



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Gangotena Herrera, Cynthia Naomi

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

PhD. Proaño Tuma, Karina Isabel

31 de agosto del 2023



Gangotena_Herrera_Cynthia_Naomi_...

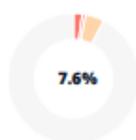
Scan details

Scan time: August 30th, 2023 at 23:41 UTC

Total Pages:
43

Total Words:
10575

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	2.1%	225
Minor Changes	0.9%	93
Paraphrased	4.6%	490
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

🔍 Plagiarism Results: (17)

[T-ESPE-019538.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#) 2.8%

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/2100...>

USUARIO

ÍNDICE DE CONTENIDOS LISTADO DE
TABLAS.....

[T-ESPE-044464.pdf](#) 2.4%

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/24261/1/t-es...>

Lenovo

1 «Flujo génico entre poblaciones de *Polylepis incana* Kunth. y *P. racemosa* Ruiz & Pav. del Área de Conservación de Paluguillo en la "Es...

[T-ESPE-52140.pdf](#) 0.6%

<https://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/28998...>

Cuenta Microsoft

1 "Caracterización morfológica y germinativa de tres especies vegetales de la familia Valerianaceae provenientes del Parque Nacional Cay...



Financiado económicamente por:
KARINA
ISABEL
PROANO TUMA



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 *Valeriana adscendens* Turcz mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador “** fue realizado por la señorita **Gangotena Herrera, Cynthia Naomi**, el 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, 28 de agosto del 2023



Proaño Tuma, Karina Isabel PhD

C. C.1707245104



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Gangotena Herrera, Cynthia Naomi** con cédula de ciudadanía n°1750044875, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Caracterización molecular de la especie *Valeriana adscendens* Turcz 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, 28 de agosto del 2023

Gangotena Herrera, Cynthia Naomi

C.C.: 1750044875



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Gangotena Herrera, Cynthia Naomi**, con cédula de ciudadanía n° 1750044875, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Caracterización molecular de la especie *Valeriana adscendens* Turcz mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 28 de agosto del 2023

Gangotena Herrera, Cynthia Naomi
C.C.: 1750044875

Dedicatoria

A mis padres, Jeanneth y Fernando, quienes con su amor incondicional y esfuerzo me han guiado en cada etapa de mi vida. Gracias por ser el pilar de mi vida y enseñarme a nunca rendir ante los obstáculos de la vida.

A mi segunda madre, mi abuelita Mercedes que con su sabiduría me ha enseñado a ser una persona centrada. Gracias por los consejos, el amor y por el apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mis hermanos, Sebastian y Emilio, quienes con su risa, compañerismo y locuras siempre me han apoyado a cumplir mis sueños y seguir adelante.

Agradecimientos

A mi tutora Dra. Karina Proaño Tuma, por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su guía además de brindarme su apoyo, tiempo y dedicación. Y la Dra. Claudia Segovia por apoyarme con su conocimiento y apoyo para el desarrollo de este trabajo. Gracias por haber contribuido a mi formación personal y profesional.

A la Ing. Gabriela Miño, técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal, por su invaluable ayuda durante el desarrollo de este trabajo y por sus consejos durante todo este largo proceso.

A la Ing. Joselyn Caiza, quien con su apoyo, conocimientos y amistad me ha ayudado en el transcurso de este trabajo.

A mis mejores amigos Viviana, Valeria, Alisson, Sofía y Miguel por su amistad, ánimos y consejos durante toda mi carrera universitaria y durante el desarrollo de este trabajo.

Al proyecto HANS-BANK por el apoyo y la oportunidad de desarrollar conocimientos que favorezcan a la conservación de especies andinas. A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE y la carrera de Biotecnología por brindarme la oportunidad de formarme en sus aulas y adquirir conocimientos que ayuden al desarrollo de la ciencia en el país.

Índice de Contenidos

Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Resumen	10
Abstract	13
Capítulo I: Introducción	14
Planteamiento del problema	14
Justificación del problema	15
Objetivos	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
Hipótesis.....	17
Capítulo II: Marco Teórico	18
Bosques Andinos y Páramos del Ecuador	18
Importancia de los Bosques Andinos y Páramos	18
Subfamilia Valerianaceae.....	19
Género Valeriana	20
Valeriana adscendens Turcz.....	21
Distribución.....	22
Descripción Morfológica	23
Diversidad genética.....	24
Factores que afectan la diversidad genética	25
Importancia de la diversidad genética en la conservación.....	26
Técnicas Moleculares.....	27
Marcadores Moleculares	27
Repetición de secuencia inter simple (ISSRs)	29
Marcadores moleculares cloroplásticos	30
Capítulo III: Materiales y Métodos	31
Zona de Estudio.....	31
Recolección de muestras vegetales.....	32
Conservación de muestras y procesamiento.....	33
Extracción de ADN	34

