



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

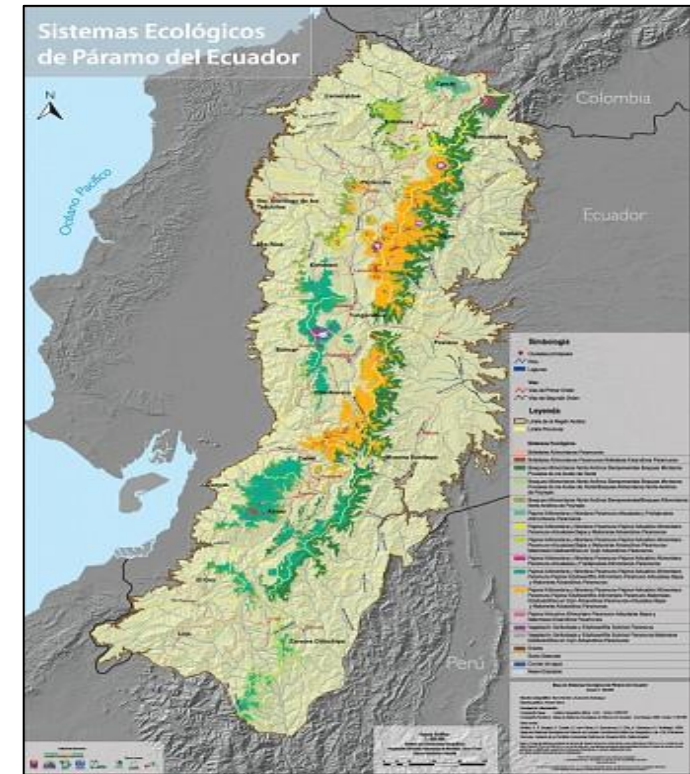


Figura 2. Mapa de bosques Andinos en Ecuador. Recuperado de Anónimo (2012)

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.

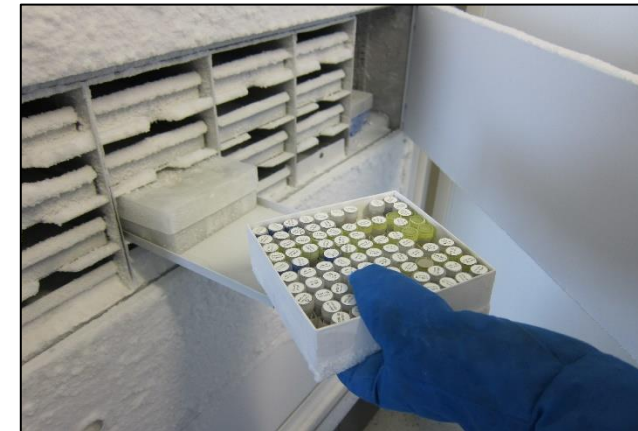


Figura 5. Ejemplo biobanco. Recuperado de: poner

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

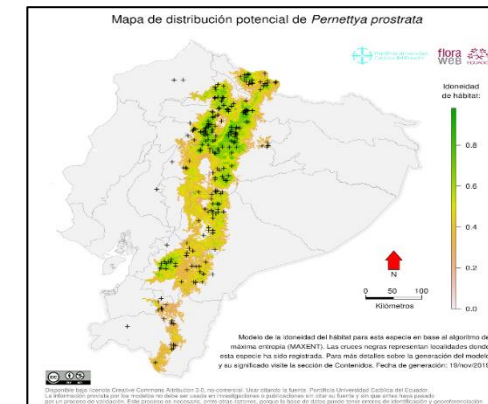


Figura 8. Mapa ubicación *Pernettya prostrata*. Recuperado de Romoleroux et al., (2019)

Técnicas moleculares

Marcadores moleculares

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

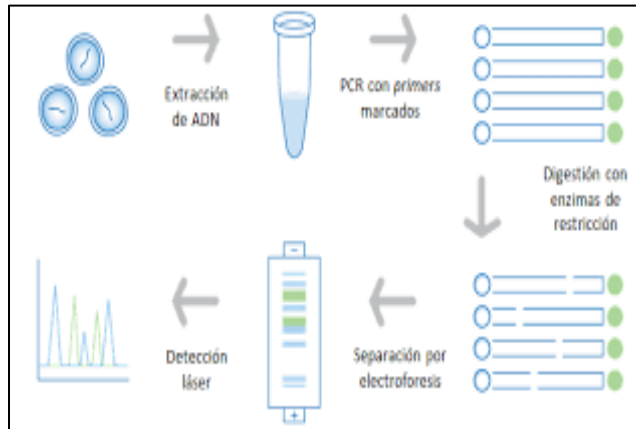


Figura 10. Técnicas moleculares. Recuperado de Diz, (2020)

