0.06	0.93	0.15
	Concentración ADN	486.78	170.76	0.97	0.80

### Análisis de la Varianza (ANOVA)

#### Pureza

Tabla 10. ANOVA (SC tipo III) basado en la pureza de ADN

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.34	2	0.67	21.47	<0.0001
Protocolo	1.34	2	0.67	21.47	<0.0001
Error	1.31	42	0.67		
Total	2.66	42			

#### Concentración

Tabla 11. ANOVA (SC tipo III) basado en la concentración de ADN

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1851671.68	2	925835.84	44.46	<0.0001
Protocolo	1851671.68	2	925835.84	44.46	<0.0001
Error	874542.84	42	20822.45		
Total	2726214.52	44			

Prueba de Duncan

Pureza

Tabla 12. Prueba de Duncan (Alfa=0.05) para la pureza de ADN obtenida de los protocolos empleados.

Protocolo	Medias	E.E.	
Protocolo 2	1.43	0.07	A
Protocolo 3	1.84	0.03	B
Protocolo 1	2.03	0.06	C

Existen diferencias significativas entre los protocolos evaluados con respecto a la pureza

Concentración

Tabla 13. Prueba de Duncan (Alfa=0.05) para la concentración de ADN obtenida de los protocolos empleados.

Protocolo	Medias	E.E.	
Protocolo 1	28.76	48.10	A
Protocolo 2	104.14	58.91	A
Protocolo 3	486.78	26.35	B

El protocolo 3 es significativamente diferente al protocolo 1 y 2.