Protocolo de extracción de ADN de Semagn (2013).....	34
Electroforesis en gel de agarosa	35
Cuantificación de ADN	36
Amplificación de secuencias mediante marcadores moleculares	36
Marcador molecular cloroplástico tRNA-Gly (trnG)	36
Reactivos y condiciones de amplificación.....	37
Marcadores moleculares ISSRs	39
Reactivos y condiciones de amplificación.....	40
Visualización de productos de amplificación.....	42
Registro de datos	42
Marcador molecular cloroplástico trnG.....	42
Marcadores moleculares ISSRs	43
Capítulo IV: Resultados	44
Muestreo, recolección y conservación de las muestras	44
Extracción y cuantificación de ADN	44
Amplificación con el marcador molecular cloroplástico tRNA-Gly (trnG)	46
Estandarización de la temperatura de alineamiento y concentración de ADN.....	47
PCR <i>in silico</i> de la secuencia tRNA-Gly (trnG).....	48
PCR de la secuencia tRNA-Gly (trnG)	50
Análisis de datos para el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG).....	50
Marcadores moleculares ISSRs	52
Amplificación de marcadores ISSRs	52
Análisis de datos para los marcadores ISSRs	53
Capítulo V: Discusión	57
Recolección y Conservación de muestras foliares	58
Amplificación marcadores moleculares.....	59
Capítulo VI: Conclusiones	64
Capítulo VII: Recomendaciones	65
Capítulo VIII: Referencias	66

Índice de Tablas

Tabla 1 Coordenadas y número de muestras recolectadas por cuadrante.....	33
Tabla 2 Cebador forward y reverse diseñados para el gen tRNA-Gly de <i>Valeriana adscendens</i> Turcz.....	37
Tabla 3 Concentraciones de los reactivos para la amplificación con el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG).....	38
Tabla 4 Condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) utilizados para el marcador cloroplástico tRNA-Gly.....	38
Tabla 5 Cebadores utilizados en <i>Valeriana jatamansi</i> Jones	39
Tabla 6 Concentraciones de los reactivos para la amplificación de ISSRs en muestras de <i>Valeriana adscendens</i> Turcz.....	40
Tabla 7 Condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) utilizados con los cebadores ISSRs con muestras de <i>Valeriana adscendens</i> Turcz.....	41
Tabla 8 Temperaturas de alineamiento para los marcadores ISSRs.....	41
Tabla 9 Análisis estadístico para el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG).....	51

Índice de Figuras

Figura 1 Valeriana adscendens Turcz.....	22
Figura 2 Distribución de Valeriana adscendens Turcz en Ecuador	23
Figura 3 Estructura morfológica de Valeriana adscendens Turcz.....	24
Figura 4 Ubicación geográfica de la especie Valeriana adscendens Turcz	31
Figura 5 Distribución y coordenadas de los cuadrantes de muestreo	32
Figura 6 Hojas de Valeriana adscendens Turcz.....	44
Figura 7 Electroforesis en gel de agarosa del ADN de Valeriana adscendens Turcz obtenida con el método de Semagn (2013)	45
Figura 8 Electroforesis en gel de agarosa del ADN de Valeriana adscendens Turcz obtenidas con el método de Semagn (2013) modificado	46
Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del marcador tRNA-Gly (trnG) con variación de temperatura.....	47
Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de ADN del marcador tRNA-Gly (trnG) con variación de concentración.....	48
Figura 11 PCR in silico con los cebadores diseñados para tRNA-Gly (trnG)	49
Figura 12 Nucleotide Blast para la secuencia obtenida en la PCR in silico	49
Figura 13 Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los cebadores diseñados para tRNA-Gly (trnG) en muestras de Valeriana adscendens Turcz	50
Figura 14 Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los cebadores 17898B y 17898A en muestras de Valeriana adscendens Turcz.....	52
Figura 15 Matriz triangular en base al índice de similaridad de Jaccard	54
Figura 16 Dendrograma generado mediante el método “Neighbor Joining ”	55
Figura 17 Análisis de coordenadas principales (PCoA) generado para las 16 muestras de Valeriana adscendens Turcz.....	56

Resumen

El Bosque Andino es ampliamente reconocido como un ecosistema de gran importancia en el ámbito ecológico, social, histórico y cultural. Una de sus características más destacadas es su vegetación, la cual ha logrado desarrollado adaptaciones para sobrevivir en las condiciones climáticas extremas de la región. *Valeriana adscendens Turcz* es una especie perteneciente al género *Valeriana* que ha prosperado en este ecosistema. Esta planta se distingue por la presencia de metabolitos secundarios, tales como el ácido valérico y los valepotriatos, los cuales son de gran importancia para la fabricación de medicamentos. En los últimos años, el avance de las herramientas moleculares ha posibilitado la investigación de especies andinas como *Valeriana adscendens Turcz* con el objetivo de preservar sus recursos genéticos. Por lo cual, el presente estudio pretende caracterizar a nivel molecular esta especie con el propósito de conservar su material genético gracias al banco de semillas Andinas HANS-BANK. Para llevar a cabo este estudio, se tomaron muestras foliares en el Parque Nacional Cayambe-Coca. A partir de las cuales, se procedió a aislar el ADN. Se realizaron amplificaciones de fragmentos específicos de interés, los cuales incluyeron al marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG) y los marcadores ISSRs. Los resultados muestran que el marcador ISSR 17898B con un de PIC de 0.1742 es un marcador informativo para la caracterización molecular de *Valeriana adscendens Turcz*. Además, el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG) mostró tasas de amplificación que oscilaron entre el 63% y el 88%, lo que confirma la utilidad de este otro marcador para estos ensayos. Este trabajo permitirá proporcionar información relevante para continuar los estudios de caracterización *Valeriana adscendens Turcz* dentro del proyecto de semillas HANS-BANK.