Barcoding

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

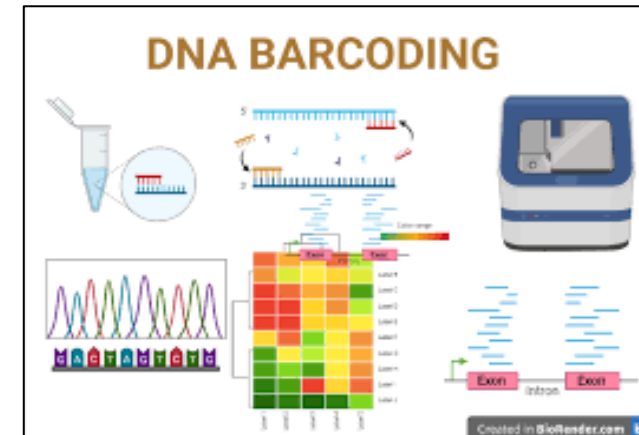


Figura 11. Barcoding DNA. Recuperado de Sciencevidid, (2022)

- 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"> • Estandarización extracción de ADN • Cuantificación y visualización de ADN • Validación de ADN • Diseño de primers • Amplificación de primers 	Análisis de datos obtenidos durante la fase de laboratorio



Figura . Recolección de muestras

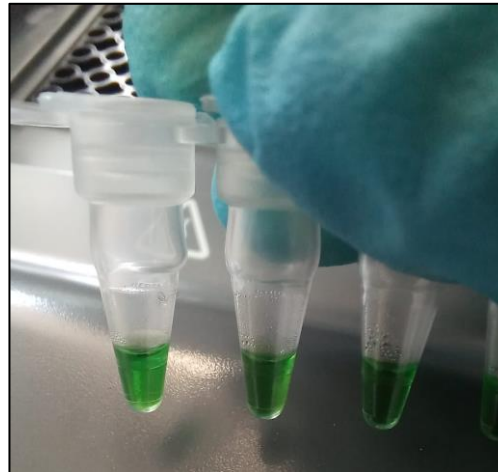


Figura . Amplificación de muestras

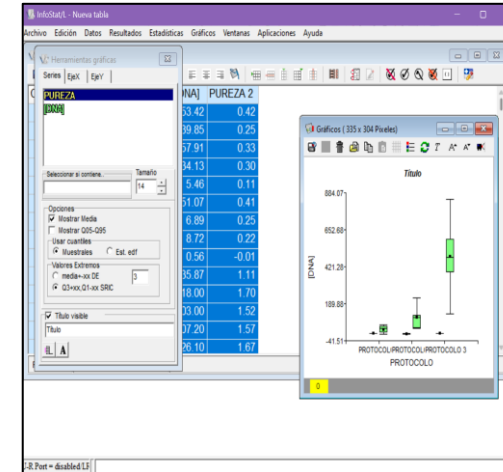


Figura . Análisis de datos

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

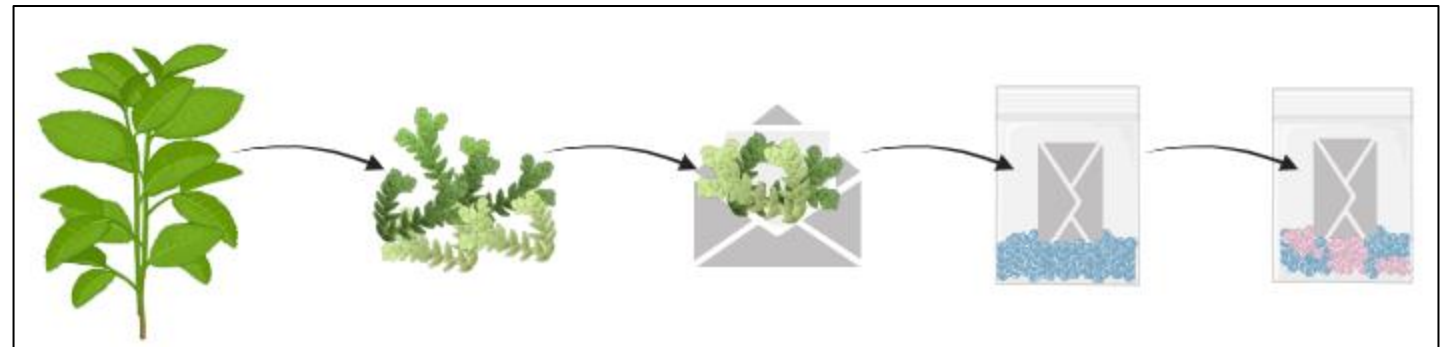


Figura 13. Proceso de recolección y almacenamiento

Fase de Laboratorio

Extracción de ADN

Tabla 1. Protocolos empleados para extracción de ADN

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

Cuantificación ADN

Espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific Multiskan SkyHigh*

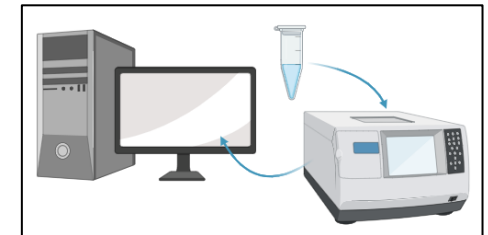


Figura 14. Cuantificación de ADN

Electroforesis

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

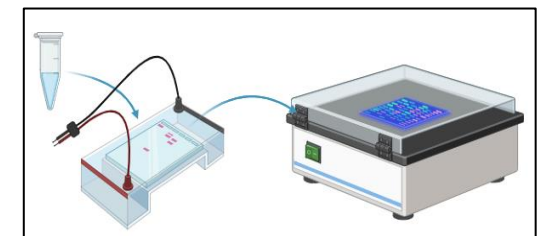


Figura 15. Integridad de ADN

Fase de Laboratorio

Extracción de ADN