Extracción muestras

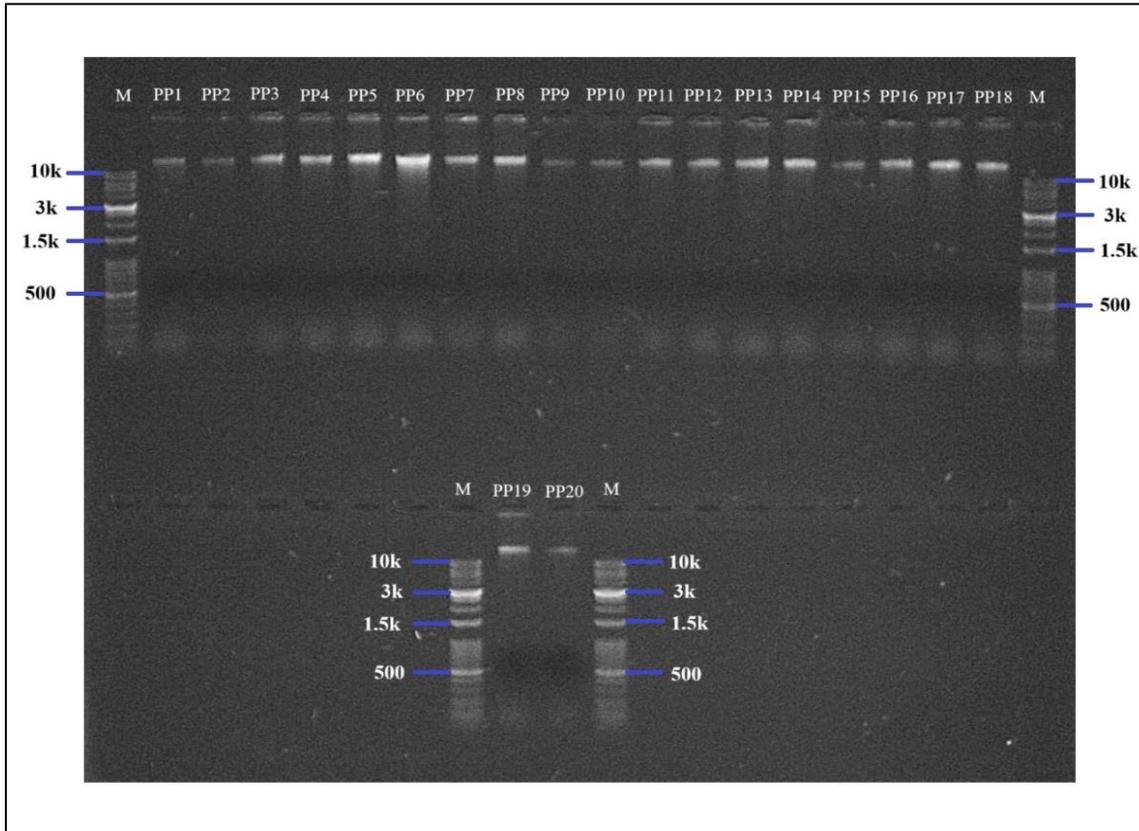


Figura 20. Extracción de ADN de 20 muestras de *Pernettya prostrata*

Protocolo 3: Souza et al. (2012)

Pureza (A260/280): 1.842

Pureza (A260/230): 1.726

Concentración (ng/  $\mu$ L): 486.766

Pureza (A260/280) nos indica la presencia de proteínas (1.8-2)

Pureza (A260/230) indica contaminación con metabolitos secundarios y polisacáridos (2-2.2)

