



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Polo Calva Melanie Noheli

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

Proaño Tuma Karina Isabel PhD.

01 de mayo del 2024

Resultados análisis de similitud de contenidos



Plagiarism and AI Content Detection Report

Polo Melanie_Proyecto IC.pdf

Scan details

Scan time:
March 3th, 2024 at 0:23 UTC

Total Pages:
42

Total Words:
10276

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	0.5%	55
Minor Changes	0.6%	61
Paraphrased	1%	98
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage		Words
AI text	0%	0
Human text	100%	10276

Proaño Tuma Karina Isabel PhD.

Directora del proyecto de integración curricular

CC: 1707245104



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Caracterización molecular de la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador”** fue realizado por la señorita **Polo Calva Melanie Noheli**, la mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 01 de mayo de 2024

Proaño Tuma Karina Isabel PhD.

Directora del proyecto de integración curricular

CC: 1707245104



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Polo Calva Melani Noheli**, con cédula de ciudadanía N°1719965202, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Caracterización molecular de la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 04 de marzo de 2024

Polo Calva Melanie Noheli

CC: 1719965202



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Polo Calva Melani Noheli**, con cédula de ciudadanía N°1719965202 autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "**Caracterización molecular de la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 04 de marzo de 2024

Polo Calva Melanie Noheli

CC: 1719965202

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a mi madre, Blanca Calva, quien siempre estuvo a mi lado para guiarme, apoyarme y aconsejarme. Ella es mi mayor ejemplo a seguir y su amor incondicional ha sido mi inspiración constante en cada paso de mi vida.

A mis familiares y amigos, quienes han convertido esta etapa de mi vida en la mejor experiencia. Su amistad y apoyo incondicional han sido fundamentales en cada paso que he dado.

Melanie Noheli Polo Calva

Agradecimiento

Primero, quiero agradecerle a mi madre, Blanca Calva, por ser la persona que más cree en mí y en mis capacidades. Su amor y apoyo son invaluable para mí.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. Karina Proaño y la Dra. María Claudia Segovia su apoyo incondicional. Su guía y colaboración fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la M.S.C. Gabriela Miño, le agradezco profundamente su confianza en mí y cada valiosa enseñanza que compartió durante esta etapa. Gracias por haberme dado la oportunidad de encontrar mi camino. También deseo reconocer al Proyecto Banco de Semillas Andinas Hans-Bank por brindarme la oportunidad de participar y profundizar mis conocimientos.

A los docentes del Departamento de Ciencias de la Vida que han compartido su conocimiento y experiencia conmigo, les expreso mi más sincero agradecimiento. Cada lección impartida y consejo brindado han sido invaluable para mi crecimiento y aprendizaje

A mis amigos Andrés, Leonardo, Odalys, Jorge y Gabriela, les estoy infinitamente agradecida por su constante compañía y por convertir esta etapa en una de las mejores épocas de mi vida. Su amistad y apoyo han sido un verdadero tesoro en este camino de aprendizaje y crecimiento. A los amigos que hice durante todo este trayecto, les agradezco de corazón por convertir la universidad en un segundo hogar para mí. Su amistad y apoyo han sido un verdadero tesoro en este camino de aprendizaje y crecimiento.

A Marco, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por estar siempre a mi lado y por brindarme su apoyo incondicional en cada paso del camino. Gracias por cada momento compartido y por hacer que esta experiencia sea aún más especial.

A mis queridos familiares, les agradezco por su apoyo a lo largo de este viaje. Su constante aliento ha sido un pilar fundamental en mi camino hacia el logro de mis metas.

Melanie Noheli Polo Calva

Índice de Contenido

Resultados análisis de similitud de contenidos	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Resumen	13
Abstract	14
Capítulo I: Introducción	15
Planteamiento del problema	15
Justificación del problema	16
Hipótesis	18
Objetivos.....	18
<i>General</i>	18
<i>Específicos</i>	18
Capítulo II: Marco teórico	19
Bosques y páramos andinos del Ecuador	19
Importancia de los bosques y páramos andinos ecuatorianos	19
Amenazas de los bosques y páramos andinos	20
Familia <i>Ericaceae</i>	21

<i>Generalidades de Pernettya Prostrata</i>	22
Caracterización molecular	24
Técnicas moleculares	25
<i>Marcadores de ADN</i>	25
<i>Marcadores basados en PCR</i>	25
<i>Barcoding</i>	26
<i>rbcl y matK</i>	26
Capítulo III: Materiales y métodos	27
Muestreo	27
Extracción de ADN y cuantificación.....	29
<i>Protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle (1991)</i>	29
<i>Protocolo de extracción de ADN modificado para Vaccinum floribundum descrito por Mojica et al. (2018)</i>	30
<i>Protocolo de extracción de ADN de Souza et al. (2012)</i>	30
Cuantificación de ADN	31
Electroforesis en geles de agarosa	32
Validación de ADN	32
<i>Condiciones de amplificación</i>	33
Diseño de marcadores moleculares para Barcoding	34
<i>Condiciones de amplificación</i>	35
Capítulo IV: Resultados	37

Extracción y cuantificación de ADN.....	37
Análisis estadístico.....	40
Validación de ADN	47
Marcadores moleculares	48
Capítulo V: Discusión	52
Capítulo VI: Conclusiones.....	56
Capítulo VII: Recomendaciones	57
Capítulo VIII: Referencias bibliográficas.....	57
Capítulo IX: Apéndices	66

Índice de Tablas

Tabla 1 Ubicación de las muestras tomadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca.....	27
Tabla 2 Concentraciones de reactivos.	33
Tabla 3 Concentración de los reactivos para la amplificación del ISSR 17898A.	33
Tabla 4 Condiciones de amplificación para el marcador molecular ISSR 17898A.	34
Tabla 5 Cebadores forward y reverse diseñados para los marcadores rbcL y matK de <i>Pernettya prostrata</i>	35
Tabla 6 Concentración de reactivos para la amplificación de los marcadores rbcL y matK.	35
Tabla 7 Condiciones de amplificación para los marcadores moleculares rbcL y matK para <i>Pernettya prostrata</i>	36
Tabla 8 Temperaturas de alineamiento para los marcadores rbcL y matK.	36
Tabla 9 Cuantificación de ADN de <i>Pernettya prostrata</i> con el protocolo de Souza et al. (2012).	38
Tabla 10 Intervalos de confianza de pureza y concentración de ADN de los protocolos estudiados.....	41
Tabla 11 Prueba de Shapiro-Wilks para las variables de pureza y concentración de ADN.....	44
Tabla 12 ANAVA (SC tipo III) basado en la pureza de ADN.....	44
Tabla 13 ANAVA (SC tipo III) basado en la concentración de ADN.....	45
Tabla 14 Prueba de Duncan (Alfa=0.05) para la pureza de ADN obtenida de los protocolos empleados.	46
Tabla 15 Prueba de Duncan (Alfa=0.05) para la concentración de ADN obtenida de los protocolos empleados.	46

Índice de figuras

Figura 1 Distribución de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC. en Ecuador.	22
Figura 2 <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC.	23
Figura 3 Mapa de ubicación de las muestras recolectadas de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) DC.	28
Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de <i>Pernettya prostrata</i>	37
Figura 5 Extracción de ADN de 20 muestras de <i>Pernettya prostrata</i>	40
Figura 6 Comparación de pureza de ADN entre protocolos de extracción.	42
Figura 7 Comparación de concentración de ADN entre protocolos de extracción.	43
Figura 8 Amplificación de ADN con el marcador ISSR 17898A.	47
Figura 9 Amplificación del gen <i>rbcL</i> para estandarizar la concentración.	48
Figura 10 Amplificación del gen <i>matK</i> para estandarizar la concentración.	49
Figura 11 Amplificación gen <i>rbcL</i> para <i>Pernettya prostrata</i> con primers diseñados.	50
Figura 12 Amplificación gen <i>matK</i> para <i>Pernettya prostrata</i> con primers diseñados.	51

Resumen

Los bosques y páramos andinos son ecosistemas con una alta diversidad biológica que cumplen roles ecosistémicos importantes. Ecuador presenta una gran riqueza de flora con características fenotípicas únicas. No obstante, estas especies se encuentran amenazadas por diversos factores antropológicos y ambientales. *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., comúnmente conocida como “mortiño”, “manzana” o “moridera”, es una especie arbustiva nativa de los Andes perteneciente a la familia *Ericaceae*. Los estudios realizados en esta especie se han enfocado únicamente a nivel fitoquímico y morfológico. Por lo que, el presente estudio, a través del proyecto de banco de semillas Andinas HANS-BANK, se enfoca en la caracterización molecular de esta especie mediante el uso de marcadores moleculares de los genes *rbcl* y *matK*. El objetivo principal es crear un código de barras de ADN para la futura identificación de *Pernettya prostrata* en los bosques andinos. Para llevar a cabo este estudio, se realizó una recolección de muestras vegetales en el Parque Nacional Cayambe-Coca, a partir de las cuales se procedió a la extracción de ADN. El protocolo basado en el uso de los buffers CTAB y sorbitol presentó mejores resultados. Este protocolo permitió obtener una concentración de ADN entre 126 y 842 ng/ μ L y una pureza (A260/280) entre 1,72 y 1.92. Mediante un análisis estadístico se corroboró los resultados obtenidos en la extracción de ADN. Finalmente, se realizó una amplificación con los primers diseñados para los genes *rbcl* y *matK*, obteniendo bandas con un tamaño de amplicón de 440 pb para *rbcl* y de 253 pb para *matK*. Estos resultados permitieron realizar la caracterización e identificación molecular de la especie *Pernettya prostrata* en los bosques andinos del Ecuador.

Palabras clave: Pernettya prostrata, ADN, Barcoding, marcadores moleculares

Abstract

The Andean forests and bogs are ecosystems with high biodiversity, they play important ecological roles. Ecuador has a great wealth of flora with unique phenotypic characteristics. However, these species are threatened by various anthropological and environmental factors. *Pernettya prostrata* (Cav.) DC., commonly known as “mortiño”, “manzana” or “moridera”, is a shrub native to the Andes and belongs to the Ericaceae family. The studies carried out on this species have focused only on the phytochemical and morphological level. Therefore, the present study, through the HANS-BANK Andean Seed Bank Project, focuses on the molecular characterization of this species using molecular markers of the *rbcL* and *matK* genes. The main objective is to create a DNA barcode for future identification of *Pernettya prostrata* in Andean forests. To carry out this study, plant samples were collected at the Cayambe-Coca National Park and DNA extraction was performed. The protocol based on CTAB and sorbitol buffers showed better results. This protocol allowed obtaining a DNA concentration between 126 and 842 ng/ μ L and a purity (A260/280) between 1.72 and 1.92. Statistical analysis confirmed the results obtained in DNA extraction. Finally, amplification was performed with primers designed for the *rbcL* and *matK* genes, obtaining bands with an amplicon size of 440 bp for *rbcL* and 253 bp for *matK*. These results allowed the characterization and molecular identification of the species *Pernettya prostrata* in the Andean forests of Ecuador.

Keywords: *Pernettya prostrata*, DNA, barcoding, molecular markers

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

Los bosques y páramos andinos son conocidos por ser uno de los ecosistemas más biodiversos del planeta, los cuales cubren cerca del 2% de la superficie de los países neotropicales (Bussmann, 2005; Caranqui et al., 2016). Los ecosistemas andinos se extienden entre los 3000 hasta los 4800 m s.n.m. En este gradiente montañoso se encuentran ubicadas el 6.7% de las plantas endémicas mundiales, albergando 125 familias, 500 géneros y 3400 especies de plantas vasculares (Caranqui et al., 2016; Chuncho & Chuncho, 2019; Cuesta et al., 2014).

En el Ecuador, los páramos ocupan el 33.6% de la superficie global. Se han registrado 1524 especies de plantas vasculares, siendo 628 endémicas de esta zona. Ecuador es el país con la flora más diversa de la región andina (Caranqui et al., 2016; Llambí & Cuesta, 2014), posiblemente por los gradientes de clima y geología que guardan una estrecha relación con los patrones espaciales de biodiversidad y las funciones ecosistémicas tales como el ciclo hidrológico (Buytaert et al., 2014).

Los ecosistemas andinos proporcionan agua a los valles interandinos, beneficiando directa e indirectamente a millones de personas. Los principales factores que convierten a los páramos en una valiosa fuente de recursos hídricos son la baja evapotranspiración, alta humedad, acumulación de materia orgánica y la morfología de ciertas plantas. Asimismo, los páramos son una importante reserva de carbono, almacenando seis veces más carbono que los bosques tropicales (Buytaert et al., 2014; Chuncho & Chuncho, 2019).

Todas las funciones ecosistémicas de los páramos y bosques andinos son de vital importancia. Sin embargo, la falta de atención hacia estos ecosistemas los vuelve vulnerables a impactos ambientales. Los principales parámetros que influyen en la pérdida de especies y en la degradación de los bosques son: el crecimiento poblacional, incendios forestales, el establecimiento de cultivos, la

actividad minera, los sistemas agropecuarios y la explotación masiva de recursos como la madera (Llambí et al., 2012; P. Velasco & Vargas, 2008).