Tabla 1. Protocolos empleados para extracción de ADN

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

Cuantificación ADN

Espectrofotómetro de microplacas *Thermo Scientific Multiskan SkyHigh*

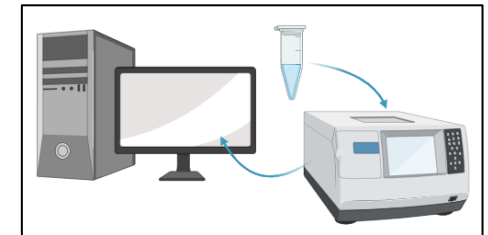


Figura 14. Cuantificación de ADN

Electroforesis

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

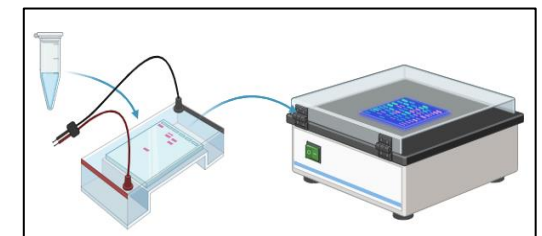


Figura 15. Integridad de ADN

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

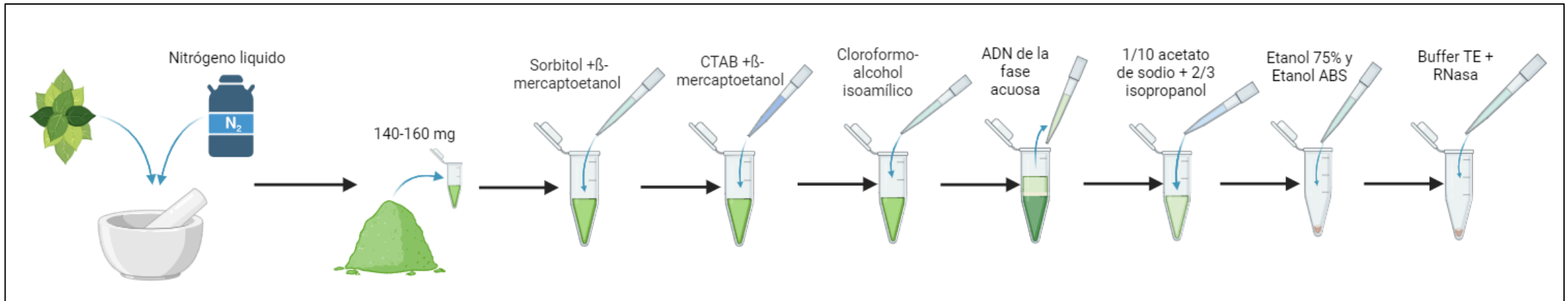


Figura 16. Protocolo extracción de ADN

Cuantificación ADN

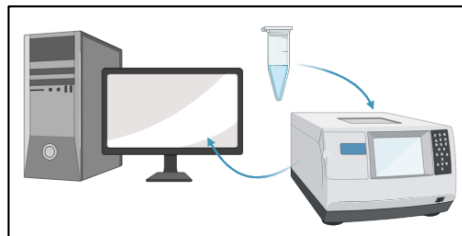


Figura 14. Cuantificación de ADN

Electroforesis

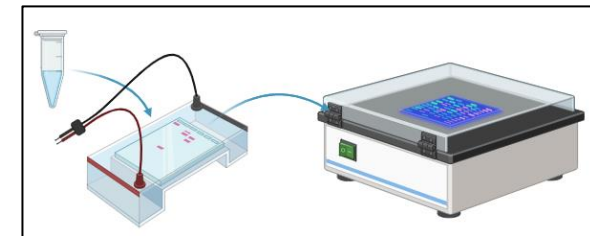


Figura 15. Integridad de ADN

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
ThermoScientific			
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)
Forward	ACAGAGACTAAAGCAA GTGT	20	40	50,6	1-20	-0.14	
Reverse	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)
Forward	TGGGCTCAACCAAGAA	23	52.2	59.7	406-428	-1.45	253
	GGATCCA					-1.02	
						-0.49	
Reverse	AACCGCTCCAGACCGG CTTACT	22	59.1	62.0	637-658	-1.52	



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
Volumen total		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/ μ L)	28.668	104.136	486.766