*Pernettya prostrata* presenta gran cantidad de metabolitos secundarios

Validación de ADN

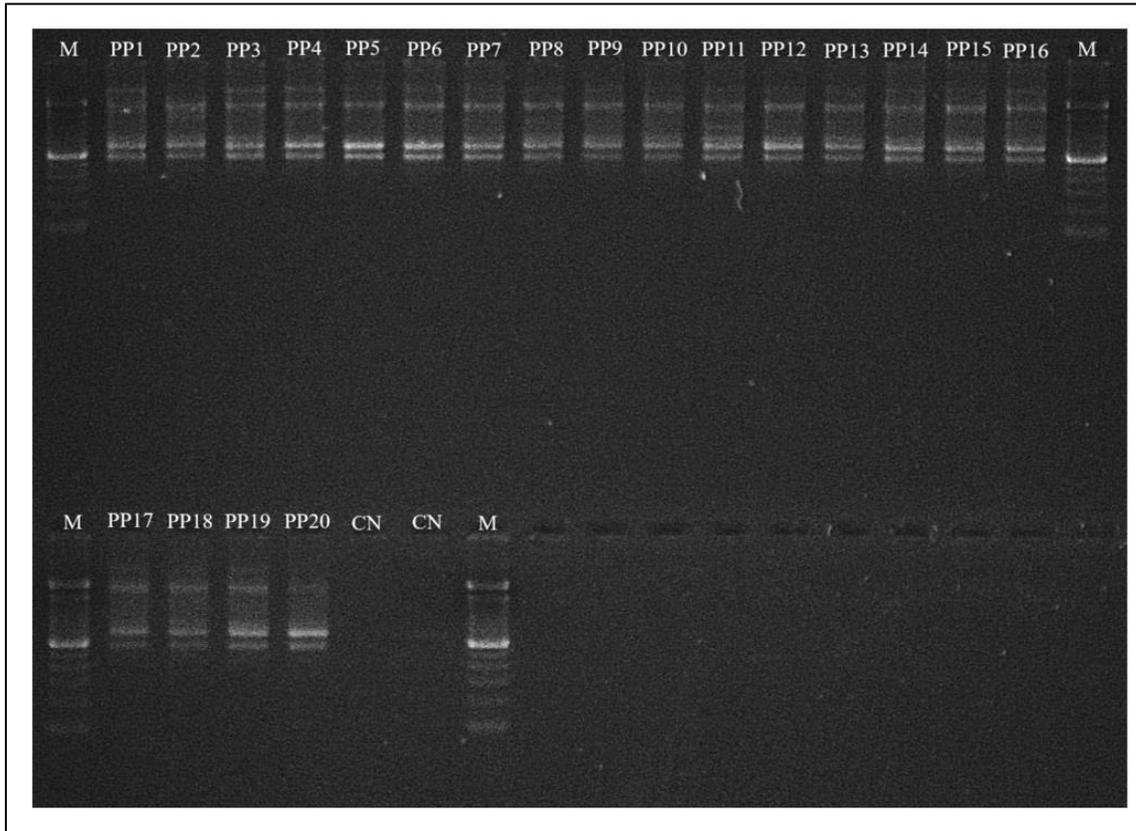


Figura 21. Amplificación de ADN con el marcador ISSR 17898A

ISSR 17898A

- Existe amplificación de ADN en todas las muestras de *Pernettya prostrata*

Marcadores moleculares

Concentraciones de primer probadas: 0.75, 0.5, 0.25, 0.20, 0.15 y 0.10  $\mu\text{M}$ .

*rbcl*

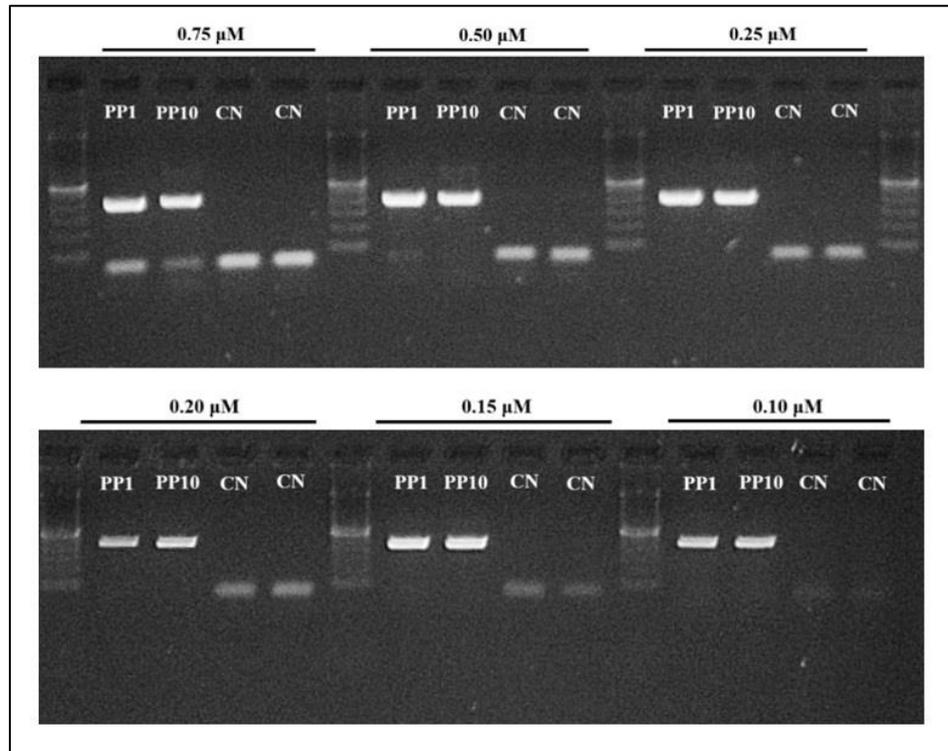


Figura 22. Amplificación del gen *rbcl* para estandarizar la concentración.