El gobierno ecuatoriano ha buscado desarrollar políticas y estrategias para el cuidado de los páramos. En el 2013, se implementó el Plan Nacional para el Buen Vivir en el que se establecieron lineamientos para la conservación y gestión sostenible enfocados en la investigación, monitoreo, restauración y recuperación de esta área (Moya & Santamaría, 2023). En Ecuador se han establecido áreas protegidas y reservas hídricas con la finalidad de salvaguardar la biodiversidad y los servicios ecosistémicos. Además, el ordenamiento jurídico ecuatoriano protege a los páramos por su importancia ecológica y su gran biodiversidad (Moya & Santamaría, 2023).

Justificación del problema

Los páramos juegan un papel importante en la biodiversidad a nivel mundial. La combinación de los factores ambientales a diferentes temperaturas y altitudes influyen sobre la diversidad de la flora y fauna de esta zona. Los principales factores que influyen sobre la biodiversidad ecuatoriana son la situación ecuatorial, la presencia de la cordillera de los Andes, la existencia de una fuente perhúmeda amazónica y de varias corrientes marinas tanto cálidas como frías frente a las costas (Mena & Hofstede, 2006; Moscoso, 2023).

Lamentablemente, existen factores tales como el crecimiento poblacional, los incendios forestales, el establecimiento de cultivos, los sistemas agropecuarios y la actividad minera que provocan la degradación de los páramos y amenazan la biodiversidad (Llambí et al., 2012; P. Velasco & Vargas, 2008). Además, el cambio climático afecta los ecosistemas andinos, que son frágiles y susceptibles a procesos de alteración, ocasionando una pérdida y fragmentación de hábitat (Buytaert et al., 2014).

En el Ecuador, Hofstede et al. (2014) determinó que el 75% de las especies endémicas se encuentran bajo amenaza y apenas el 48% se encuentran dentro de áreas protegidas. Las familias *Orchidaceae* y *Asteraceae* cuentan con la mayor diversidad de especies endémicas. Los géneros con

mayor número de especies endémicas son *Gentianella*, *Epidendrum*, *Lysiponia*, *Draba*, *Lephanthes*, *Pleurothallis*, *Bachyotum*, *Berberis*, *Geranium*, *Calamagrostis*, *Gynoxys*, *Puya* y *Lupinus*.

La familia *Ericaceae* se encuentra entre las 10 familias más diversas en géneros y especies, junto con *Orchidaceae* y *Asteraceae*. Esta familia es parte de la vegetación de los bosques húmedos de las montañas andinas. En Ecuador se encuentran 22 géneros y 221 especies de *Ericaceae*, de las cuales el 44% de las especies son endémicas del país. Uno de los géneros más representativos es el género *Pernettya* (Izco et al., 2007; Pedraza et al., 2017; Rincón et al., 2014).

El 89.7% de las especies de *Ericaceae* se encuentran bajo amenaza. Las principales amenazas de esta familia en el país son: la deforestación, la fragmentación de hábitat, la colonización y la expansión de la frontera agrícola. Asimismo, algunas especies de páramos se ven amenazadas por el pastoreo y el fuego provocado (Pedraza et al., 2017).

En las últimas décadas la aplicación de la biología molecular en plantas ha tenido un crecimiento significativo. Los avances de nuevas técnicas han permitido el desarrollo de métodos de identificación y caracterización utilizando marcadores moleculares. Estos marcadores son aplicables a cualquier tipo de material vegetal. Existen dos tipos: las proteínas (isoenzimas) y los marcadores de ADN. Los marcadores idóneos son los de ADN que se fundamentan en las diferencias de pequeñas secuencias de ADN. Las principales técnicas son: Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Microsatélites o Secuencias simples repetidas, Inter Secuencias simples repetidas (ISSR), entre otras (Azofeifa, 2006; Lara & Sánchez, 1994).

Otra técnica para obtener la información genética única son los códigos de barras de ADN (DNA barcoding), la cual permiten obtener información genética única para distinguir especies morfológicamente similares o con una plasticidad fenotípica (Aguilar, 2022). Pese a estos problemas, no existen estudios moleculares en algunas familias y géneros endémicos de los bosques y páramos andinos, por lo que es importante realizar estudios morfológicos y moleculares de las especies andinas

encontradas en Ecuador. En este contexto, la finalidad de este estudio es caracterizar molecularmente a *Pernettya prostrata* para la preservación de su material genético por medio del proyecto HANS-BANK.

Hipótesis

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

Objetivos

General

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

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.

Capítulo II: Marco teórico

Bosques y páramos andinos del Ecuador

Los bosques y páramos andinos son ecosistemas naturales con una alta diversidad de flora y fauna a nivel mundial (Jadán et al., 2019). Su gradiente montañoso se extiende desde los 3000 m s.n.m hasta aproximadamente los 4500 m s.n.m. En Ecuador la altitud promedio de los páramos se encuentra entre los 3300 m y abarcan el 7% de su territorio (Chuncho & Chuncho, 2019).

El ecosistema de los páramos se caracteriza por sus tres pisos altitudinales: subpáramo transicional, páramo y superpáramo. La vegetación encontrada en cada uno de los pisos altitudinales presenta características fenotípicas únicas (Tobón & Morales, 2007). En Ecuador, la riqueza de flora en los páramos ecuatorianos es una consecuencia de la variación en el área, diversidad de hábitat y régimen de perturbación (Romoleroux et al., 2023).

Ecuador cuenta con 628 especies endémicas que representan el 15% de la flora endémica del país y el 4% del total de la flora. Existen 273 especies que se encuentran restringidas a los páramos ecuatorianos y en los últimos 11 años se ha dado un aumento en el número de plantas endémicas y nativas (Mena et al., 2011; Romoleroux et al., 2023). Según Cayuela & Granzow-de la Cerda (2012) la gran diversidad encontrada en los ecosistemas de páramos se da tanto por la heterogeneidad climática como por la historia geológica

Importancia de los bosques y páramos andinos ecuatorianos

Los páramos son ecosistemas con una alta diversidad biológica que han contribuido al desarrollo de varios grupos humanos y culturales (Llambí & Cuesta, 2014). Su importancia radica en brindar recursos hídricos a las poblaciones de las zonas bajas. La capacidad de almacenar y regular agua es producto de las precipitaciones y el descongelamiento de la nieve o hielo que se ubican en las zonas altas. Esta propiedad se da por la acumulación de la materia orgánica y por la morfología de ciertas plantas encontradas en el páramo (Chuncho & Chuncho, 2019).

Por otra parte, los páramos actúan como sumideros de carbono, ya que almacenan más carbono que los bosques tropicales (Chuncho & Chuncho, 2019). Gracias a las bajas temperaturas y a la lenta degradación de materia orgánica se produce una reducción en las tasas de descomposición; por lo tanto, los suelos pueden acumular 60 kgC/m^2 , lo que los convierte en la mayor reserva de carbono. Al ser los páramos un reservorio de carbono estos juegan un papel fundamental en la mitigación de los efectos en el aumento de Dióxido de Carbono (CO_2) (Ayala et al., 2014).

Amenazas de los bosques y páramos andinos

Los páramos andinos son ecosistemas únicos que son susceptibles a procesos de alteración causados por cambios ambientales como la fragmentación, pérdida de hábitat o sobreexplotación de recursos (Buytaert et al., 2014). Las principales amenazas se derivan por la agricultura, el pastoreo extensivo, la quema, la minería y el cambio climático; siendo este último la causa de la modificación en los pisos altitudinales (A. Zapata, 2021).

Los andes ecuatorianos son regiones ricas en diversidad biológica que han albergado poblaciones humanas desde hace millones de años. A pesar de su gran importancia para el desarrollo de las poblaciones humanas, estas han estado expuestas a destrucción por el desarrollo de la agricultura y el crecimiento poblacional. Se estima que cerca del 85% de los hábitats andinos han desaparecido y como consecuencia los ecosistemas endémicos se encuentran bajo amenaza de extinción (G. Zapata & Branch, 2014).

La variación de temperatura y precipitación afectan a la biota nativa, especialmente a las especies con nichos climáticos estrechos. Los ecosistemas del páramo son vulnerables al calentamiento y a la pérdida de hábitat (Hofstede et al., 2014). El 75% de las especies endémicas encontradas en los páramos ecuatorianos se encuentran amenazadas, pero solamente el 48% han sido registradas en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Ecuador (Mena et al., 2011). Muriel et al. (2014) afirma que los estudios del estado de conservación de las especies de plantas establecen que los niveles de amenaza se

incrementan. Por lo que es importante realizar estudios morfológicos y moleculares para la identificación y caracterización de plantas de páramo, debido a que no se han realizado suficientes investigaciones en la flora endémica de los bosques andinos ecuatorianos.

Familia *Ericaceae*

La familia *Ericaceae* es propia de zonas templadas, subtempladas y de los bosques montanos tropicales. Se la encuentra en zonas con humedad elevada y temperaturas medias. Las especies de esta familia crecen entre los 1000 a 4000 m s.n.m a temperaturas en torno a los 6º y 24º. Pertenece al grupo de las 10 familias más diversas de géneros y especies de los páramos de pajonales meridionales ecuatorianos (Izco et al., 2007; Pacheco et al., 2022). La familia *Ericaceae* está conformada por aproximadamente 123 géneros y 4000 especies. En el Neotrópico se encuentran 46 géneros y 900 especies nativas, de las cuales 22 géneros y 221 especies están en Ecuador (Abril, 2010; Pedraza et al., 2017).

Los géneros de esta familia necesitan requerimientos climáticos específicos para su crecimiento, por lo que su distribución está restringida a características geográficas de latitud y altitud. Son abundantes en bordes de caminos, barrancos y prefieren los ecotonos de los bosques. Es una familia importante en los ecosistemas andinos, ya que algunas especies son parte de la base alimenticia de la fauna de la zona. Uno de los géneros que destacan en la Familia *Ericaceae* es el género *Pernettya* (Pedraza et al., 2017).

El género *Pernettya* está ampliamente distribuido en la Atlántida y Oceanía. En el caso de América se la encuentra desde el sur de México hasta el extremo noroeste de Argentina (Rincón et al., 2014). Está conformado por 20 especies, de las cuales 15 se encuentran en América y 5 en Nueva Zelanda (Chaves, 2007).

En el país el 89.7% de especies de ericáceas están amenazadas y 6 especies se encuentran en peligro crítico. La conservación de estas especies se enfrenta a la amenaza de factores como:

deforestación, fragmentación de hábitat, expansión de la industria agrícola, entre otros (Pacheco et al., 2022; Pedraza et al., 2017).

Las investigaciones en especies de este género se han realizado a nivel fitoquímico, etnobotánico y biológico (Rincón et al., 2014). Una de las especies más estudiada de esta familia es *Vaccinium floribundum* de la cual algunos de sus estudios son moleculares. Por otro lado, de la especie *Pernettya prostrata* no se han encontrado investigaciones a nivel molecular.

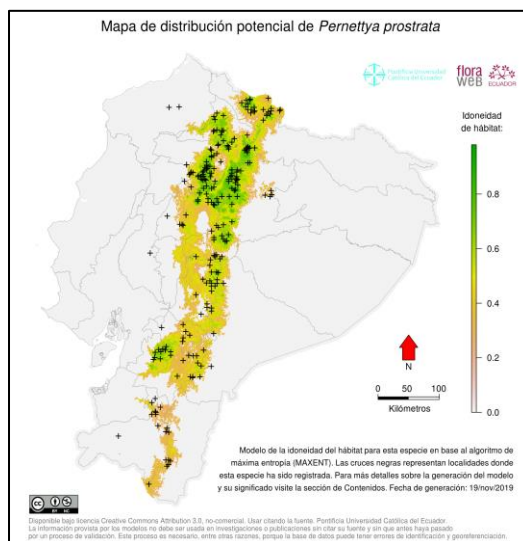
Generalidades de *Pernettya Prostrata*

Distribución

Pernettya prostrata (Cav.) DC, comúnmente conocida como “mortiño”, “manzana” o “moridera”, es una especie arbustiva nativa de los andes. Crece en zonas con una altura desde los 1000 a los 3820 m s.n.m (Grefa, 2014; Romoleroux et al., 2019). En Ecuador se la encuentra desde los 2900 m s.n.m. y en provincias como: Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Pichincha, Sucumbios, Tungurahua y Zamora Chinchipe (Romoleroux et al., 2019). En la figura 1 se observa la distribución de *Pernettya prostrata* en las diferentes provincias del Ecuador.

Figura 1

Distribución de Pernettya prostrata (Cav.) DC. en Ecuador.



Nota. Distribución de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. en 11 provincias del Ecuador. Recuperado de Romoleroux et al. (2019).

Descripción

Pernettya prostrata presenta hojas pequeñas alternas, simples y con consistencia coriácea. Sus flores son solitarias y presentan los lóbulos del cáliz secos. Los frutos son bayas subglobosas, glabras pubescentes de color violeta. En la figura 2 se observan las características fenotípicas de *Pernettya prostrata* (Chaves, 2007; Romoleroux et al., 2019).

Figura 2

Pernettya prostrata (Cav.) DC.