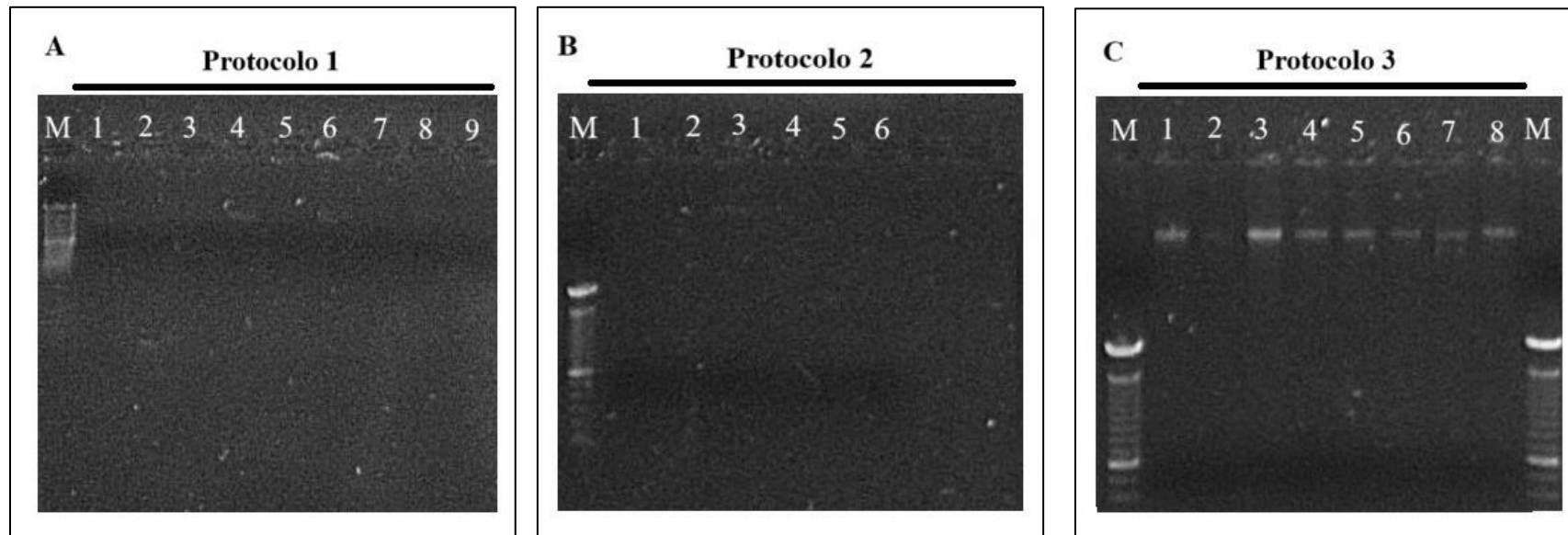


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de *Pernettya prostrata*

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

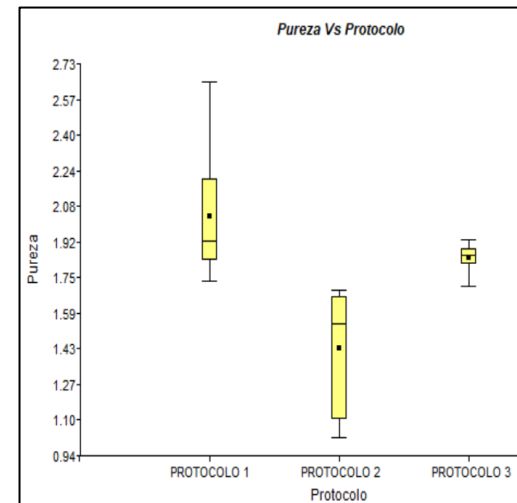


Figura 18. Box-plot purezas