Palabras clave: Bosque Andino, *Valeriana adscendens Turcz*, ISSRs, tRNA-Gly (trnG).

Abstract

The Andean Forest is widely recognized as an ecosystem of great importance in ecological, social, historical, and cultural contexts. One of its most outstanding features is its vegetation, which has developed adaptations to survive the extreme climatic conditions of the region. “*Valeriana adscendens Turcz*” is a species of a plant belonging to the *Valeriana* genus that has thrived in this ecosystem. This plant stands out for the presence of secondary metabolites, such as valeric acid and valepotriates, which are of great importance for pharmaceutical manufacturing. In recent years, the improvement of molecular tools has made possible the investigation of Andean species like “*Valeriana adscendens Turcz*” with the purpose to preserve its genetic resources. Therefore, this assay aims to characterize this species at the molecular level with the purpose of preserving its genetic material through the Andean HANS-BANK seed bank. To carry out this project, leaf samples were collected in the Cayambe-Coca National Park, and the DNA was isolated from these samples. Amplifications of specific fragments of interest were performed, including the chloroplast marker tRNA-Gly (trnG) and ISSR markers. The results show that the ISSR marker 17898B with a PIC of 0.1742 is an informative marker for the molecular characterization of the “*Valeriana adscendens Turcz*”. Additionally, the chloroplast marker tRNA-Gly (trnG) showed amplification rates ranging from 63% to 88%, confirming the utility of this marker for these assays. This work will provide relevant information to continue the characterization studies of “*Valeriana adscendens Turcz*” within the HANS-BANK seed project.

Keywords: Andean Forest, *Valeriana adscendens Turcz*, ISSRs, tRNA-Gly (trnG).

Capítulo I: Introducción

Planteamiento del problema

El bosque andino y el páramo son regiones de alta montaña, que se ubican en la parte norte de la cordillera de los Andes a lo largo de Colombia, Ecuador y el norte del Perú, el cual presenta una gran biodiversidad a nivel mundial. En estos ecosistemas se observan entre el 6.7% y el 5.7% de las plantas y vertebrados de todo el planeta (Morocho & Chuncho , 2019). La alta biodiversidad de estas zonas se debe a las cadenas montañosas relativamente jóvenes a nivel geológico que poseen. Además, la biodiversidad está influenciada por la actividad volcánica como glaciación de los diferentes gradientes latitudinales, a la que ha sido expuesta durante millones de años (Hofstede & Llambí, 2019) (Mena & Hofstede, 2006)

En Ecuador, los bosques andinos y los páramos constituyen un archipiélago ecológico que se encuentra distribuido a lo largo de las zonas más altas de los Andes entre los 2400 y los 4700 m.s.n.m., el cual cubre cerca del 6 % del territorio nacional. Las fluctuaciones de temperatura y la alta radiación solar en estas áreas son factores que influyen en las características de la vegetación (Buytaert , Célleri, De Bièvre, & Cisneros , 2006) . Generalmente, en estas zonas las especies desarrollan estrategias adaptativas únicas para contrarrestar las condiciones abióticas de este entorno, dando lugar a importantes procesos de especiación y convergencia evolutiva (Hofstede & Llambí, 2019)

Estos ecosistemas únicos proporcionan varios servicios ecológicos como el suministro de agua a los valles, debido a la gran capacidad de almacenamiento de los suelos, a la acumulación de materia orgánica, a la baja evaporación y a la morfología de ciertas plantas. Además, permiten un balance natural entre épocas lluviosas y secas. Los páramos son también valiosos sumideros de carbono, ya que lo retienen en el subsuelo ayudando a evitar el calentamiento global (Llambí , y otros, 2012) (Morocho & Chuncho , 2019)

A pesar de la importancia de los bosques andinos y páramos para la provisión de agua y la mitigación del cambio climático, estos ecosistemas enfrentan fuertes amenazas antropogénicas como la agricultura, ganadería y quema, lo que pone en riesgo su conservación (Terán, Pinto, Cuesta , & Ortiz, 2019). De igual manera, la pérdida de estos ecosistemas ha impactado de forma negativa en las poblaciones vegetales asociadas, conduciendo a una reducción significativa de la variación genética y al tamaño de las poblaciones (Loo & Canadian, Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. , 2011)

Justificación del problema

El bosque andino es considerado un ecosistema muy importante a nivel ecológico, social, histórico y cultural. Entre los rasgos más sobresalientes de este ecosistema se encuentra la vegetación, la cual se ha adaptado a las condiciones climáticas extremas de esta zona. En el Ecuador, los páramos constituyen cerca del 10% de la flora de todo el país (Mena & Hofstede, 2006). Actualmente, se han descrito 112 familias, 479 géneros y alrededor de 3000 a 4000 especies de plantas vasculares, adaptadas a condiciones fisiológicas únicas (Díaz, y otros, 2005). A pesar de la gran biodiversidad, el 80% de las plantas endémicas del páramo están bajo algún grado de amenaza, el 9.5% se halla en peligro crítico, el 27.8% en peligro y el 40.7% de las plantas son consideradas vulnerables (UICN, 2022).