Nota. *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. Parque Nacional Cayambe Coca, Sector “Laguna de Loreto-Papallacta”. 3852 m.s.n.m

Su fruto es comestible en pequeñas cantidades debido a que tienen propiedades tóxicas y alucinógenas. En ciertas localidades de la sierra ecuatoriana se utilizan los frutos para preparar coladas y las hojas sirven como forraje para borregos y chivos (Romoleroux et al., 2019). Se han realizado algunos estudios a nivel fitoquímico, etnobotánico y biológico (Rincón et al., 2014). A nivel fitoquímico se ha

encontrado que sus frutos presentan dos diterpenos, posiblemente del tipo grayanotoxina, lo cual le confiere neurotoxicidad a la especie (Cortes, 2009).

Además, se ha observado que *Pernettya prostrata* es una especie con una gran capacidad de hibridación sobre todo con la especie *Gaultheria*. Es similar en forma y color con las flores de *Vaccinium Floribundum*. Asimismo, es similar en forma y color con el fruto de *Disterigma empetrifolium* (Romoleroux et al., 2019).

Caracterización molecular

La variabilidad genética se refiere a las variaciones heredables que se producen en un individuo, en un grupo de individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Piñero et al., 2008). Las especies vegetales han estado bajo una gran interacción con el medio ambiente, lo que ha generado una gran diversidad de genotipos adaptados a diferentes condiciones ambientales (Becerra & Paredes, 2000). Los conocimientos sobre esta variabilidad genética nos permiten evaluar los riesgos de la pérdida de recursos genéticos por la disminución de especies (Piñero et al., 2008).

Por otro lado, los estudios genómicos tienen la finalidad de comprender la variación genética, la variación en las secuencias de ADN y comparar esta variación entre organismos. Además, nos ayuda a comprender sobre los complejos procesos que están asociados a la expresión génica, las interacciones genéticas, la base genética del fenotipo y la relación genotipo-fenotipo-ambiente (Escalante et al., 2014).

Una de las técnicas utilizadas para los estudios de diversidad genética en los años 50 fue la electroforesis. En la década de los 60 se desarrollaron técnicas moleculares para estudiar la variación genética. Al principio, se analizaron las diferencias de movilidad proteica y posteriormente se analizaron los cambios en el ADN. Sin embargo, se desconocía la influencia que tenía el ADN sobre el fenotipo, ya que se estudiaban fragmentos que no codificaban ningún carácter. En la actualidad, se han incorporado

nuevas técnicas de biología molecular con una mayor sensibilidad para investigaciones con un enfoque genómico (Becerra & Paredes, 2000; Jiménez & Collada, 2008).

Hoy en día, las herramientas más utilizadas en estudios de diversidad genética son los marcadores genéticos moleculares y la secuenciación de fragmentos cortos de ADN. Estas técnicas han permitido establecer diferencias entre especies, poblaciones e individuos desde el genotipo en lugar del fenotipo. Los marcadores moleculares han facilitado los estudios filogenéticos, estudios de poblaciones y estudios de genotipo de un gran número de individuos (López De Heredia, 2016).

Técnicas moleculares

Los marcadores genéticos moleculares se dividen en dos grandes grupos. El primero son los basados en análisis proteico y el segundo los que se basan en el análisis de ADN. En este último grupo se encuentran los marcadores que se obtienen por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los revelados por medio de la hibridación con sondas marcadas (Jiménez & Collada, 2008).

Marcadores de ADN

Los marcadores moleculares basados en ADN presentan varias ventajas para estudiar la variación genética. Estos marcadores nos permiten estudiar regiones específicas del ADN, detectar un gran número de polimorfismos y analizar si existen regiones del genotipo que se expresan o no. La selección de los marcadores moleculares se debe hacer según la información que se desea obtener y la técnica que se va a emplear (Jiménez & Collada, 2008).

Marcadores basados en PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, nos permite detectar polimorfismos en el genoma. Los polimorfismos se detectan por la variación de la secuencia que altera los sitios de reconocimiento del primer empleado. Además, nos permite generar un gran número de marcadores y utilizar cantidades mínimas de material genético. Los marcadores basados en esta técnica difieren entre

sí por la longitud y secuencia de los primers, las condiciones de la PCR y el método de separación y detección de los fragmentos obtenidos (R. Velasco, 2005). Entre algunos de estos marcadores se encuentran: el Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), las Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR), el DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD), el Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP), entre otros.

Los marcadores moleculares ISSR son una gran herramienta para obtener información sobre especies de las que aún no se conoce la secuencia de su genoma. Los ISSR se emplean para el mejoramiento genético de plantas, para la caracterización del germoplasma de especies vegetales, para evaluar la diversidad genética, para identificar marcadores de ADN, etc (Castañeda et al., 2021).

Barcoding

Los códigos de barras de ADN son una herramienta taxonómica que permite identificar y describir especies. Sin embargo, también es utilizado como un método para facilitar los registros básicos de biodiversidad. El barcoding utiliza una o más regiones de ADN estandarizadas para identificar taxones. Por lo tanto, esta tecnología permite realizar agrupamientos basados en el análisis de las secuencias de ADN para obtener grupos de especies y poder asignar individuos desconocidos a las mismas (Antil et al., 2023; Savolainen et al., 2005).

El Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) ha presentado varios grupos de genes que se utilizan para identificar el código de barras universal. En el caso de las plantas se trabaja con ITS, los genes de la maturase K (*matK*) y la ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (*rbcl*) (Antil et al., 2023).

rbcl* y *matK

Los genes *rbcl* y *matK* son marcadores estándar utilizados para obtener códigos de barras de ADN de plantas. Estas regiones específicas se encuentran ubicadas en el cloroplasto. El gen *matk* puede describir las especies que tienen una relación estrecha, pero tiene una baja tasa de amplificación. Por

otro lado, el gen *rbcL* tiene una mayor tasa de amplificación, pero su capacidad de descripción es menor con respecto a *matK* (Cahyaningsih et al., 2021).

Capítulo III: Materiales y métodos

Muestreo

El material vegetal utilizado en el presente estudio se recolectó en el Parque Nacional Cayambe-Coca en la vía Papallacta-Oyacachi que se encuentra en el Sector “Laguna de Loreto-Papallacta”. En la Tabla 1 se detallan las ubicaciones de cada muestra.

Tabla 1

Ubicación de las muestras tomadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca.

Muestra	Ubicación	Distancia entre individuos
PP1	-0°18'48.648"S-78°8'28.806"W	0 m
PP2	-0°18'50.838"S-78°8'27.288"W	60 m
PP3	-0°18'51.4"S-78°08'26.2"W	30 m
PP4	-0°18'52.182"S-78°8'24.948"W	32 m
PP5	-0°18'53.658"S-78°8'25.962"W	45 m
PP6	-0°18'55.5"S-78°8'27.1"W	41 m
PP7	-0°18'55.488"S-78°8'28.26"W	49 m
PP8	-0°18'55.818"S-78°8'29.784"W	48 m
PP9	-0°18'54.348"S-78°8'31.17"W	50 m
PP10	-0°18'55.644"S-78°8'32.952"W	59 m
PP11	-0°18'55.458"S-78°8'34.284"W	40 m
PP12	-0°18'56.088"S-78°8'35.574"W	44 m

PP13	-0°18'57.84"S-78°8'35.496"W	55 m
PP14	-0°18'58.434"S-78°8'33.996"W	50 m
PP15	-0°18'59.43"S-78°8'32.868"W	44 m
PP16	-0°19'0.594"S-78°8'31.86"W	45 m
PP17	-0°19'2.142"S-78°8'31.986"W	46 m
PP18	-0°19'3.366"S-78°8'32.94"W	44 m
PP19	-0°19'4.938"S-78°8'33.288"W	59 m
PP20	-0°19'6.792"S-78°8'33.198"W	45 m

El muestreo se realizó en el mes de noviembre del 2023, donde se colectaron un total de 20 muestras que corresponden a 20 individuos diferentes de *Pernettya prostrata*. En la recolección se procuró que exista una distancia mínima de 40 m entre cada individuo. En la Figura 3 se observa el mapa con las ubicaciones de las muestras colectadas.

Figura 3

Mapa de ubicación de las muestras recolectadas de *Pernettya prostrata* (Cav.) DC.



Nota. Ubicación geográfica de los puntos de recolección de la especie *Pernettya prostrata* (Cav.) DC en el Parque Nacional Cayambe Coca, Sector Papallacta-Oyacachi.

La muestra colectada consistió en tallos con hojas sanas que fueron colocados en sobres de papel y guardados en fundas ziploc con sílica gel. Se utilizó la aplicación Timestamp Camera Free para fotografiar las plantas muestreadas y obtener datos sobre la hora, fecha, latitud y coordenadas. Estos datos fueron utilizados para tener un registro fotográfico de cada individuo. En el laboratorio se procedió a cambiar los sobres utilizados en el campo por sobres de papel nuevos y se renovó la sílica gel de cada funda ziploc. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sede Matriz, ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui.

Extracción de ADN y cuantificación

La extracción de ADN se realizó con muestras secas utilizando diferentes protocolos. Se empleó el protocolo Doyle & Doyle (1991), el protocolo modificado de Doyle & Doyle (1991) para *Vaccinium floribundum* descrito por Mojica et al. (2018) y el protocolo modificado de Russell et al. (2010) descrito por Souza et al. (2012). Este último protocolo fue el que nos permitió obtener una alta concentración de ADN con un alto grado de pureza.

Protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle (1991)

Para la extracción de ADN se maceró el tejido vegetal con un mortero y nitrógeno líquido. Se colocó 15 mg de las muestras en tubos de microcentrifuga. En cada tubo se colocó 1.5 ml del buffer CTAB y se incubó a 60°C por 60 min. Posteriormente, se colocó un volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) 24:1 y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 6000 x g durante 10 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se añadió 2/3 de volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C por toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó a 6000 x g por 10 min y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de buffer de lavado y se dejó por 20 min. Se centrifugó nuevamente a 6000 x g y se dejó secar sobre una toalla de papel. Una vez seco se resuspendió el ADN en 50 µl de buffer TE con 20 mg/ml de RNasa y

se incubó a 31°C por 30 min. Cada muestra se diluyó con 2 veces el volumen de TE o agua destilada y se agregó acetato de amonio 7.5M hasta llegar a una concentración final de 2.5 M. Se agregó etanol frío y se centrifugó a 10 000 x g por 10 min. Finalmente, se dejó secar la muestra y se colocó 50 µl de buffer TE.

Protocolo de extracción de ADN modificado para *Vaccinium floribundum* descrito por Mojica et al. (2018)

El tejido foliar se trituro con nitrógeno líquido en un mortero. En tubos de microcentrífuga se colocó 100 mg de muestra. Se precalentó el buffer CTAB a 60°C y se colocó 1.5 ml en cada tubo. Se incubó las muestras a 60°C con una agitación de 130 rpm por 60 min y rotaciones ocasionales de 90°. Se extrajo una vez con un volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) 24:1 y se invirtió los tubos 20 veces. Se centrifugó a 6000 x g durante 10 min y posterior se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se añadió 2/3 de volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C por toda la noche.

Para precipitar el ADN se centrifugó las muestras a 6000 x g por 10 min y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de buffer de lavado dejándolo mínimo 20 min. Se centrifugó a 6000 x g y se dejó secar sobre una toalla de papel. Posteriormente, se resuspendió el ADN en 50 µl de buffer TE. Se agregó RNasa a 20 mg/ml y se incubó a 31°C por 30 min. Se diluyó la muestra con 2 veces el volumen de TE y se agregó acetato de amonio 7.5M hasta llegar a una concentración final de 2.5 M. se agregó 2.5 vol. de etanol frío y se mezcló. Se centrifugó a 10 000 x g por 10 min. Se dejó secar la muestra y se colocó 50 µl de buffer TE.

Protocolo de extracción de ADN de Souza et al. (2012)

El material vegetal se maceró en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Se tomó entre 60 y 100 mg de muestra que se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se almacenó a -20°C. Se precalentó los buffers sorbitol y CTAB a 60°C. Estos buffers se prepararon añadiendo 1% de 2-mercaptoetanol y 0.2% de 2-mercaptoetanol, respectivamente. En cada tubo con muestra se añadió 1

ml del buffer sorbitol y se centrifugó durante 10 min a 5800 rpm. Se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado tres veces. Una vez desechado el sobrenadante, se colocó 1 ml de buffer CTAB, se mezcló la muestra con el buffer y se incubó durante 1 h. Finalizada la lisis celular, se centrifugó a 5800 rpm durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió 700 μ L de Cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) 24:1 y se homogeneizó durante 5 min. Luego, se colocó en la centrifuga por 10 min a 13 000 rpm y cuidadosamente se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio (3M, pH 5.2) y 2/3 del volumen de isopropanol frío. Se mezcló suavemente y se dejó a -20°C durante toda la noche.

Posteriormente, se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 min y se descartó el sobrenadante, procurando no eliminar el pellet. El pellet obtenido se lavó dos veces con 500 μ L de Etanol al 70% y una vez con Etanol absoluto. Para el secado del pellet, se colocaron los tubos abiertos en una toalla de papel. Finalmente, se diluyó en 100 μ L de buffer TE con 2 μ L de RNasa por cada muestra y se dejó incubar a 37°C durante 2 h. Las muestras se almacenaron a -20°C .