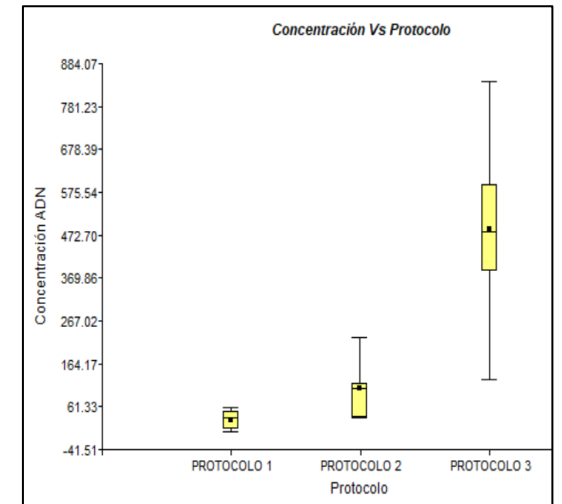


Figura 19. Box-plot concentraciones

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

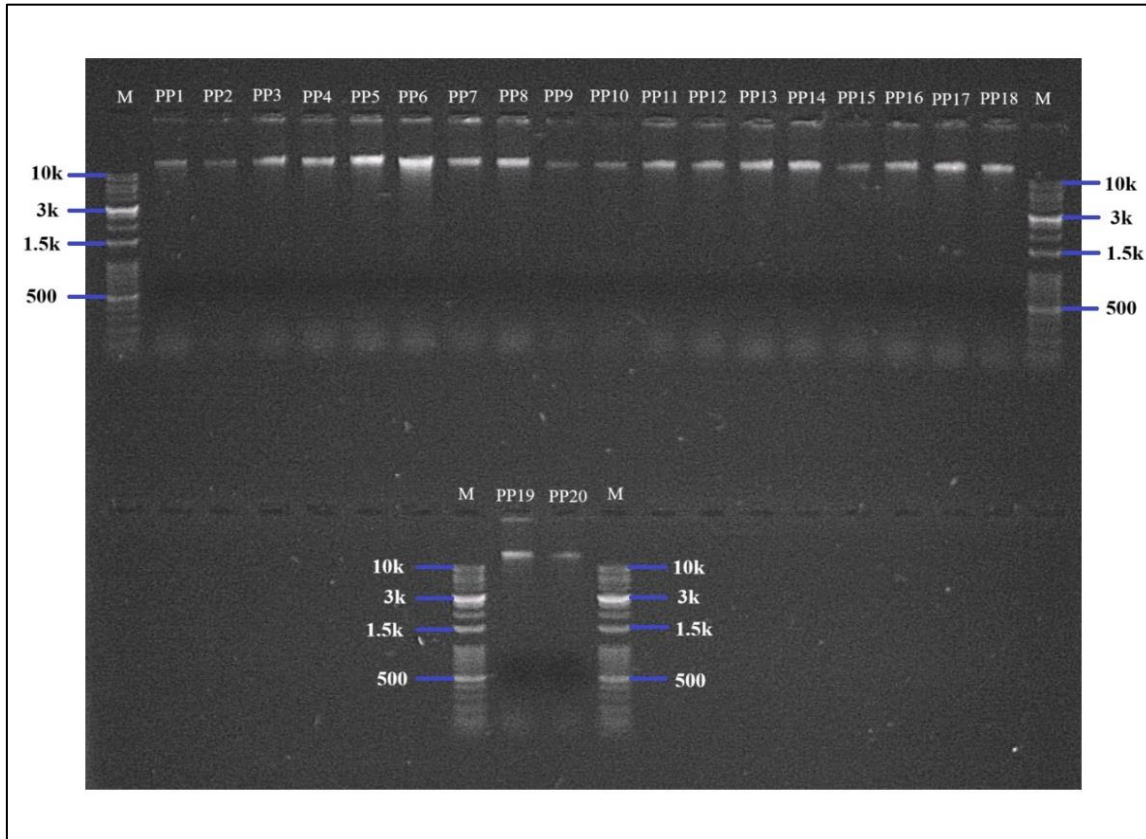


Figura 20. Extracción de ADN de 20 muestras de *Pernettya prostrata*

Protocolo 3: Souza et al. (2012)