Las especies de plantas que se encuentran con mayor frecuencia en los bosques andino son las pertenecientes a las familias de Asteraceae, Poaceae y Valerianaceae (Sabogal & Quinteros, 2013) , de las cuales el 60% son endémicas. Varios de estos ejemplares se encuentran documentados y depositados en el Herbario Nacional del Ecuador, mientras que el 40 % restante no presenta ninguna colección en el país. Algunas especies se encuentran almacenadas en diferentes hábitats y aproximadamente la mitad de estas especies son conocidas por colecciones únicas (Sabogal & Quinteros, 2013).

Existen pocos estudios ecológicos, morfológicos y genéticos sobre las especies de los bosques andinos por lo cual, se desconoce el impacto ambiental y socioeconómico que tienen estas plantas. Este hecho ha llevado a un enfoque cada vez mayor en la conservación de estos recursos vegetales. La identificación y caracterización molecular apropiadas de los materiales vegetales es esencial para la conservación exitosa de estas especies andinas (Abdel & Osman, 2017). En los últimos años se han desarrollado herramientas moleculares que ofrecen medios más fáciles y menos laboriosos para asignar taxones tanto a plantas conocidas como desconocidas.

Estas técnicas permiten un análisis más preciso y detallado, lo que contribuye significativamente a la conservación de los recursos vegetales (Carrodegua & Zúñiga, 2021). Además, facilitan la caracterización de estas especies y su conservación, lo que es fundamental para tomar decisiones relacionadas a su uso y protección. En este contexto, el presente estudio pretende caracterizar a nivel molecular la especie *Valeriana adscendens Turcz* con el propósito de conservar su material genético a través del banco de semillas Andinas HANS-BANK.

Objetivos

Objetivo general

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

Objetivos específicos

Obtener material vegetal de la especie *Valeriana adscendens* Turcz mediante la recolección de hojas al azar en Bosques Andinos del Ecuador, para la extracción de material genético.

Estandarizar el protocolo de extracción de ADN en muestras foliares de *Valeriana adscendens* Turcz, a partir de diferentes protocolos descritos en bibliografía para la amplificación de marcadores moleculares.

Amplificar marcadores moleculares a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras foliares, para caracterizar la especie *Valeriana adscendens* Turcz en Bosques Andinos del Ecuador.

Hipótesis

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

Capítulo II: Marco Teórico

Bosques Andinos y Páramos del Ecuador

Los Bosques Andinos son ecosistemas montañosos que incluyen una amplia gama de altitudes. Estos bosques se extienden desde los 2400 hasta los 3500 m s.n.m., abarcando bosques altos como matorrales altoandinos (Cortés, Camacho, & Matoma, 2020). En las zonas de la región andina baja, el rango de altitud varía entre los 2400 y 2800 m.s.n.m., mientras que en la región subandina, el rango de altitud se extiende desde los 1000 hasta los 2400 m.s.n.m. (Preciado, 2000). Según la FAO (2015), los bosques andinos representan aproximadamente el 24.9% de los bosques en Colombia, el 31.98% en Ecuador, el 27.76% en Perú y el 20 % en Bolivia (Cortés, Camacho, & Matoma, 2020).

Por otro lado, los páramos son biomas que se encuentran exclusivamente en grandes altitudes de las regiones cercanas a la línea ecuatorial en Sudamérica. Estos ecosistemas se encuentran distribuidos en Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Vásconez, Hofstede, & Suárez, 2023). Los páramos se sitúan en altitudes que van desde los 3600 hasta los 4700 m.s.n.m. y presentan temperaturas que oscilan entre los 3 y 6 °C (Camacho, 2014)

Aunque tradicionalmente se ha considerado al páramo como un ecosistema neotropical altoandino, en realidad es un paisaje compuesto por diversos ecosistemas que interactúan desde los bosques en las cimas de las montañas (límite superior) hasta los glaciares (límite inferior). Esta biodiversidad incluye varios tipos de vegetación como pajonales, bosques de páramo y matorrales en conjunto con el bosque andino (Vásconez, Hofstede, & Suárez, 2023).

Importancia de los Bosques Andinos y Páramos

Los bosques andinos y los páramos brindan varios beneficios ecológicos importantes para el ser humano y el planeta. Estos ecosistemas juegan un papel importante en el ciclo hidrológico debido a que provisionan y almacenan agua de forma constante a lo largo de todo el año. Este fenómeno se produce como resultado de la precipitación uniforme y la baja evapotranspiración que se da en estos sectores.