*matk*

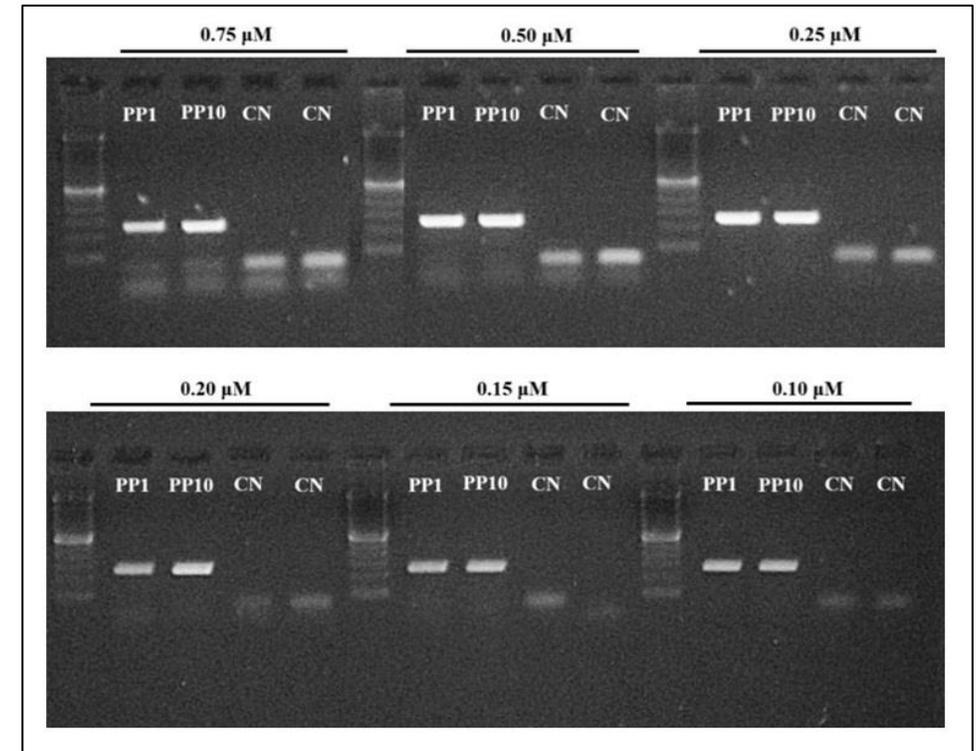
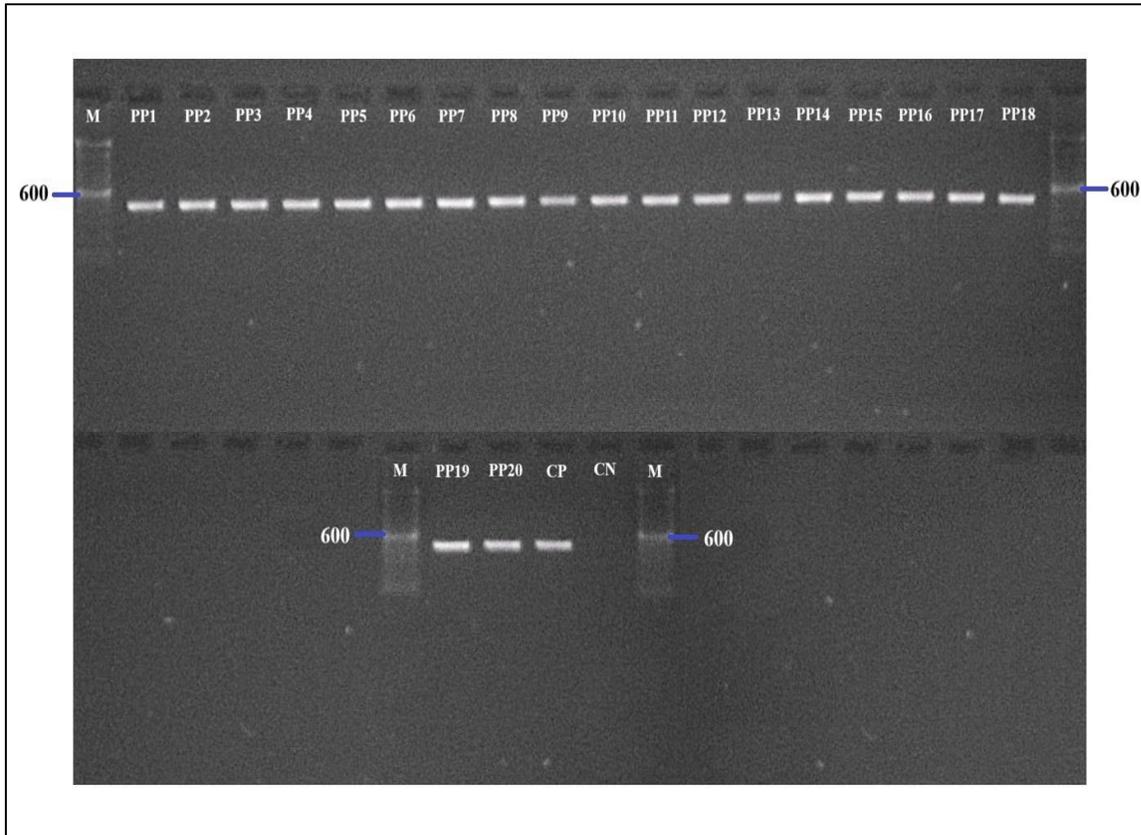