Cuantificación de ADN

Para determinar la concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$ y evaluar la pureza mediante las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, se empleó el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan SkyHigh y el software SkanIt Software 6.1.1 RE for Microplate Readers RE, versión 6.1.1.7. La limpieza de los pocillos se realizó aplicando dos veces 2 μ L de HCL 5N y una vez 2 μ L de agua destilada, repitiendo este procedimiento al final. En cada pocillo destinado a la cuantificación, se añadió 2 μ L de la muestra, utilizando el buffer de dilución del pellet de ADN como blanco. La placa se cerró con cuidado, se colocó en el Multiskan SkyHigh y se cerró el equipo. Se eligió la opción de medir ácidos nucleicos y se etiquetaron los pocillos en el programa.

Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización de la presencia de ADN, se preparó un gel de agarosa al 1%. Se pesó 0.6 g de agarosa para un volumen de 60 ml de Buffer TE 1X y se agregó 0.035 μ L de Sybr Safe por cada ml de Buffer TE. En un matraz se colocó la agarosa y el buffer TE para calentarlo en el microondas en intervalos de 15 segundos hasta que el gel estuviera transparente, evitando que llegara a hervir. Luego, se transfirió a un hot plate y se agitó hasta que el gel se enfrió lo suficiente para poder manipularlo. Para el volumen de 60 ml se añadió 2.1 μ L de Sybr Safe y se homogeneizó. Una vez homogeneizado, se vertió en moldes previamente preparados y se esperó a que se solidificara. A continuación, se colocó el molde con el gel en la cámara de electroforesis y se cubrió con buffer TE.

Se mezcló 4 μ L de la muestra con 2 μ L de Blue Juice 2X. Las muestras se cargaron en el gel a partir desde el segundo pocillo, reservando el primer pocillo para 2 μ L de marcador de peso molecular. El gel se dejó correr a 100V durante 60 minutos con continua supervisión.

Para la visualización del producto PCR, se utilizó un gel con una concentración de agarosa del 1.8 al 2%. Se adicionaron 0.035 μ L de Sybr Safe por cada ml de Buffer TE. En la corrida electroforesis se siguieron los mismos pasos detallados anteriormente para la preparación y corrida del gel.

Validación de ADN

Para validar la presencia de ADN, se llevó a cabo una prueba de amplificación utilizando el marcador molecular ISSR 17898A, descrito en el trabajo de titulación de (Vargas, 2021), para el género *Polylepis* (familia *Rosaceae*). El proceso de validación se llevó a cabo en las 20 muestras seleccionadas, en el control positivo y en los dos controles negativos. El control positivo fue una muestra de *Pernettya prostrata* validada con anterioridad.

Condiciones de amplificación

La concentración de amplificación para cada componente se basó en la hoja técnica de la marca ThermoScientific correspondiente a la DreamTaq Green PCR Master Mix (2X), detalladas en la Tabla 2.

El volumen final de la reacción es de 50 μL .

Tabla 2

Concentraciones de reactivos.

Reactivos	Concentración recomendada
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	25 μL
Primer Forward	0.1-1.0 μM
Primer Reverse	0.1-1.0 μM
ADN	10 μg - 1 μg
Agua	hasta 50 μL
Total	50 μL

Nota. Concentración recomendada para la DreamTaq Green PCR Master Mix (2X).

La concentración y el volumen final de amplificación para el primer 17898A se modificó a partir de las concentraciones recomendadas en la Tabla 2 para un volumen final de 10 μL . En la Tabla 3 se detallan las concentraciones utilizadas en el ensayo

Tabla 3

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

Reactivos	Concentración Stock	Concentración final	Volumen final
DreamTaq Master Mix	2X	0.2X	5 μL
Agua	hasta 10 μL	2 μL	2 μL
Primer ISSR (17898A)	10 μM	1 μM	1 μL

ADN	20 ng/ μ L	4 ng/ μ L	2 μ L
Volumen total (μL)			10 μ L

Nota. Concentraciones finales para preparación de Master Mix.

Las condiciones de tiempo y temperatura para la amplificación se detallan en la Tabla 4. Los parámetros referenciales se obtuvieron de la investigación de Vargas (2021).

Tabla 4

Condiciones de amplificación para el marcador molecular ISSR 17898A.

Fase	Temperatura ($^{\circ}$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

Nota. La temperatura de alineamiento fue optimizada por (Vargas, 2021)

Diseño de marcadores moleculares para Barcoding

El diseño de cebadores (forward y reverse) para los marcadores moleculares *rbcl* y *matK* para *Pernettya prostrata* se realizó a partir de las secuencias encontradas en el repositorio National Institutes of Health (NIH) de la base de datos GenBank: OP711752.1 y OQ290570.1, para el gen *rbcl* y *matK*. Se utilizó la plataforma Benchling para el alineamiento de secuencias, diseño de primers y amplificación in silico.

En el diseño de primers se verificó los siguientes criterios: longitud entre 18 a 24 nucleótidos, porcentaje de guanina y citosina entre 40-60%, temperatura de melting entre 50-60 $^{\circ}$ C y Hairpin (Energía libre de Gibbs Δ G) con Δ G cercano a 0 kcal/mol. Se trató de evitar homologías significativas con secuencias genómicas no deseadas.

El análisis de cebadores se realizó utilizando la herramienta OligoAnalyzer. En la Tabla 5 se detallan los criterios obtenidos de los cebadores seleccionados con las herramientas Benchling y OligoAnalyzer. La PCR in silico se realizó con Benchling y se obtuvo el tamaño de amplicón esperado.

Tabla 5

*Cebadores forward y reverse diseñados para los marcadores *rbcl* y *matK* de *Pernettya prostrata*.*

Marcador	Cebador	Longitud	%GC	Tm	Hairpin	Secuencia	Amplicón
<i>rbcl</i>	Foward	20	40	50.6	-0.14	ACAGAGACTAAAGCAAGTGT	440
	Reverse	22	40.9	53.0	-0.49	GGTCCTTGAAAGTTTTAGCAT	
<i>matK</i>	Foward	23	52.2	59.7	-1.45	TGGGCTCAACCAAGAAGGATCCA	253
	Reverse	22	62.0	62.0	-1.52	AACCGCTCCAGACCGGCTTACT	

Nota. Cebadores forward y reverse diseñados en la plataforma Benchling. GC%: contenido de guanina y citosina, Tm: temperatura de melting.

Condiciones de amplificación

La concentración y volumen final para los marcadores *rbcl* y *matK* se obtuvo a partir de la hoja técnica de la DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de la marca ThermoScientific. Se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de primers. Las concentraciones probadas fueron 0.75, 0.5, 0.25, 0.20, 0.15 y 0.10 μM . En la Tabla 6 se detalla la concentración estandarizada de los reactivos utilizados para la amplificación de estos genes.

Tabla 6

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

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen final
DreamTaq Master Mix	2X	0.2X	5 μL
Agua	Hasta 10 μL	Hasta 10 μL	2.8 μL
Forward	10 μM	0.1 μM	0.1 μL

Reverse	10 µM	0.1 µM	0.1 µL
ADN	20 ng/ µL	4 ng/ µL	2 µL
Volumen Total			10 µL

Nota. Concentraciones finales para preparación de Master Mix

Las condiciones de tiempo y temperatura para *rbcl* y *matK* se detallan en la Tabla 7. Este protocolo se obtuvo a partir del estándar para PCR.

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

Nota: *La temperatura de alineamiento cambia con cada marcador.

La temperatura de alineamiento se calculó a partir de las temperaturas de melting de cada cebador y de la temperatura del amplicón (Tabla 8) utilizando la siguiente fórmula:

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

Tabla 8

Temperaturas de alineamiento para los marcadores rbcl y matK.

Marcador	Cebador	T_m (°C)	T_m producto PCR (°C)	T_a optima (°C)
<i>rbcl</i>	Forward	50.6	76.7	54
	Reverse	53.0		

<i>matK</i>	Forward	59.7	73.7	55
	Reverse	62.0		

Nota. Cálculo de la temperatura de alineamiento a partir de las temperaturas de melting para cada marcador. Tm: temperatura de melting, Ta: temperatura de anillamiento.

Capítulo IV: Resultados

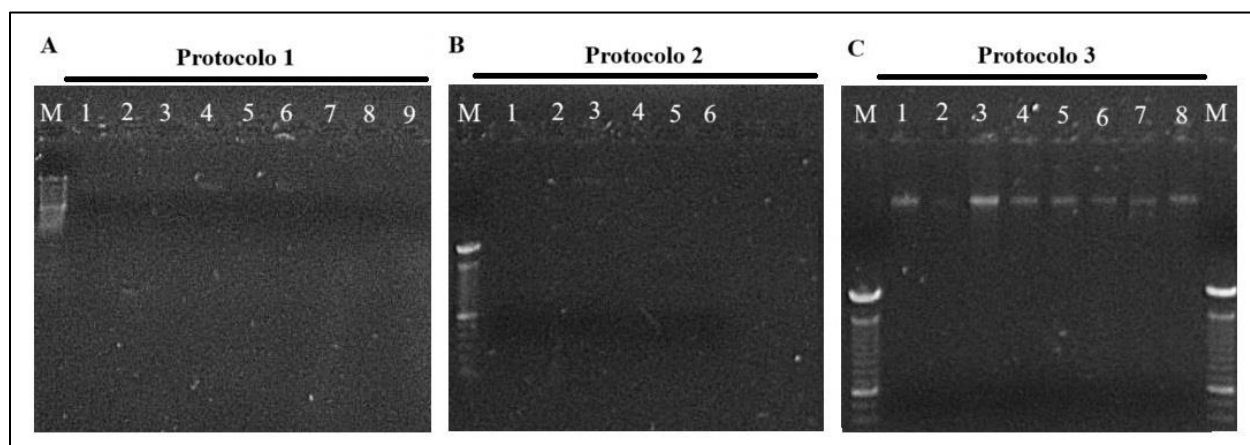
Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN de *Pernettya prostrata* se realizó evaluando 3 diferentes protocolos. El primer protocolo es el descrito por Doyle & Doyle (1991), el cual es un protocolo estándar de extracción de ADN en el que se utiliza CTAB al 2%. El segundo es un protocolo modificado de Doyle & Doyle (1991) descrito por Mojica et al. (2018) para *Vaccinium floribundum*, especie cercana a *Pernettya prostrata*, en el que se utiliza CTAB 4%. El tercer protocolo es el descrito por Souza et al. (2012) para plantas con un alto contenido de metabolitos secundarios en el que se usa los Buffer CTAB 3% y Sorbitol.

Los resultados de la extracción de ADN con los 3 protocolos evaluados se visualizaron mediante un gel de electroforesis al 1%, como se observa en la Figura 4.

Figura 4

Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído de Pernettya prostrata.



Nota. A) Protocolo 1 corresponde al descrito por Doyle & Doyle, (1991), B) Protocolo 2 descrito por Mojica et al. (2018) y C) Protocolo 3 descrito por Souza et al. (2012). Se utilizó un marcador molecular de 100 bp

En las Figuras 4A y 4B se puede observar que no existe presencia de bandas de ADN, mientras que en la Figura 4C se observan bandas de alto peso molecular, lo que sugiere que el mejor protocolo en la extracción para *Pernettya prostrata* es el protocolo 3. A continuación se presenta la Tabla 9 con los resultados de la cuantificación de ADN con este protocolo.

Tabla 9

Cuantificación de ADN de Pernettya prostrata con el protocolo de Souza et al. (2012).

Muestra	Pureza (A260/A280)	Concentración ADN (ug/ml)
Blanco1	NaN	0
PP1	1.860	779.00
PP2	1.817	237.1
PP3	1.867	535.9
PP4	1.891	574.8
PP5	1.895	688.1
PP6	1.909	595.2
PP7	1.764	201
PP8	1.922	1208
PP9	1.924	842
PP10	1.842	126
PP11	1.851	379.4
PP12	1.887	469.9

PP13	1.914	655
PP14	1.894	511.1
PP15	1.875	418
PP16	1.861	474.3
PP17	1.876	499.2
PP18	1.862	452.9
PP19	1.814	328.1
PP20	1.715	232.3

Nota. Concentraciones y pureza (A260/280) obtenidas de la extracción 20 muestras analizadas. PP:

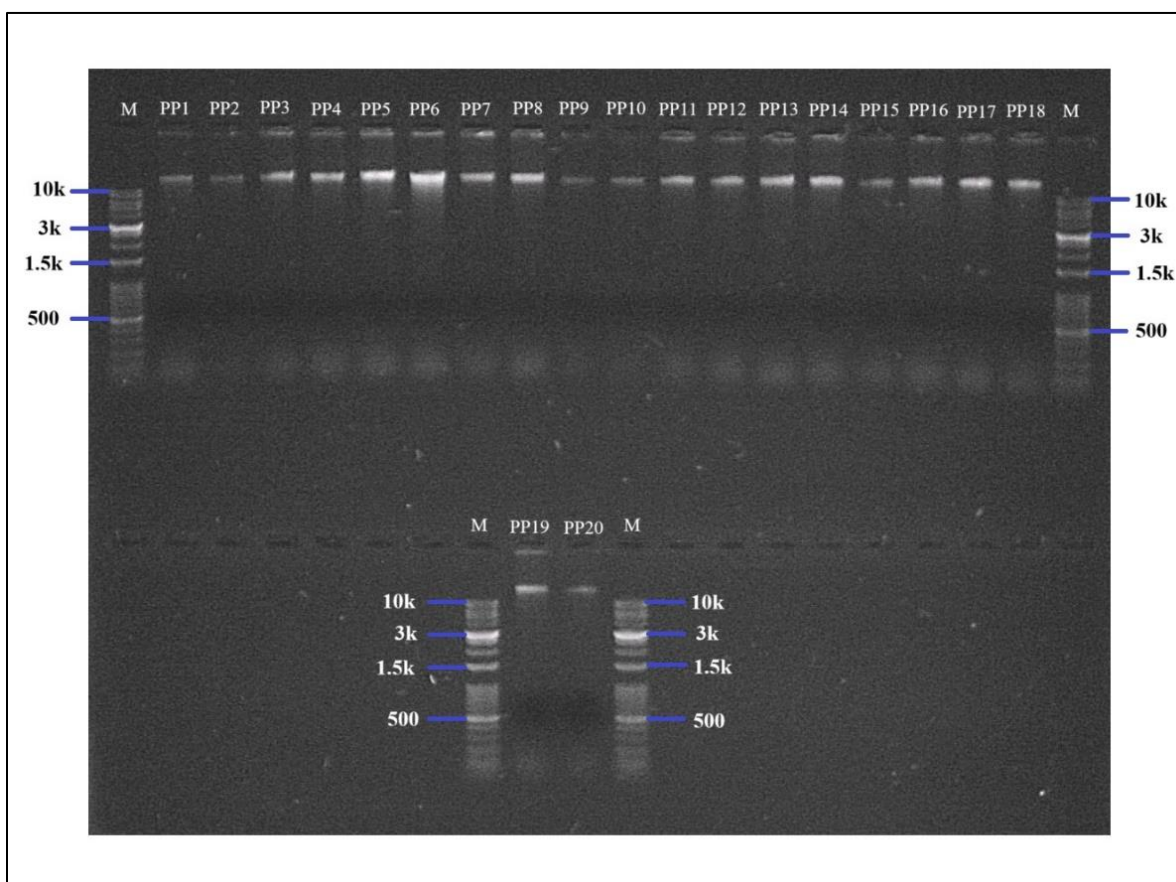
Pernettya prostrata.