Las características del suelo también contribuyen a la acumulación de agua, lo que se debe a la estructura porosa que facilita la infiltración (Llambí , y otros, 2012) (Buytaert , Célleri, De Bièvre, & Cisneros , 2006).

La capacidad de almacenar gran cantidad de carbono es otro servicio que brindan estos ecosistemas. Los suelos del páramo como del bosque andino tienen la capacidad de retener grandes cantidades de carbono debido a las bajas temperaturas que pueden presentarse en estas zonas. Esta característica reduce la velocidad de descomposición de la materia orgánica. Por lo tanto, estos suelos pueden llegar a retener hasta 10 veces más la cantidad de carbono que los suelos de los bosques tropicales (Leal, 2020) (Murray, 2020)

Además de los servicios ecológicos mencionados anteriormente, el páramo y los bosques andinos presentan una gran biodiversidad y endemismo. Estos ecosistemas tienen una gran diversidad genética de especies, ecotipos y especies locales de flora y fauna. La diversidad genética de estas zonas se evidencia con la morfología y fisiología única de muchas poblaciones vegetales que se han ido adaptando durante miles de años a estos ecosistemas (Khan, Al-Qurainy, & Nadeem, 2012)

Subfamilia Valerianaceae

Valerianaceae es una subfamilia de la familia Caprifoliaceae que contiene alrededor de 400 especies. La mayor parte de estas plantas se encuentran distribuidas en las regiones templadas del todo el mundo, con excepción de Australia, Nueva Zelanda y las islas del Pacífico. Aunque las especies se encuentran principalmente distribuidas en el hemisferio norte, el centro de la diversidad de la subfamilia Valerianaceae se encuentra en América del Sur. En esta región se han encontrado varias especies con una gran variedad morfológica que va desde plantas en roseta hasta especímenes anuales que presentan similitud con vides y arbustos micrófilos (Samal, Sahoo, Behera, & Dash, 2021). En América del Sur, esta subfamilia se encuentra distribuido en Perú con 73 especies, en Ecuador con 35, en Venezuela con 2 y en Colombia con 28 especies (Kutschker, 2011)

Las plantas de esta subfamilia se caracterizan por ser hierbas, ocasionalmente arbustos, que presentan hojas simples o pinnadas, opuestas y exstipuladas. La inflorescencia está compuesta por unidades de cimas. Su corola es simpétala y cuenta con espolones junto con 1 a 4 estambres. Además, la flor cuenta con un ovario inferior tricarpelar con un lóbulo funcional y un solo óvulo apical. El fruto es aquenio y en algunos miembros se puede encontrar un cáliz similar a un papo. La semilla madura generalmente se encuentra sin endospermo (Simpson, 2019) (Weberling & Bittrich, 2016)

Algunos miembros de la subfamilia poseen un olor distintivo, lo cual es atribuido a la presencia del ácido valérico y sus derivados. Estos compuestos generalmente se encuentran en mayor abundancia en las raíces de estas plantas. Estas especies presentan propiedades medicinales que se utilizan para tratar afecciones nerviosas mediante extractos de sus raíces y hojas. Además de sus aplicaciones medicinales, ciertas plantas son empleadas en la producción de perfumes y tintes. Por ejemplo, el nardo (*Nardostachys jatamansii*) es un miembro de la subfamilia valerianaceae, originario del Himalaya, el cual es empleado ampliamente para este propósito. Aunque estas plantas ofrecen grandes beneficios, es importante tener en consideración que algunas de ellas contienen venenos en altas concentraciones que pueden ser perjudiciales para el ser humano (Weberling & Bittrich, 2016).

Género Valeriana

El género Valeriana es el más diverso y el más estudiado dentro de la subfamilia Valerianaceae, debidos a sus propiedades antiespasmódicas, relajantes y sedantes, atribuidas principalmente a la presencia de valepotriatos, derivados del borneol y ácido isovalérico (Campaña, 2005). Estas plantas son sub-arbustos, arbustos, lianas o hierbas de tipo perenne o anual. Morfológicamente se caracterizan por presentar flores hermafroditas con una inflorescencia escamante ramificada o cimosa simple. Además, su flor posee un cáliz con dientes lineares enrollados durante la antesis que va creciendo hasta tornarse plumoso en forma de villano durante la fructificación. Los frutos en estas plantas presentan dos cavidades no desarrolladas (Weberling & Bittrich, 2016)

Este género se caracteriza por presentar algunos compuestos activos importantes como el ácido valérico y los valepotriatos (Murray, 2020). Los valepotriatos son un grupo de metabolitos secundarios catalogados desde el punto de vista químico como iridoides y constituyen el 0.5 y 1.6% de los principios activos en las plantas del género valeriana. Esta molécula se caracteriza por presentar una actividad espasmolítica, sedante y anti-convulsiva por lo cual es muy empleada en la producción de medicamentos (Garrido, 2007).