Pureza (A260/280): 1.842

Pureza (A260/230): 1.726

Concentración (ng/ μ 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

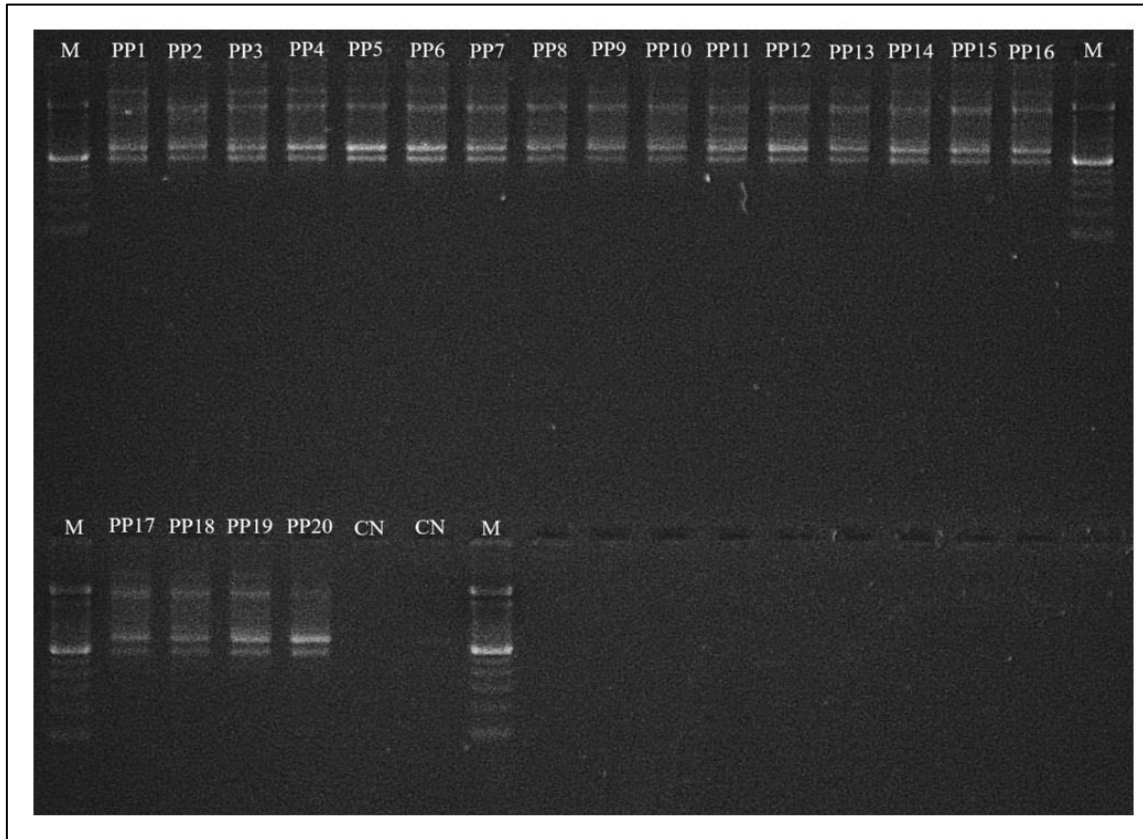


Figura 21. Amplificación de ADN con el marcador ISSR 17898A

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 μM .

rbcl

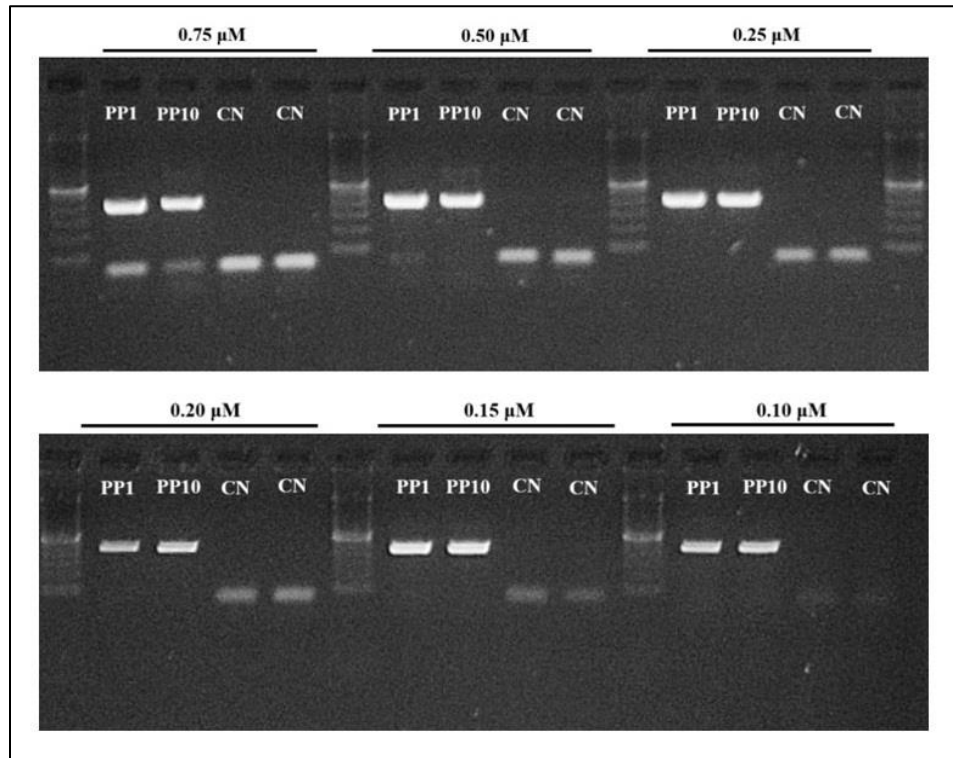


Figura 22. Amplificación del gen *rbcl* para estandarizar la concentración.