Los resultados de la concentración de ADN permiten determinar que los datos obtenidos en el protocolo 3 son superiores a los protocolos 1 y 2 (ANEXO 1), los cuales se encuentran en un rango de 383.3 y 598.75. Los datos de pureza en la cuantificación se encuentran en un rango 1.7 y 1.9, lo que confirma que el protocolo 3 cumple con este parámetro, ya que en bibliografía la pureza (A260/280) de ADN óptima se encuentra en un rango de 1.8 y 2. Estos resultados sugieren que el protocolo 3 descrito por (Souza et al., 2012) es el mejor protocolo para extracción de ADN de *Pernettya prostrata*.

Por lo tanto, se utilizó el protocolo descrito por Souza et al. (2012) para la extracción de ADN de 20 muestras de *Pernettya prostrata* como se muestra en la Figura 5.

Figura 5

Extracción de ADN de 20 muestras de Pernettya prostrata.



Nota. Marcador molecular Opti-DNA de 1kb de la marca abm. PP: *Pernettya prostrata*, M: marcador de peso molecular.

En esta figura se puede observar bandas visibles de ADN en todas las muestras analizadas de *Pernettya prostrata*, lo que nos permitió continuar con las pruebas moleculares.

Análisis estadístico

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos en la extracción de ADN, se realizó un análisis estadístico para comparar los 3 protocolos empleados. En este análisis se comprobó la eficacia de cada protocolo con respecto a la pureza y concentración de ADN. Los valores utilizados para este análisis se detallan en el ANEXO 1.

Para estimar la media de variabilidad que existe entre los datos obtenidos, se llevó a cabo un análisis de intervalos de confianza. En este análisis se obtuvo el error estándar y los límites inferior y superior de cada variable estudiada. Los resultados se encuentran detallados en la Tabla 10.

Tabla 10

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

Protocolo	Variable	Parámetro	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
	Pureza	Media	0.11	9	1.79	2.28
Protocolo 1	Concentración ADN	Media	7.75	9	10.79	46.54
	Pureza	Media	0.12	6	1.12	1.74
Protocolo 2	Concentración ADN	Media	28.62	6	30.57	177.70
	Pureza	Media	0.01	30	1.82	1.86
Protocolo 3	Concentración ADN	Media	31.18	30	423.01	550.54

Nota. El LI y LS de la pureza se debe encontrar en un rango de 1.8 y 2. E.E.: Error Estándar, n: número de muestras analizadas, LI: límite inferior, LS: límite superior.

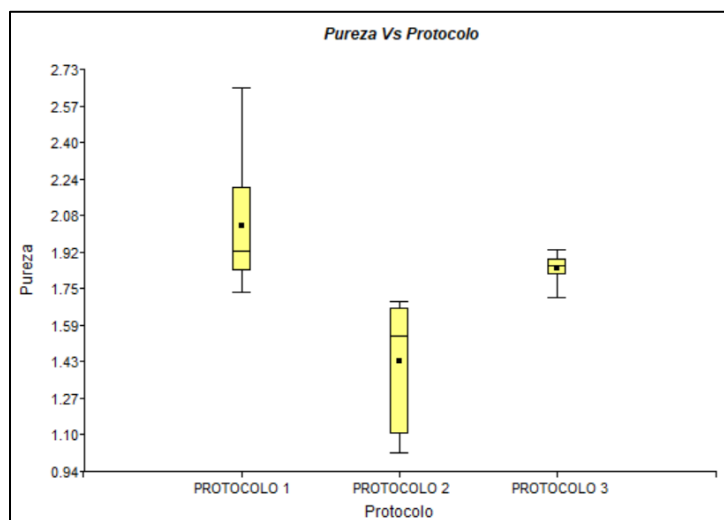
Con los datos obtenidos en los intervalos de confianza, se observa que el protocolo 3 presenta valores de 1.82 y 1.86 en el límite inferior y superior, respectivamente en relación a la variable pureza. Estos datos se encuentran dentro del rango óptimo de pureza que va de 1.8 a 2. Por otra parte, al analizar el rango de concentración de ADN de 423.01 a 550.54 en el protocolo 3, se puede observar que estos datos son mayores en relación a los obtenidos en los protocolos 1 y 2, lo que sugiere que este protocolo permite obtener una mayor concentración de ADN.

A partir del error estándar obtenido en este análisis estadístico (Tabla 10), se pudo evaluar la precisión en la estimación de la media poblacional. Se observó una mayor precisión en la pureza del protocolo 3 en relación a los demás protocolos, ya que el valor de error estándar es menor. Se observó, además, que la precisión de la concentración de ADN es menor con respecto a los otros protocolos,

debido a que el error estándar es mayor. Para conocer la distribución de los datos analizados dentro de las variables, se realizó un gráfico de cajas y bigotes (Box-Plot). En este tipo de gráfico, la caja representa el rango intercuartil (IQR), que abarca al 50% de los datos. El borde inferior de la caja corresponde al primer cuartil (Q1), mientras que el borde superior el tercer cuartil (Q3). La distancia entre el Q1 y Q3 nos permite determinar la variabilidad de los datos. La línea dentro de la caja representa la mediana, que divide el conjunto de datos en dos partes iguales. Los extremos de la caja son conocidas como bigotes y representan la dispersión de los datos que se encuentran fuera del rango intercuartil. En las Figura 6 se observan las diferencias entre los 3 protocolos probados con respecto a la pureza.

Figura 6

Comparación de pureza de ADN entre protocolos de extracción.



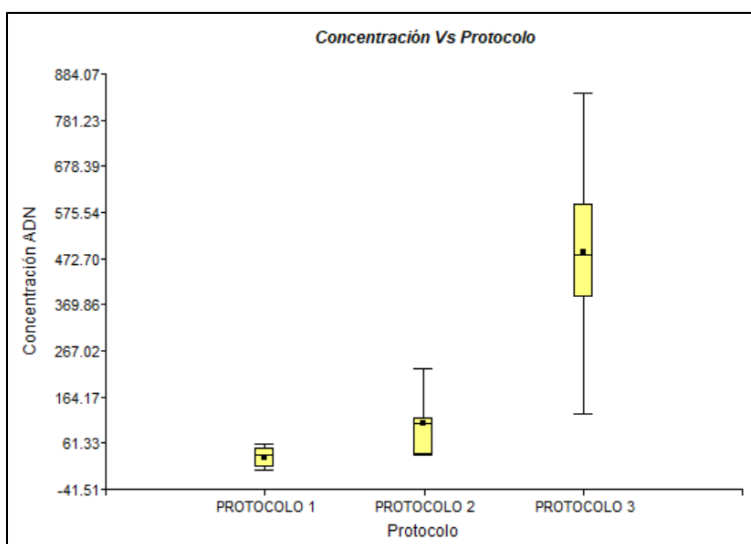
Nota. Las cajas representan el rango intercuartil y los bigotes la dispersión de los datos fuera de los cuartiles

En esta figura se observa que el protocolo 3 presenta una distribución de datos más agrupada alrededor de la mediana, como se evidencia en la caja obtenida. Además, los bigotes nos indican que existe una mayor consistencia en los resultados y la mayoría de los datos se encuentran dentro del

rango de pureza deseado (1.8 - 2). Por otro lado, en el protocolo 2 también se evidencia una consistencia en los resultados, pero estos valores no se encuentran dentro de los parámetros esperados y la caja obtenida nos indica que existe una dispersión mayor en los datos. Por último, en el gráfico se observa que en el protocolo 1 existe una mayor variabilidad y dispersión en los datos, los cuales se encuentran fuera del rango óptimo. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos en el Blox-Plot para el parámetro de concentración de ADN.

Figura 7

Comparación de concentración de ADN entre protocolos de extracción.



Nota. Las cajas representan el rango intercuartil y los bigotes la dispersión de los datos fuera de los cuartiles

Según los resultados obtenidos en la Figura 7 el protocolo 3 presenta una mayor variabilidad en los datos y una distribución menos agrupada alrededor de la mediana. En los protocolos 1 y 2 se observa una distribución más agrupada y una dispersión menor en los datos. No obstante, los valores obtenidos en la concentración son mayores en el protocolo 3 que en los protocolos 1 y 2.

A continuación, con el objetivo de verificar que se cumple con los supuestos de normalidad, se realizó una prueba de Shapiro-Wilks. El nivel de significancia se analiza a partir del p-valor obtenido de la

prueba Shapiro-Wilks. Si los valores son mayores a 0.05 se concluye que el conjunto de datos analizados proviene de una distribución normal. Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11

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

Protocolo	Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Protocolo 1	Pureza	9	2.03	0.32	0.84	0.09
	Concentración ADN	9	28.67	23.25	0.82	0.06
Protocolo 2	Pureza	6	1.43	0.29	0.81	0.09
	Concentración ADN	6	104.14	70.1	0.88	0.31
Protocolo 3	Pureza	30	1.84	0.06	0.93	0.15
	Concentración ADN	30	486.78	170.76	0.97	0.80

Nota. D.E.: Diferencia Estándar, n: Número de muestras analizadas, W*: Estadístico de prueba calculado, p (Unilateral D): p-valor.

Los valores obtenidos en el p-valor de la prueba Shapiro-wilks son mayores al nivel de significancia (0.05), lo que indica que existe normalidad en los datos obtenidos del diseño experimental. Para analizar si existe una interacción significativa entre la pureza, la concentración y los protocolos se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). El valor F en esta prueba nos indica si existe diferencias significativas entre las medias de los grupos de estudio. Un valor F grande y un p-valor pequeño sugieren que al menos uno de los grupos analizados difiere significativamente de los demás. En la Tabla 12 se muestra el ANOVA para la variable pureza.

Tabla 12

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			

Nota. F.V.: Factor de variación, SC: Suma de cuadrados, gl: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F: Estadístico F.

Al analizar el ANAVA basado en la pureza, se encontró un valor $F=21.47$ y $p\text{-valor}<0.0001$, lo que significa que existe una interacción significativa entre la pureza y los protocolos. En la Tabla 13 se muestra el ANAVA para la concentración.

Tabla 13

ANAVA (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			

Nota. F.V.: Factor de variación, SC: Suma de cuadrados, gl: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F: Estadístico F.

Con los datos obtenidos en la Tabla 13 para la concentración de ADN, se encontró que existe una diferencia significativa entre las medias de la concentración de los 3 protocolos evaluados ($F=44.46$, $p\text{-valor}<0.0001$). Con el fin de conocer que protocolos difieren entre sí con respecto a las variables analizadas, se realizó una prueba de Duncan. Esta prueba nos indicará cuales son los protocolos con medias significativamente diferentes entre sí. En la Tabla 14 se encuentran detallados los resultados obtenidos para la pureza de ADN.

Tabla 14

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

Protocolo	Medias	n	E.E.	
Protocolo 2	1.43	6	0.07	A
Protocolo 3	1.84	30	0.03	B
Protocolo 1	2.03	9	0.06	C

Nota. Las medias con una letra en común indica que no son significativamente diferentes entre sí. E.:

Error Estándar, n: número de muestras analizadas.