Por otro lado, el ácido valérico es un alquil-carboxílico de cadena lineal que se encuentra en mayor concentración en las raíces de estas plantas. Este ácido se caracteriza por presentar propiedades espasmolíticas (Goldberg & Rokem, 2009). Además de estos principios activos las plantas de este género se caracterizan por desprender un desagradable aroma producido por la acción del ácido isovalérico (Şen & Mat, 2015)

Valeriana adscendens Turcz

Valeriana adscendens Turcz es una planta perteneciente a la familia Caprifoliaceae y al género Valeriana (Figura 1). Esta especie es utilizada en rituales terapéuticos tradicionales en comunidades rurales debido a su actividad psicoactiva que influye en la reducción significativa de la actividad locomotora. Además, esta especie se caracteriza por aumentar el sueño, debido a la inducción producida por el pentobarbital (Nadeem, y otros, 2018)

Figura 1

Valeriana adscendens Turcz



Nota. *Valeriana adscendens* Turcz. Parque Nacional Cayambe Coca, Sector “Virgen del Páramo-Papallacta”, 4251 m.s.n.m.

Distribución

Valeriana adscendens Turcz es una especie distribuida en zonas húmedas de pantanos y humedales. Estos bosques son poco comunes y se encuentran generalmente en zonas donde hay la presencia de suelos permanentemente húmedos. En el Ecuador se encuentra distribuida en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Pichincha, Tungurahua, Morona Santiago, Napo, Carchi, Cotopaxi, e Imbabura (Figura 2) a una altitud 2500 hasta los 4500 m s.n.m. (Romoleroux, Tandalla, & Erler, 2019).

Figura 2

Distribución de Valeriana adscendens Turcz en Ecuador



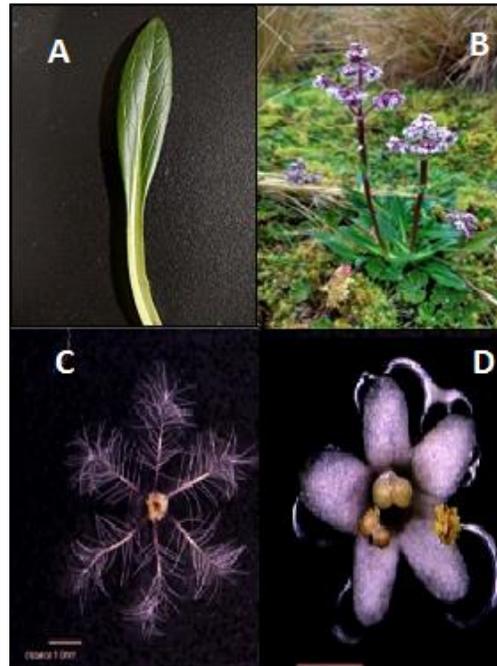
Nota. Distribución de Valeriana adscendens Turcz en 10 provincias del Ecuador. Azuay, Bolívar, Cañar, Pichincha, Tungurahua, Morona Santiago, Napo, Carchi, Cotopaxi, e Imbabura.

Descripción Morfológica

En la Figura 3 se puede observar la estructura morfológica de *Valeriana adscendens Turcz*, la cual es una hierba perenne aromática con raíz axonomorfa y hojas en forma de roseta basal con pecíolo ensanchado hacia la base y una lámina elíptica de 30-84 x 8-25 mm (Figura 3A). Las inflorescencias se encuentran en corimbos terminales dispuestos en un eje con 1-3 pares de hojas sésiles (Figura 3B). Las flores son ginodioicas, pentámeras y actinomórficas. El cáliz es una hoja membranosa de color verde (Figura 3C). La corola es glabra e infundiliforme de color blanco. El ovario es ínfero y tricarpelado y el fruto es aquenio elíptico con presencia de pappus (Figura 3D) (Romoleroux, Tandalla, & Erler, 2019) (Restrepo, 2020)

Figura 3

Estructura morfológica de Valeriana adscendens Turcz



Nota. A) Hoja. B) Inflorescencia. C) Flor. D) Fruto. Recuperado de Jiménez (2022).

Diversidad genética

La diversidad genética se refiere a la variedad y riqueza de genes presentes entre los individuos de una variedad o una población dentro de una especie. Esta diversidad es producto de la recombinación de material genético durante el proceso de herencia, las mutaciones, el flujo de genes y la deriva genética. Como resultado de estos procesos se producen diferencias en las secuencias de ADN, en los perfiles epigenéticos, en las estructuras de proteínas o isoenzimas, así como en las propiedades fisiológicas y morfológicas de los organismos (Saki, Bagheri, Deljou, & Zeinalabedin, 2016)

La variación genética de los individuos difiere entre las poblaciones debido a los diferentes factores sistemáticos que emergen entre las diferentes regiones, lo que favorece su supervivencia y reproducción. La diversidad genética se intensifica y acelera cuando el intercambio de genes entre

poblaciones es limitado. En el caso de las plantas, esto puede deberse a la restricción de semillas y polen causado por factores físicos o biológicos (El-Esawi, 2019).