Figura 23. Amplificación del gen *matk* para estandarizar la concentración.

*rbcl*



Resultados PCR *in silico*

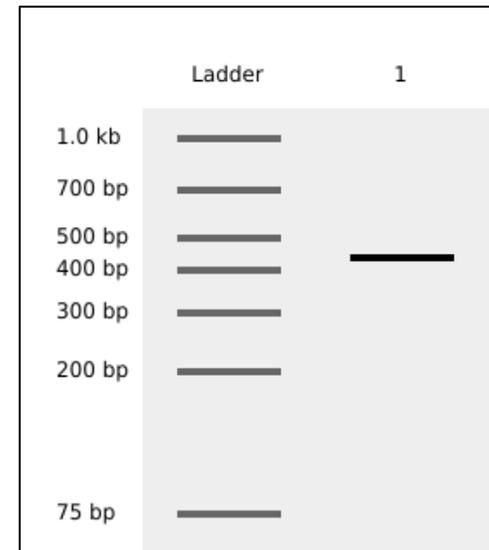


Figura 24. Amplificación gen *rbcl* para *Pernettya prostrata* con primers diseñados

*matK*

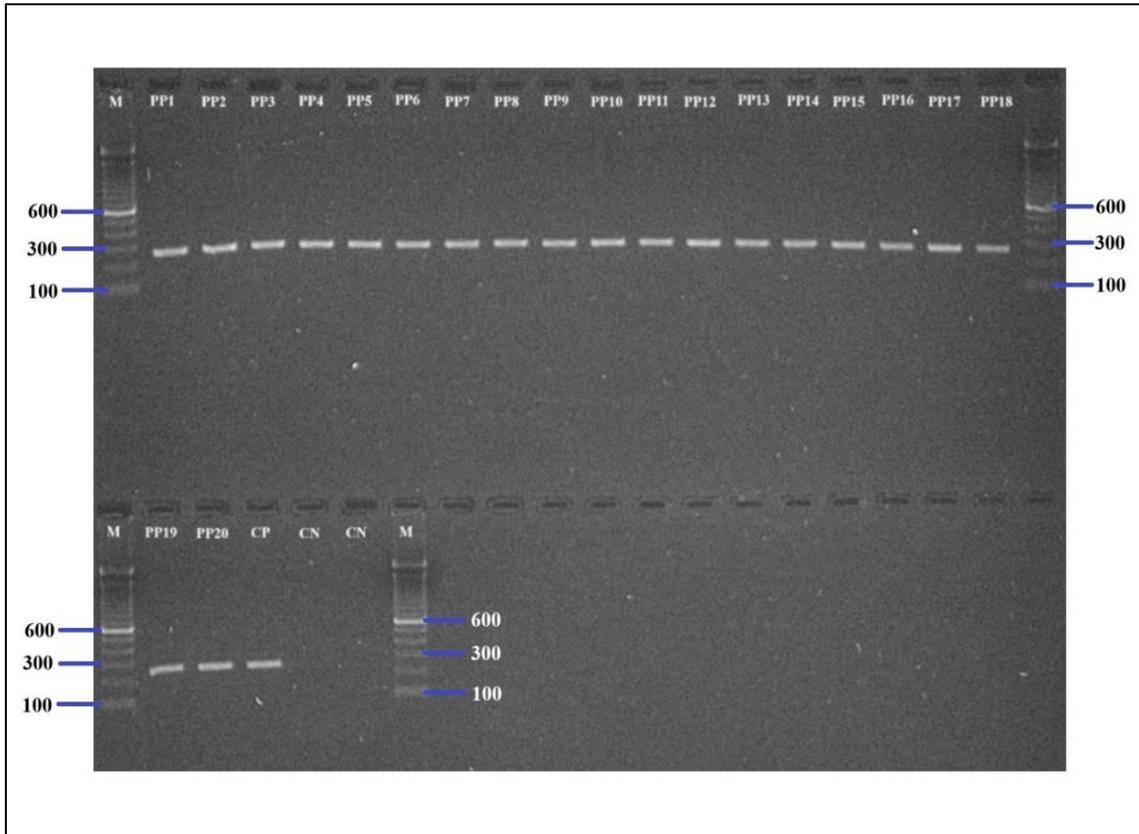
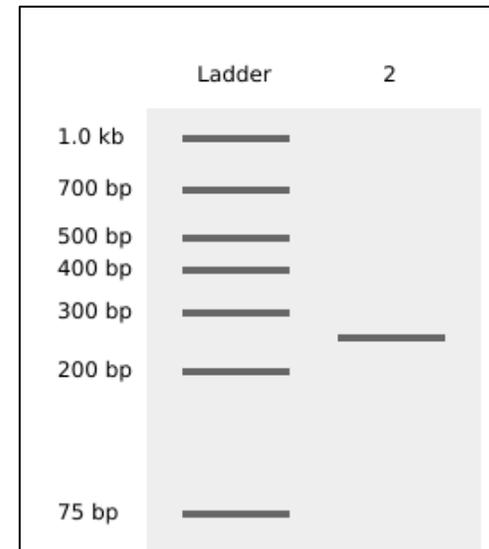


Figura 25. Amplificación gen *matK* para *Pernettya prostrata* con primers diseñados

Resultados PCR *in silico*



- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

- La recolección del material vegetal de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC en el Parque Nacional Cayambe-Coca permitió realizar la caracterización molecular a través de la extracción de ADN genómico.
- El método de extracción de ADN basado en el uso de los buffers CTAB y sorbitol permitió obtener ADN con una concentración que varió entre 126 y 842 ng/ $\mu$ L y una pureza entre 1,72 y 1.92 en 20 muestras de *Pernettya prostrata*, por lo que el material obtenido fue adecuado para realizar los ensayos moleculares pertinentes.
- Las pruebas estadísticas permitieron confirmar que el protocolo de extracción con los buffers CTAB y sorbitol presenta diferencias significativas con respecto a la concentración y pureza en comparación con los otros protocolos empleados.
- La amplificación de ADN con los primers diseñados para los genes *rbcL* y *matK* permitió obtener marcadores moleculares para la identificación de *Pernettya prostrata* en los bosques andinos del Ecuador.

- Introducción
- Objetivos e Hipótesis
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones

- Se sugiere incrementar las áreas de muestreo para la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC y realizar más pruebas moleculares para conocer su diversidad genética.
- Se sugiere realizar estudios moleculares en especies cercanas a *Pernettya prostrata* que se encuentren en los bosques y páramos andinos del Ecuador, para confirmar la eficiencia de los marcadores moleculares
- Se recomienda llevar a cabo más estudios moleculares en especies endémicas de los bosques andinos del Ecuador, para conocer y comprender la diversidad genética del país, así como para mejorar las técnicas de identificación de estas especies.



Karina Proaño, Ph. D  
Claudia Segovia, Ph. D  
Gabriela Miño, M.Sc.

Laboratorios de Biotecnología-  
ESPE

Familiares y Amigos