matk

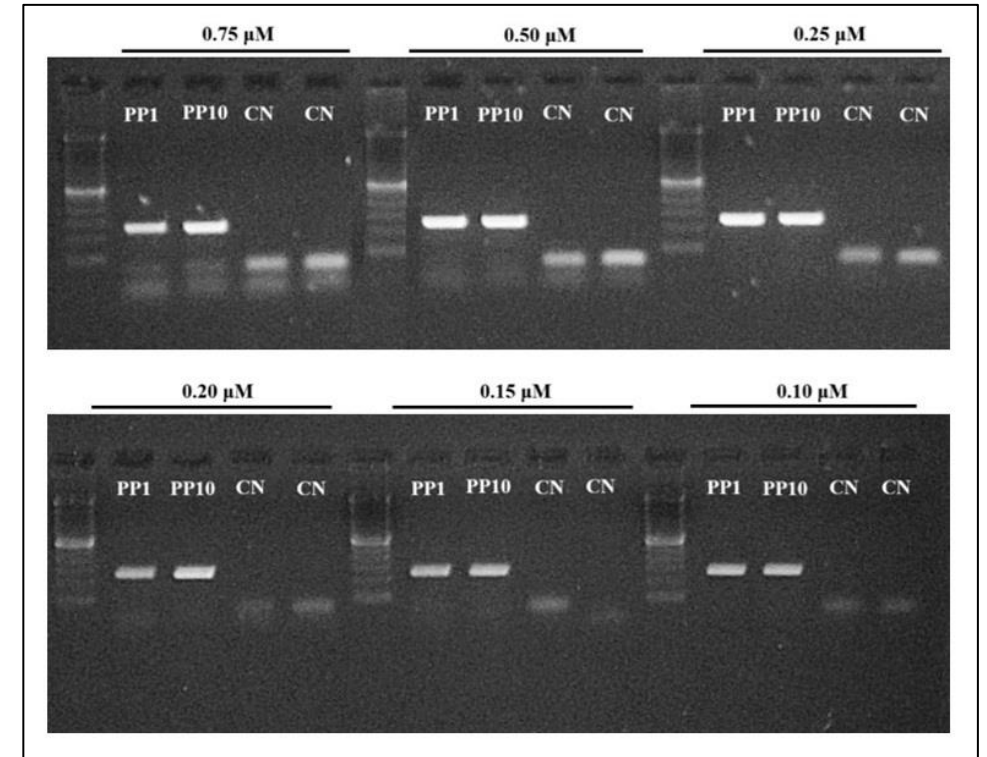
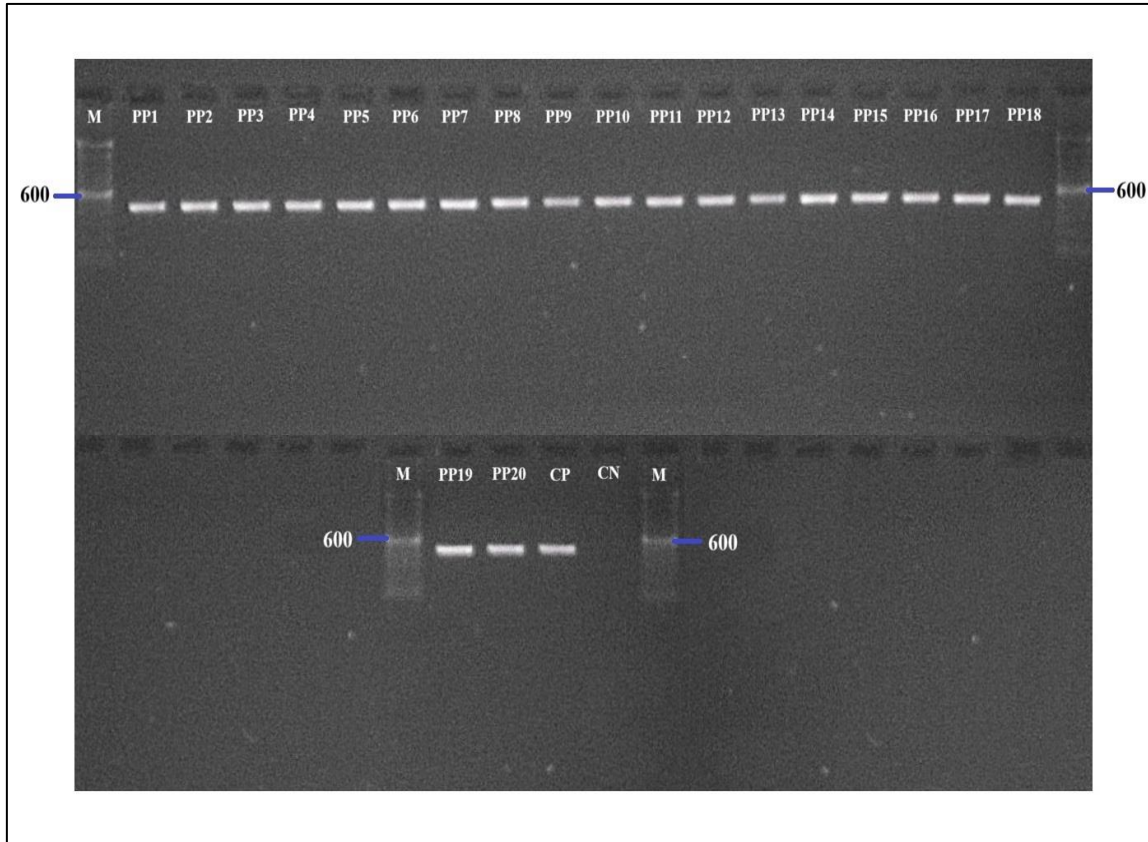


Figura 23. Amplificación del gen *matk* para estandarizar la concentración.