En los datos obtenidos en la prueba Duncan para la pureza de ADN, se observa que el protocolo 1 tiene la media más alta (2.03), lo que sugiere que con este protocolo se obtiene una mayor pureza en comparación con los otros. Sin embargo, el error estándar de 0.06 nos indica que existe cierta variabilidad en los datos. Por otro lado, el protocolo 2 presenta una media más baja con un valor de 1.43 y un error estándar alto de 0.07, lo que sugiere una pureza menor y variabilidad en los datos. Por último, el protocolo 3 tienen una media con un valor intermedio de 1.84 entre los protocolos 1 y 2. Además, el error estándar en este protocolo es el más bajo con un valor de 0.3, lo que sugiere una variabilidad menor en los datos y, por lo tanto, una mayor precisión en la estimación de la media. En la tabla 15 se detallan los resultados obtenidos para la concentración de ADN.

Tabla 15

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

Protocolo	Medias	n	E.E.	
Protocolo 1	28.76	9	48.10	A
Protocolo 2	104.14	6	58.91	A

Protocolo 3	486.78	30	26.35	B
--------------------	--------	----	-------	---

Nota. Las medias con una letra en común indica que no son significativamente diferentes entre sí. E.E.:

Error Estándar, n: número de muestras analizadas.

La Prueba de Duncan (Tabla 17) muestra que el protocolo 3 presenta la media más alta con un valor de 486.78, en comparación con los protocolos 1 (28.76) y 2 (104.14). El protocolo 3, además, presenta un error estándar de 26.35, lo que indica que hay una menor variabilidad en los datos en comparación con los protocolos 1 (48.10) y 2 (58.91).

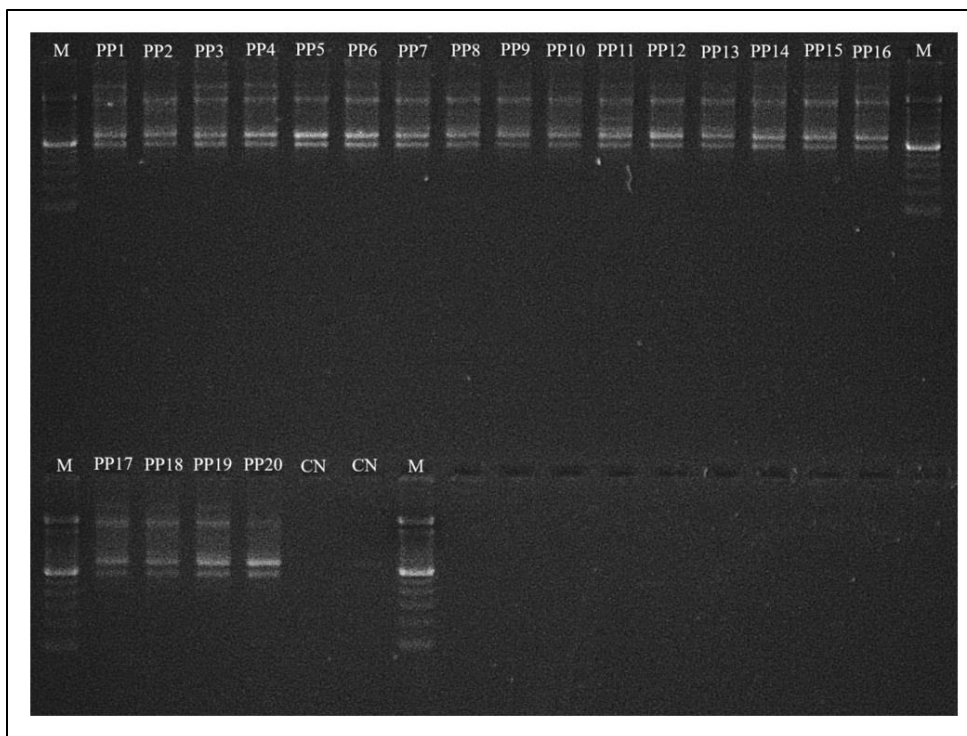
Los análisis realizados indican que el protocolo 3 descrito por Souza et al., (2012) es el más adecuado para la extracción de ADN de *Pernettya prostrata* con respecto a la pureza y concentración de ADN.

Validación de ADN

Con la finalidad de comprobar si el ADN extraído es óptimo para realizar las amplificaciones en los genes *rbcl* y *matK*, se realizó una validación de ADN mediante una prueba de PCR utilizando el marcador molecular ISSR 17898A, disponible en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal. En la Figura 8 se observa los resultados de la prueba PCR con el ISSR 17898A, en un gel de agarosa al 2%, con las 20 muestras de ADN extraídas.

Figura 8

Amplificación de ADN con el marcador ISSR 17898A.



Nota. Marcador de peso molecular de ADN de 100 bp de la marca Invitrogen. PP: *Pernettya prostrata*, CN: control negativo, M: marcador molecular

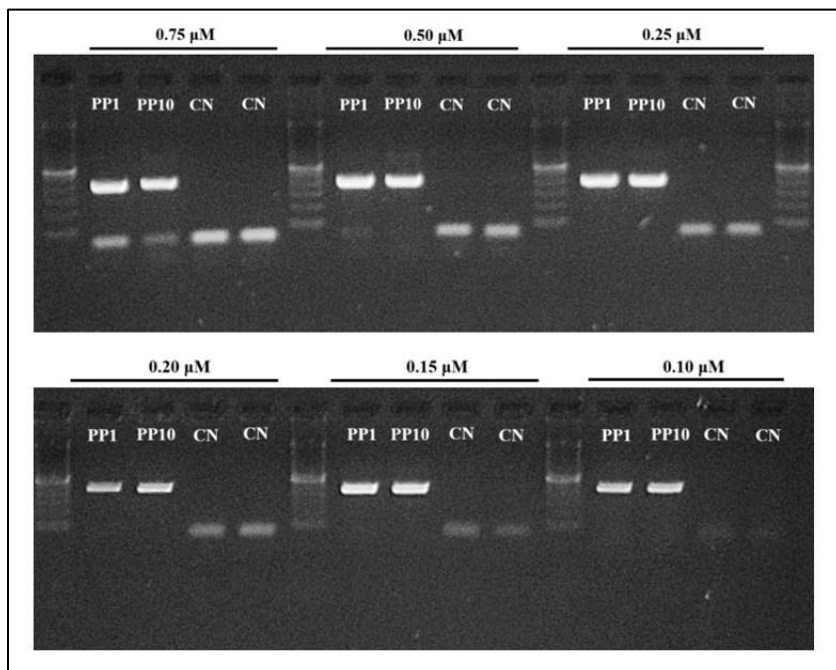
Al observar los resultados en el gel, se evidenció que existe amplificación de ADN en todas las muestras. Esto confirma que el ADN extraído de *Pernettya prostrata* amplifica y puede ser utilizado para realizar ensayos de PCR con los primers diseñados para *rbcl* y *matK*

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares estándar utilizados en este estudio fueron los genes *rbcl* y *matK*, los cuales son utilizados para obtener códigos de barras de ADN en plantas. La amplificación de estos genes se realizó en base a las concentraciones recomendadas por la hoja técnica de la DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) de la marca ThermoScientific. La estandarización de la concentración de los primers del gen *rbcl* se realizó probando diferentes concentraciones (0.75, 0.5, 0.25, 0.20, 0.15 y 0.10 μM), lo que se muestra en la Figura 9.

Figura 9

Amplificación del gen *rbcl* para estandarizar la concentración.



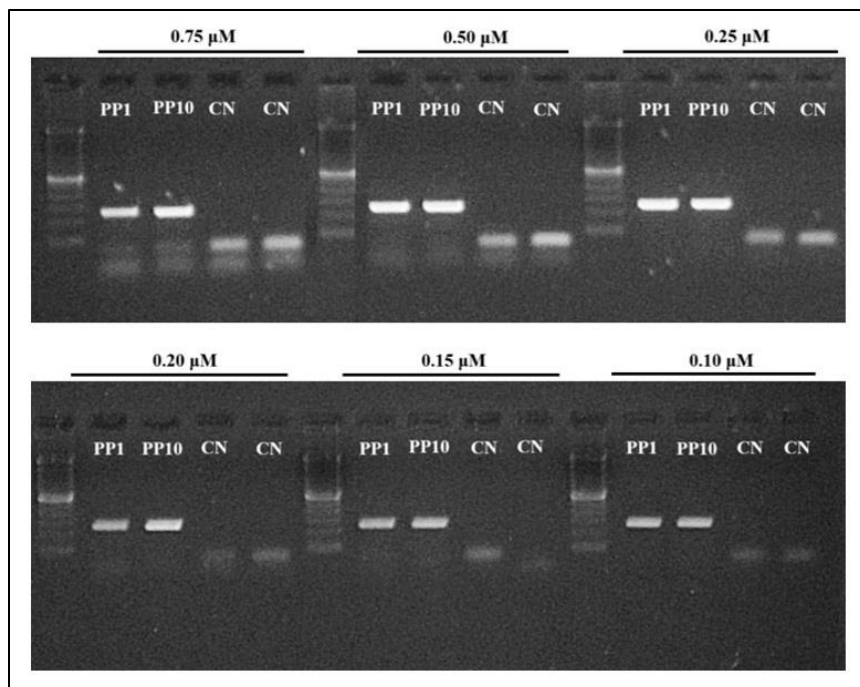
Nota Marcador de peso molecular de ADN de 100 bp de la marca Invitrogen. PP: *Pernettya prostrata*,

CN: Control negativo, M: marcador molecular

En el gráfico podemos observar que en la concentración de 0.1 μM existe una disminución de la presencia de dímeros en los controles negativos, lo que sugiere que esta concentración permite obtener mejores resultados. Los ensayos de estandarización realizados para los primers del gen *matK* se muestran en la Figura 10.

Figura 10

Amplificación del gen matK para estandarizar la concentración.



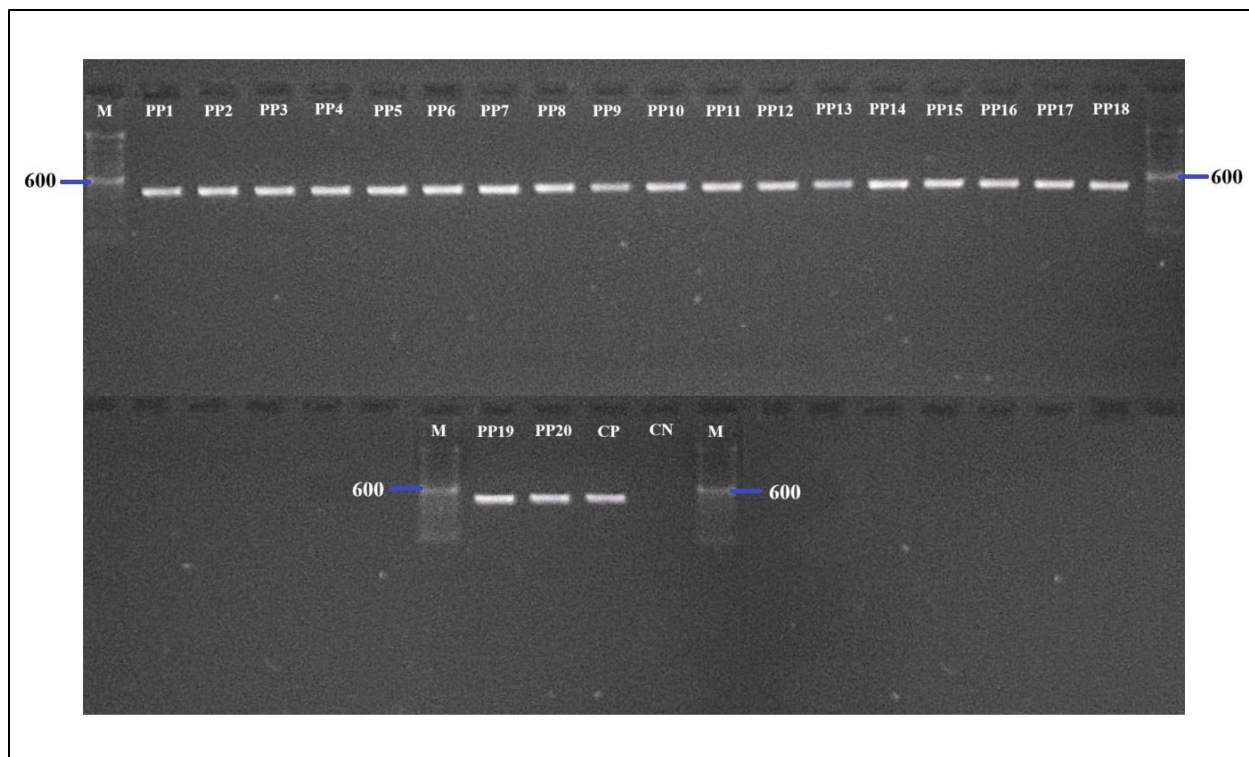
Nota. Marcador de peso molecular de ADN de 100 bp de la marca Invitrogen. PP: gel de electroforesis al 2% *Pernettya prostrata*, CN: Control negativo, M: marcador molecular

En esta figura se puede observar que la concentración mínima recomendada de 0.1 μM para los primers, redujo la presencia de dímeros en los controles negativos. Por lo tanto, esta concentración fue seleccionada como óptima para los análisis con el gen *rbcL* y gen *matK*. Finalmente, se realizó la amplificación de los genes *rbcL* y *matK* para las 20 muestras de interés con las condiciones de amplificación seleccionadas.

El tamaño de la banda esperada para los productos de PCR según la PCR *in silico* del gen *rbcL* es aproximadamente 440 pb y para el gen *matK* es 253 pb. En las Figura 11 se observan los resultados obtenidos para el gen *rbcL*

Figura 11

Amplificación gen rbcL para Pernettya prostrata con primers diseñados.

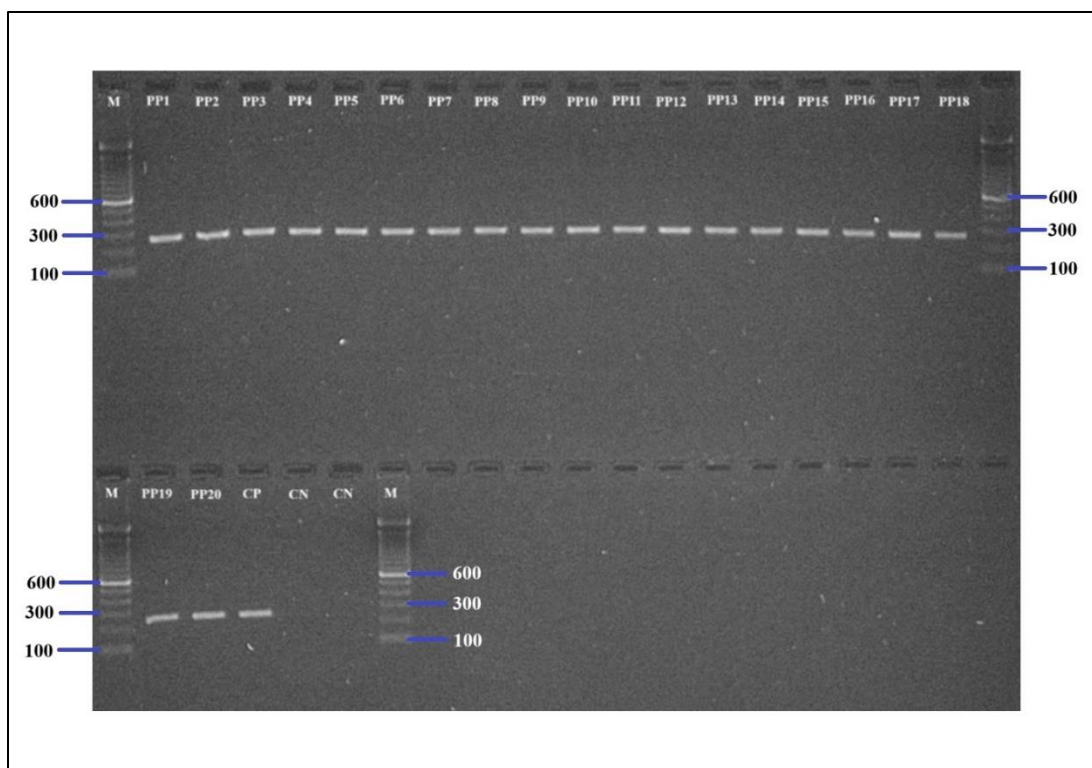


Nota. Marcador de peso molecular de ADN de 100 bp de la marca Invitrogen. PP: *Pernettya prostrata*, CP: Control positivo, CN: Control negativo, M: marcador molecular

En el gel de electroforesis se puede observar que el producto PCR de las 20 muestras, con respecto al marcador de peso molecular, se encuentra aproximadamente entre los 400 y 600 pb, por lo que correspondería al tamaño del amplicón esperado para *rbcl* de 440 pb. Los resultados obtenidos en la amplificación del gen *matK* se muestran en la Figura 12.

Figura 12

Amplificación gen matK para Pernettya prostrata con primers diseñados.



Nota. Marcador de peso molecular de ADN de 100 pb de la marca Invitrogen. PP: *Pernettya prostrata*, CP: Control positivo, CN: Control negativo, M: marcador molecular

En el gel se observa que las bandas amplificadas para el gen *matK* se encuentran entre los 300 y 200 pb del marcador de peso molecular, por lo que el tamaño del amplicón para este gen corresponde al esperado de 253 pb.

Los resultados obtenidos en la amplificación de los genes *rbcl* y *matK* para las muestras de ADN extraídas confirman que son efectivos para la identificación de *Pernettya prostrata*. Estos resultados son importantes para la caracterización molecular e identificación de esta especie en futuros proyectos de investigación.

Capítulo V: Discusión

Los bosques andinos son ecosistemas con una alta riqueza biológica y con un alto grado de endemismo. Estos bosques son de gran importancia para el bienestar y seguridad del ser humano al proveer servicios ecosistémicos esenciales (Cuesta et al., 2009). Los bosques y páramos andinos

cumplen un rol fundamental en el medio ambiente al ser sumideros de carbono, producir oxígeno y ser el hábitat de especies de gran importancia (Lozano, 2015).

Estos bosques se encuentran bajo un alto riesgo de degradación como consecuencia del cambio climático y el crecimiento poblacional. Además, se ha evidenciado un cambio en la composición de especies vegetales de algunos bosques y pastizales como resultado del calentamiento global (Malizia et al., 2020). Debido a la falta de estudios sobre los bosques y paramos andinos, no se tiene conocimiento sobre la frágil diversidad de su flora, lo que impide que estos recursos sean debidamente manejados y aprovechados (Lozano, 2015).

Los estudios sobre diversidad genética en plantas se han enfocado a investigaciones arqueológicas, lingüísticas, botánicas y morfológicas (Becerra & Paredes, 2000). Sin embargo, los estudios moleculares son de gran importancia para conocer y evaluar esta diversidad. Además, estos recursos genéticos son necesarios en los programas de conservación (Carrodegua & Zúñiga, 2021). En especies andinas como *Pernettya prostrata* no se han realizado suficientes investigaciones y la mayoría de los estudios realizados están enfocados al nivel fitoquímico, etnobotánico y morfológico (Rincón et al., 2014).

En biodiversidad, los estudios moleculares tienen la finalidad de identificar y diferenciar individuos de una misma familia para su clasificación taxonómica. En la identificación de una especie el primer paso es la extracción de ADN, cuyo objetivo principal es obtener una gran cantidad y calidad de ADN que permita su manipulación, amplificación y análisis (Salavarieta, 2002; V. Sánchez, 2020).

Uno de los problemas más comunes en la extracción de ADN es la contaminación con proteínas, endonucleasas, polisacáridos y metabolitos secundarios. Por tal motivo, se han planteado numerosos métodos para la extracción de ADN y muchos de ellos basados en el uso de bromuro de cetriltrimetilamonio (CTAB). No obstante, los métodos de extracción difieren entre especies, debido a la

gran variabilidad y particularidades que existe en las plantas. Lo que puede generar desafíos durante el aislamiento de ADN (Kim et al., 1997; E. Sánchez et al., 2021).

Una de las principales variables a considerar en el aislamiento de ADN es la pureza. Por lo que es importante realizar una cuantificación de ADN utilizando un espectrofotómetro en el que se obtenga las relaciones A260/280 y A260/230. La relación A260/280 nos indica si existe contaminación con proteínas, por lo que el rango de 1.8 y 2 nos indica una buena calidad de ADN. En cambio, la relación de pureza A260/230 debe encontrarse entre 2 y 2.2, ya que valores inferiores a este rango nos indica que existe contaminación con polisacáridos y metabolitos secundarios (Guzmán et al., 2018).

En el presente estudio se probaron 3 diferentes protocolos para el aislamiento de ADN de *Pernettya prostrata*, protocolo 1 descrito por Doyle & Doyle (1991), protocolo 2 descrito por Mojica et al. (2018) y protocolo 3 descrito por Souza et al. (2012). Los resultados en los protocolos 1 y 2 presentaron una baja concentración y pureza de ADN. La mayoría de las muestras presentaron una relación A260/280 entre 1.02 y 2.64 y una relación A260/230 entre 0.01394 y 0.8317. Estos resultados indican que existe contaminación con proteínas y metabolitos secundarios. Rincón y sus colaboradores (2014) en las investigaciones realizadas en *Pernettya prostrata* mencionan que esta especie presenta en sus partes aéreas gran cantidad de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, esteroides y triterpenos, los cuales podrían ser la causa de la baja concentración y pureza del ADN extraído con estos protocolos.

En cambio, el protocolo 3 descrito por Souza et al. (2012) permitió obtener mejores resultados. La concentración de ADN se encontraba en un rango entre 126 y 842 ng/ μ L y una pureza (A260/280) entre 1.72 y 1.92. Según Souza et al. (2012) este protocolo es el ideal para muestras foliares con un alto contenido de metabolitos.

En base a estos resultados se realizó un análisis estadístico para comparar la eficacia y eficiencia entre los 3 protocolos. En este análisis se evidenció que existen diferencias significativas entre los

protocolos y las variables analizadas. En función a la concentración y pureza obtenidas, el protocolo descrito por Souza et al. (2012) fue significativamente diferente a los protocolos descritos por Doyle & Doyle (1991) y Mojica et al. (2018), siendo este protocolo el que mejores resultados de concentración y pureza presentó en la extracción de ADN de *Pernettya prostrata*.

Sin embargo, los valores obtenidos en la pureza (A260/230) con el protocolo 3 presentaron un valor promedio de 1.6. De acuerdo a Guzmán et al. (2018) los valores bajo el rango entre 2 y 2.2 nos indica que existe presencia de polisacáridos, los cuales pueden generar una inhibición de la PCR. Por lo tanto, se realizó una validación del ADN con marcadores moleculares tipo ISSRs para conocer si no existía inhibición por polisacáridos en la amplificación del ADN extraído. En los resultados obtenidos se evidenció que el ADN extraído amplificó bandas integrales, por lo que se pudo obviar esta relación de pureza en el análisis estadístico.

Las técnicas moleculares nos permiten identificar y estudiar especies a partir de su ADN. En la última década se ha demostrado que los estudios que utilizan estas técnicas son eficientes para resolver problemas ecológicos (Altamirano & Yáñez, 2016; Rey & Capdevielle, 2020). En el área de conservación el uso de códigos de barra de ADN o Barcoding como técnica molecular ha sido muy utilizada en los últimos tiempos (Dávila et al., 2019). El barcoding puede diferenciar especies con plasticidad fenotípica o que son morfológicamente similares, el cual se basa en el uso de una región corta de ADN, como genes y regiones no codificantes, que contienen información única (Aguilar, 2022).

En plantas, los marcadores moleculares más utilizados para generar códigos de barras de ADN en estudios de identificación de especies son los genes *rbcL* y *matK* (Li et al., 2011). Por tal motivo, el objetivo de este estudio se enfocó en la caracterización molecular a partir de primers diseñados para los genes *rbcL* y *matK* de *Pernettya prostrata* para su identificación. El tamaño de los amplicones obtenidos mediante la PCR *in silico* para *rbcL* y *matK* fueron de 440 y 253 pb, respectivamente. En la amplificación *in vivo* se encontró que el amplicón de *rbcL* con respecto al marcador de peso molecular se encontraba

entre 300 y 500 pb, mientras que para *matK* se encontrada entre 200 y 300 pb. Con los resultados obtenidos en la amplificación del ADN extraído con estos genes se determinó que los primers diseñados son efectivos para la identificación de esta especie.

Los estudios biológicos enfocados al análisis de las características morfológicas, las muestras de tejido y las secuencias de ADN nos permitirá identificar especies y conocer la riqueza biológica de Ecuador. Al ser un país megadiverso por la abundancia de especies de diferentes grupos biológicos, es una potencial zona de estudio e identificación de especies de flora y fauna. Hasta la actualidad no se conoce el número total de especies que se encuentran en el país, pero algunos investigadores estiman que el conocimiento sobre diversidad biológica es menor al que en realidad existe (Altamirano & Yáñez, 2016). Por tal motivo, esta investigación pretende identificar la especie andina *Pernettya prostrata*, de la cual se conoce poco, para incrementar el conocimiento sobre las especies endémicas de los bosques andinos.

Capítulo VI: Conclusiones

- 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.
- Los estudios moleculares enfocados a la identificación de especies andinas son de gran importancia para generar información genética de especies que comparten similitudes morfológicas.

Capítulo VII: 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.

Capítulo VIII: Referencias bibliográficas

Abril, D. (2010). *LAS ERICÁCEAS CON FRUTOS COMESTIBLES DEL ALTIPLANO CUNDIBOYACENSE*

[Pontificia Universidad Javeriana].

[https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8516/tesis472.pdf?sequence=1#:~](https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8516/tesis472.pdf?sequence=1#:~:text=Los%20usos%20económicos%20de%20esta,tóxicas%20(Smith%2C%202004).)

:text=Los%20usos%20económicos%20de%20esta,tóxicas%20(Smith%2C%202004).

Aguilar, V. (2022). *DNA BARCODING DE POÁCEAS ASOCIADAS A PAJONALES PARA LA DETERMINACIÓN*

DE LA FIRMA ESPECTRAL EN EL ACP TILACANCHA, AMAZONAS [Bachelorthesis, UNIVERSIDAD

NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS].