rbcl



Resultados PCR *in silico*

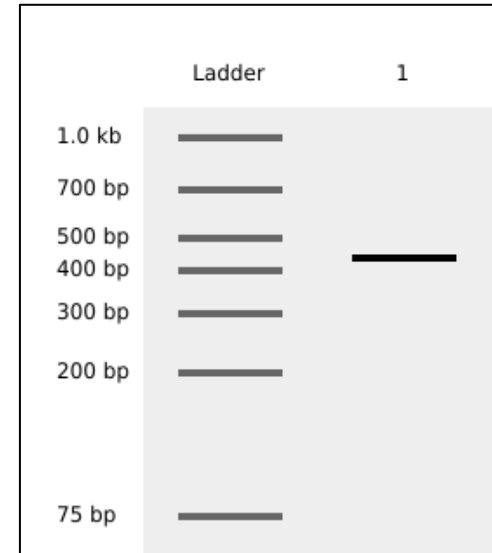


Figura 24. Amplificación gen *rbcl* para *Pernettya prostrata* con primers diseñados

matK

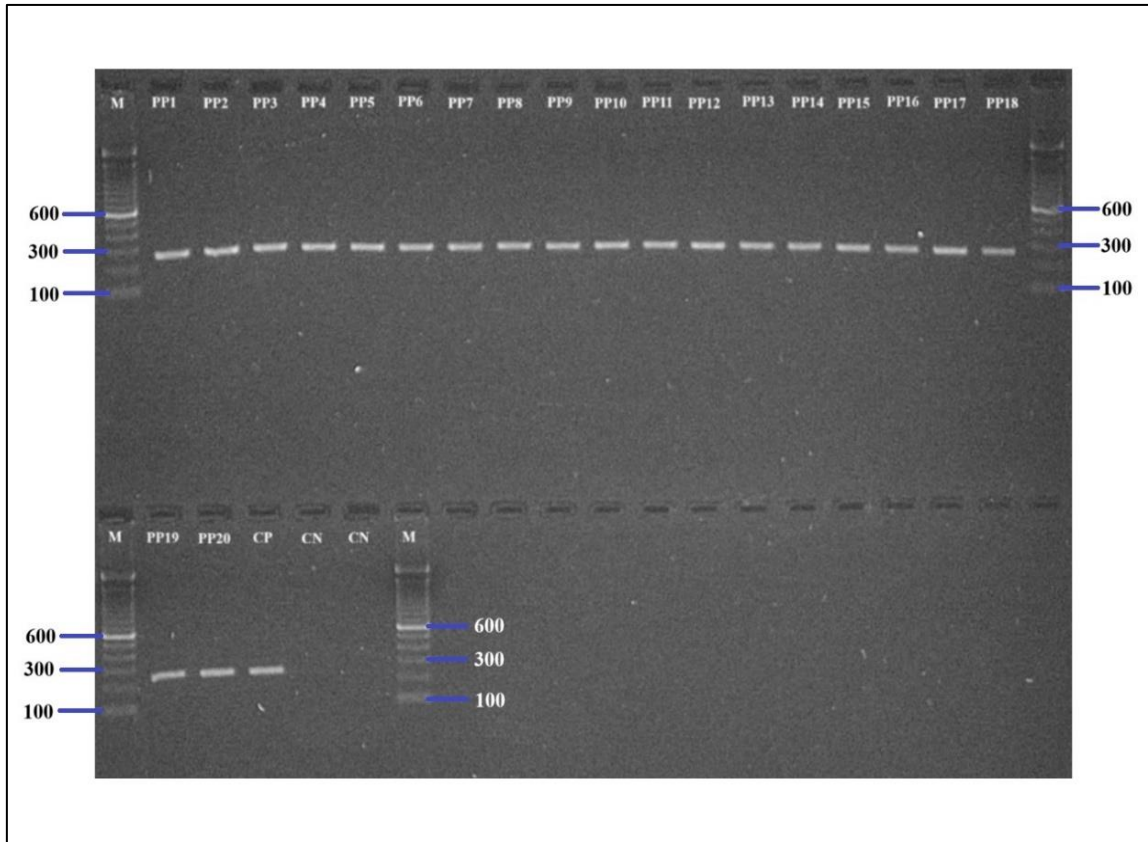
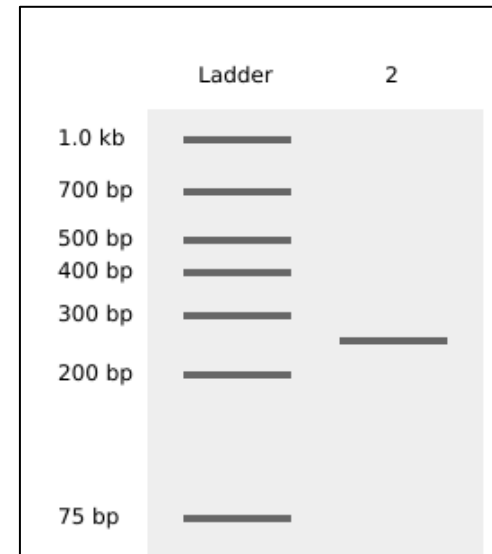


Figura 25. Amplificación gen *matK* para *Pernettya prostrata* con primers diseñados

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/ μ 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