<https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2731/Aguilar%20Rafael%20Vilma.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Altamirano, M., & Yáñez, P. (2016). EL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN(barcoding): UNA HERRAMIENTA PARA LA INVESTIGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA EN EL ECUADOR. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 23(1), 5–14.
- Antil, S., Abraham, J. S., Sripoorna, S., Maurya, S., Dagar, J., Makhija, S., Bhagat, P., Gupta, R., Sood, U., Lal, R., & Toteja, R. (2023). DNA barcoding, an effective tool for species identification: A review. *Molecular Biology Reports*, 50(1), 761–775. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-08015-7>
- Ayala, L., Villa, M., Mendoza, Z. A., & Mendoza, N. A. (2014). Cuantificación del carbono en los páramos del parque nacional Yacuri, provincias de Loja y Zamora Chinchipe, Ecuador. *CEDAMAZ*, 4(1). <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/237/220>
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 221–242. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. *Agricultura Técnica*, 60(3), 270–281. <https://doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>
- Bussmann, R. W. (2005). Bosques andinos del sur de Ecuador, clasificación, regeneración y uso. *Revista peruana de Biología*, 12(2), 203–216.
- Buytaert, W., Sevink, J., & Cuesta, F. (2014). Cambio climático: La nueva amenaza para los páramos. En *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos* (pp. 505–525). CONDESAN. <https://dare.uva.nl/search?identifier=edca1067-1a1f-44cd-ad16-cd52c0fcaeb7>
- Cahyaningsih, Y. F., Sukartini, Sutanto, A., Santoso, P. J., Arsyad, M. A., & Larekeng, S. H. (2021). Amplification rate of matK and rbcL genes in three types of durian. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 886(1), 012011. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/886/1/012011>

- Caranqui, J., Lozano, P., Reyes, J., Caranqui, J., Lozano, P., & Reyes, J. (2016). Composición y diversidad florística de los páramos en la Reserva de Producción de Fauna Chimborazo, Ecuador. *Enfoque UTE*, 7(1), 33–45. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v7n1.86>
- Carrodegua, A., & Zúñiga, A. (2021). Aplicación de herramientas moleculares para el mejoramiento genético de pasturas. *Pastos y Forrajes*, 44, 1–11.
- Castañeda, C. C., Portela, R., & Morillo, Y. (2021). Caracterización molecular con marcadores ISSR de la colección de cítricos de la Universidad de los Llanos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 67–84.
- Cayuela, L., & Granzow-de la Cerda, I. (2012). *Biodiversidad y conservación de bosques neotropicales*.
- Chaves, Ó. M. (2007). Retraso del enverdecimiento en las hojas nuevas de *Pernettya prostrata* (ericaceae): Posibles funciones adaptativas. *Pensamiento Actua*, 7(8–9), 96–104.
- Chuncho, C. C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones: Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 9(2), Article 2.
- Cortes, J. (2009). *Estudio químico de frutos de Pernettya prostrata (Cavan) Sleumer y su evaluación en la producción de hipercalcemia* [Trabajo de Grado, Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/14588/CortesCasasJoseYesid2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cuesta, F., Báez, S., Muriel, P., & Salgado, S. (2014). La vegetación de los páramos del Ecuador. En *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos* (pp. 106–141). CONDESÁN. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=1a9e23a003392ca9010c41f44e16d41f48e3c3c3>
- Cuesta, F., Peralvo, M., & Valarezo, N. (2009). Los bosques montanos de los Andes Tropicales. *ECOBONA*. <https://www.bosquesandinos.org/los-bosques-montanos-de-los-andes-tropicales/>

- Dávila, M., Laurentín, H., Vásquez, C., Paredes Carreño, S., Frutos, V., & León, O. (2019). Evaluación de dos secuencias de código de barras de ADN en germoplasmas de *Arracacia xanthorrhiza* (Apiaceae) de Ecuador. *Revista Peruana de Biología*, 26(4), 491–498.
<https://doi.org/10.15381/rpb.v26i4.15829>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1991). DNA Isolation from Small Amount of Plant Tissue. *Phytochem, Bull*(57), 13–15.
- Escalante, A. E., Jardón Barbolla, L., Ramírez-Barahona, S., & Eguiarte, L. E. (2014). The study of biodiversity in the era of massive sequencing. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1249–1264. <https://doi.org/10.7550/rmb.43498>
- Grefa, N. (2014). *24 DE NOVIEMBRE DEL 2014 PUYO - PASTAZA - ECUADOR* [Tesis de Grado, Universidad Estatal Amazónica].
<https://repositorio.uea.edu.ec/bitstream/123456789/146/1/T.AMB.B.UEA.%203063>
- Guzmán, L. F., Cortés, M. A., Pichardo, J. M., Arteaga, R. I., Guzmán, L. F., Cortés, M. A., Pichardo, J. M., & Arteaga, R. I. (2018). Comparación de protocolos de aislamiento de DNA a partir de semilla de soya. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(8), 1691–1701.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.872>
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., Vásquez, A., & Cerra, M. (2014). *Los páramos andinos ¿que sabemos?*
<https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2014-025.pdf>
- Izco, J., Pulgar, Í., Aguirre, Z., & Santin, F. (2007). Estudio florístico de los páramos de pajonal meridionales de Ecuador. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 237–246.
- Jadán, O., Cedillo, H., Pillacela, P., Guallpa, D., Gordillo, A., Zea, P., Díaz, L., Bermúdez, F., Arciniegas, A., Quizhpe, W., Vaca, C., Jadán, O., Cedillo, H., Pillacela, P., Guallpa, D., Gordillo, A., Zea, P., Díaz, L., Bermúdez, F., ... Vaca, C. (2019). Regeneración de árboles en ecosistemas naturales y

- plantaciones de *Pinus patula* (Pinaceae) dentro de un gradiente altitudinal andino (Azuay, Ecuador). *Revista de Biología Tropical*, 67(1), 182–195.
- <https://doi.org/10.15517/rbt.v67i1.32940>
- Jiménez, P., & Collada, C. (2008). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems*, 9, 237-248.
- Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S., & Hyung, N. I. (1997). A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, 25(5), 1085–1086.
- Lara, M., & Sánchez, F. (1994). Biología molecular de plantas. *Botanical Sciences*, 55, 45–52.
- <https://doi.org/10.17129/botsci.1447>
- Li, F.-W., Kuo, L.-Y., Rothfels, C. J., Ebihara, A., Chiou, W.-L., Windham, M. D., & Pryer, K. M. (2011). *rbcl* and *matK* Earn Two Thumbs Up as the Core DNA Barcode for Ferns. *PLoS ONE*, 6(10), e26597.
- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026597>
- Llambí, L., & Cuesta, F. (2014). La diversidad de los páramos andinos en el espacio y en el tiempo. En *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos* (pp. 8–26). CONDESÁN.
- <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=1a9e23a003392ca9010c41f44e16d41f48e3c3c3>
- Llambí, L., Soto-W., A., Célleri, R., & Bièvre, B. de (Eds.). (2012). *Ecología, hidrología y suelos de páramos: Proyecto Páramo Andino*. Proyecto Páramo Andino.
- López De Heredia, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64. <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Lozano, P. (2015). Especies forestales arbóreas y arbustivas de los bosques montanos del Ecuador. MAE, FAO, ONU. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/142985-opac>

- Malizia, A., Blundo, C., Carilla, J., Osinaga Acosta, O., Cuesta, F., Duque, A., Aguirre, N., Aguirre, Z., Ataroff, M., Baez, S., Calderón-Loor, M., Cayola, L., Cayuela, L., Ceballos, S., Cedillo, H., Farfán Ríos, W., Feeley, K. J., Fuentes, A. F., Gámez Álvarez, L. E., ... Young, K. R. (2020). Elevation and latitude drives structure and tree species composition in Andean forests: Results from a large-scale plot network. *PLoS ONE*, *15*(4), e0231553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231553>
- Mena, P., Castillo, A., Flores, S., Hofstede, R., Josse, C., Lasso B, S., Medina, G., Ochoa, N., & Ortiz, D. (Eds.). (2011). *Páramo: Paisaje estudiado, habitado, manejado e institucionalizado; selección de textos de la Serie Páramo, órgano de difusión del Grupo de Trabajo en Páramos del Ecuador (GTP)*. Ed. Univ. Abya-Yala [u.a.].
- Mena, P., & Hofstede, R. (2006). *ParamosEcuatorianos*. 91–109.
- Mojica, D., Rondón, F., Quintero, L., & Garzón, L. (2018). Optimización del protocolo de extracción de ADN con muestras de *Vaccinium floribundum* del Páramo de Santurbán. *Universidad Autónoma de Bucaramanga*. <https://repository.unab.edu.co/handle/20.500.12749/21900>
- Moscoso, M. A. (2023). *Patrones de distribución de plantas no nativas en los páramos del Ecuador como base para apoyar los esfuerzos en su conservación* [masterThesis, Ecuador : Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC)]. <https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/10472/1/MUTC-001520.pdf>
- Moya, C., & Santamaría, J. (2023). *La protección de los páramos dentro del ordenamiento jurídico ecuatoriano*. *4*(E2), 453–469.
- Muriel, P., Báez, S., Cuesta, F., Salgado, S., van Reenen, G., Quintana, C., & Navarrete, H. (2014). Herramientas para el manejo de información florística y ecológica de los páramos del Ecuador: Lista anotada de especies y base de datos cuantitativa*. En *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos* (pp. 146–172). CONDESÁN.

<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=1a9e23a003392ca9010c41f44e16d41f48e3c3c3>

Pacheco, A., Barcos, M., Naranjo, J., Peña, D., & Moreira, R. (2022). *Ericaceous Plants: A Review for the Bioprospecting of Ericoid Mycorrhizae from Ecuador - ProQuest*. ProQuest.

<https://www.proquest.com/openview/88edc4c2c7d4f9a88c1d653d64ddde94/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2032408>

Pedraza, P., Valencia, R., Montúfar, R., Santiana, J., & Tye, A. (2017). Ericaceae. En *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (2a ed., pp. 299–315). Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

<https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500173>

Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casas, A., Castañeda, A., Castillo, A., Cerritos, R., Chassin-Noria, O., & Colunga-García, P. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: Estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437–494.

Rey, F., & Capdevielle, F. (2020). Aplicación del código de barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *INNOTECH*, 20, 117–138.

Rincón, C. M., Patiño, O. J., Plazas, E. A., Bulla, M. E., Rozo, G., & Puyana, M. (2014). Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 138–150.

Romoleroux, K., Cárate, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2019). *Pernettya prostrata* (Cav.) DC. Floraweb. <https://edipuce.edu.ec/wp-content/uploads/2021/06/Plantas-vasculares-de-los-bosques-de-polylepis.pdf>

Romoleroux, K., Mera, P. M., Sklenář, P., Ulloa, C. U., Ortiz, D. A. E., & Romoleroux, C. (2023). La flora de los páramos ecuatorianos: Orígenes, diversidad y endemismo. En *Los páramos del Ecuador*:

- Pasado, presente y futuro* (1a ed., pp. 106–125). USFQ PRESS.
<https://libros.usfq.edu.ec/index.php/usfqpress/catalog/view/32/71/195>
- Russell, A., Samuel, R., Rupp, B., Barfuss, M. H. J., Šafran, M., Besendorfer, V., & Chase, M. W. (2010). Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandeeae, Orchidaceae): Evidence from plastid DNA sequence data. *Taxon*, *59*(2), 389–404.
- Salavarieta, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*, *23*(3), 9–17.
- Sánchez, E., Mora, E., & Barrantes, W. (2021). Aislamiento de ADN de alta calidad en *Psidium guajava* L. para estudios genómicos1. *Agronomía Mesoamericana*, *32*(2), 638–649.
- Sánchez, V. (2020). *Estudio fitoquímico e identificación molecular de las especies del género Bomarea del norte de los Andes del Ecuador, mediante el sistema BARCODE*. [Bachelorthesis, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18442>
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: An introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *360*(1462), 1805–1811. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1730>
- Souza, H. A. V., Muller, L. A. C., Brandão, R. L., & Lovato, M. B. (2012). Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Research*, *11*(1), 756–764.
<https://doi.org/10.4238/2012.March.22.6>
- Tobón, C., & Morales, E. G. G. (2007). CAPACIDAD DE INTERCEPTACIÓN DE LA NIEBLA POR LA VEGETACIÓN DE LOS PÁRAMOS ANDINOS. *Avances en Recursos Hidráulicos*, *15*, Article 15.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/arh/article/view/9324>
- Vargas, D. (2021). *Flujo génico entre poblaciones de polylepis incana kunth. Y P. racemosa Ruiz & Pav. Del área de conservación de Paluguillo en la “Estación Científica Agua y Páramo” en Pichincha*

[Bachelorthesis, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/24261>

Velasco, P., & Vargas, O. (2008). Problemática de los bosques altoandinos. En *Estrategias para la restauración ecológica de los bosques altoandinos* (2a ed., pp. 41–56). Universidad Nacional de Colombia.

https://www.researchgate.net/publication/260640030_ProblematICA_de_los_bosques_altoandinos

Velasco, R. (2005). *Marcadores moleculares y la extracción de ADN*. 3, 14–18.

Zapata, A. (2021). *Páramos andinos: Ecología, biodiversidad y contribuciones al bienestar humano*

[Universidad de Almería]. <https://repositorio.ual.es/handle/10835/13819>

Zapata, G., & Branch, L. (2014). Evaluación de los factores determinantes de presencia – ausencia de los carnívoros en los Andes ecuatorianos. En *Avances en investigación para la conservación de los páramos andinos* (pp. 70–83). CONDESÁN.

<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=1a9e23a003392ca9010c41f44e16d41f48e3c3c3>