En las plantas la diversidad genética permite que se adapten a diversas condiciones ambientales, como las condiciones del suelo y la fluctuación de temperatura. En las poblaciones de especies vegetales la diversidad en cultivares, en especies locales o individuos silvestres son un recurso importante a nivel agrícola, ya que permiten aumentar la producción de alimentos y desarrollar prácticas agroecológicas (Ohsawa & Ide, 2008)

Factores que afectan la diversidad genética

Los principales factores que afectan a la diversidad genética son las mutaciones, la selección natural, la deriva genética y el flujo de genes. Las selecciones naturales y artificiales juegan un papel importante al momento de elegir genotipos informativos, ya que pueden afectar la frecuencia génica (Shriver, 2008). A continuación, se detallan todos estos factores:

- **Mutaciones:** Las mutaciones son una gran fuente de variación genética entre las especies, lo que es fundamental en la evolución biológica. Una mutación se produce como resultado de sustituciones, inserciones o deleciones en las secuencias de ADN produciendo cambios en la composición de la secuencia genómica. Estos cambios pueden tener consecuencias positivas, negativas o neutras en las características de las plantas (Lu, y otros, 2021)
- **Selección natural:** La selección natural desempeña un papel fundamental en la divergencia genética y fenotípica entre las especies. La expresión de las características depende de los componentes hereditarios y de la interacción del individuo con el ambiente. En las plantas, la selección del mejor genotipo depende de la variación genética en la población (DiVittorio, Singhal, & Roddy, 2020)
- **Deriva genética:** La deriva genética es un proceso mediante el cual se producen desviaciones en las frecuencias alélicas en poblaciones pequeñas a lo largo del tiempo. Este factor es el

resultado de errores de muestreo durante generaciones. El error de muestreo afecta las frecuencias alélicas de forma fortuita, lo que provoca el cambio de la diversidad a lo largo de las generaciones (Song, Wang, Yang, Zhang, & Liu, 2023)

- **Flujo de genes:** El flujo de genes se refiere al desplazamiento de genes de una especie o población a otra. Este proceso se produce en las plantas por dispersión de polen y semillas o por materiales de propagación vegetativo como rizomas. La tasa de migración puede variar según los ciclos de reproducción y la capacidad de dispersión de las semillas y el polen (Sorof Uddin & Cheng, 2015)

Importancia de la diversidad genética en la conservación

La diversidad contribuye a la adaptación de los organismos frente a perturbaciones causadas por los cambios ambientales. Una mayor diversidad genética permite que las especies sobrevivan a largo plazo bajo diferentes condiciones climáticas. La conservación tiene como objetivo preservar la diversidad genética actual y todos aquellos procesos de diversificación que se desarrollan a nivel de las especies (Bobo, Salmerón, Mota, & Peñas). La sustentabilidad de los ecosistemas en los páramos y bosques andinos se fundamenta en mantener un flujo de genes diversos y saludables entre los organismos que los constituyen (Gutiérrez , Ipinza , & Barros , 2015)

La conservación del acervo genético en plantas es un proceso crucial para mantener la biodiversidad y la supervivencia de las especies. Este acervo genético se refiere al conjunto de genes que cada especie presenta en su genoma y son los responsables de determinar sus características morfológicas como sus adaptaciones únicas (Maxted, Hunter, & Ríos, 2020). En especies silvestres la conservación de la diversidad genética contribuye a identificar aquellas especies que presentan genes de relevancia para el ser humano. El estudio de la diversidad permite establecer aquellas especies vegetales que presentan resistencia a patógenos, plagas y contaminantes ambientales (Gutiérrez , Ipinza , & Barros , 2015)

La evaluación de la diversidad genética se ha vuelto un estudio de gran relevancia y conciso con la aplicación de herramientas fundamentales, como el uso de marcadores morfológicos, bioquímicos, fitoquímicos y los basados en ADN. Actualmente, estas técnicas tienen un gran potencial en la determinación de la diversidad genética y por ende en su conservación. Además, varias de estas tecnologías ya han sido empleadas en muchas especies de plantas incluidas plantas de ecosistemas de páramos y bosques andinos (Karp, 1997)

Técnicas Moleculares

La pérdida de especies vegetales en los últimos años ha impactado tanto a nivel ambiental como socioeconómico. Esta problemática ha llevado a desarrollar estudios donde se busca caracterizar y conservar estas especies. Las herramientas moleculares desarrolladas han proporcionado alternativas fáciles y eficaces para determinar taxones tanto de plantas conocidas como desconocidas (Ibrahim *et al.*, 2010). La biología molecular juega un papel importante en varios aspectos de la conservación. La información que proporciona este tipo de investigaciones permite caracterizar la diversidad genética de las plantas con el fin de optimizar su mantenimiento y uso (Karp, 1997)

El descubrimiento del ADN como portador de la información genética de los organismos impulsó el desarrollo de técnicas innovadoras como la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Esta es una de las primeras técnicas moleculares utilizadas para caracterizar especies mediante marcadores moleculares.

Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son técnicas empleadas para caracterizar la variabilidad genética. Un marcador molecular se puede definir como una secuencia de nucleótidos de ADN que difiere entre organismos o individuos. Estas secuencias pueden estar vinculadas a un gen objetivo que expresa un rasgo en particular. La ubicación del marcador dentro del genoma es conocida, por lo cual se puede

monitorear su herencia y no están sujetos a la influencia del medio ambiente (Amiteye, 2021) (Dairawan & Shetty, 2020)

Los marcadores indican las diferencias que pueden tener los genotipos entre las especies. Estas diferencias se las denomina polimorfismos y son variantes de una secuencia específica de ADN (Li, Zheng, & Huang, 2020). Los polimorfismos en los organismos son causados generalmente por mutaciones puntuales que se originan por sustituciones de un solo nucleótido, por reordenamiento que pueden ser inserción, por eliminación, por duplicación, por translocación o por inversión en las secciones de ADN (Amiteye, 2021)

Para que un marcador molecular sea considerado como informativo debe ser ubicuo y encontrarse distribuido uniformemente por todo el genoma. Además, puede caracterizarse como altamente polimórfico y co-dominante en su expresión para permitir una discriminación efectiva entre individuos homocigóticos y heterocigotos. En el laboratorio estas secuencias deben ser reproducibles, rentables, multiplexado y tener la posibilidad de ser automatizado (Rocha, 2003)

Los marcadores moleculares se clasifican en varios grupos considerando los siguientes tres aspectos (Azofeifa, 2006)

1. Modo de acción del gen: Marcadores codominante o dominante.
2. Método de detección: Hibridación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o marcadores moleculares dependientes de la secuencia de ADN.
3. Modo de transmisión: Herencia materna o paterna, herencia nuclear biparental o herencia nuclear materna.

Los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son de gran interés para los investigadores, debido a que proporcionan información sobre la diversidad genética de los individuos. En las investigaciones, estos marcadores se amplifican a partir de secuencias o locus de ADN específicas de forma *in vitro*, con la ayuda de secuencias de oligonucleótidos (cebadores) elegidos de

forma específica y de enzimas como Taq polimerasa que cataliza la reacción (De Riek, Calsyn, Everaert, & Van Bocksta, 2001)

Repetición de secuencia inter simple (ISSRs)

Las secuencias simples repetidas o ISSR por sus siglas en inglés son un tipo de marcador molecular que presenta secciones genómicas rodeadas por secuencias repetidas simples o secuencias de microsatélites. Estas secuencias de microsatélites son regiones que están conformadas por pequeños fragmentos de ADN, generalmente de tamaño di, tri, tetra o penta-nucleótidos (Amiteye, 2021) Los ISSRs se distribuyen aleatoriamente por todo el genoma por lo que permite medir los niveles de variación de las regiones de secuencias de microsatélites (Male, Kato, & Mukankusi, 2018)

Estos marcadores se amplifican mediante el método de ISSR-PCR, el cual fue desarrollado por Zietkiewicz en 1994. Este método es una técnica de identificación de ADN y consiste en la amplificación de secuencias entre repeticiones de dinucleótidos utilizando cebadores homólogos en el extremo 3' o 5' por dos nucleótidos para evitar el cebado interno (Vendrell et al., 2005). Generalmente esta técnica utiliza cebadores con longitud de 15 a 30 pb. Los productos de amplificación de estos marcadores tienen un rango de 200 a 2000 pb y se pueden visualizar en geles de agarosa o poliacrilamida. Esta información permite registrar la presencia o ausencia de una banda de un tamaño determinado (Kamaluddin, y otros, 2017)

Los marcadores ISSR son productos de las leyes mendelianas de herencia, por lo cual son marcadores dominantes altamente polimórficos. Además, son utilizados en estudios sobre diversidad genética, filogenia, etiquetado de genes, mapeo del genoma y biología evolutiva. Debido a que los ISSRs pueden ser regiones conservadas o no conservadas no se pueden emplear para diferenciar individuos, sino para análisis filogeográficos o para delimitar especies (Minas,, McEwan, Newbold, & Scott, 2011)

Marcadores moleculares cloroplásticos

Actualmente, se ha propuesto emplear métodos enfocados en analizar los cloroplastos de las muestras con el fin de diferenciar especies u organismos estrechamente relacionados en una población. Los cloroplastos son organelos de ADN circular de doble cadena. En varias especies de plantas el genoma del cloroplasto se hereda por vía materna a excepción de ciertas plantas gimnospermas en las que se hereda por vía paterna (Lowe, Hanotte, & Guarino, 1996). El genoma cloroplastídicas presenta longitudes aproximadamente de 130 genes con una longitud que van desde los 100 a 220 kb. Los cloroplastos son esenciales en la fotosíntesis y en otros procesos como la transcripción, la traducción, el metabolismo del carbono, la síntesis de ácidos grasos y la proteólisis (Pinos, Morales, & Durán, 2021)

Además, el genoma de los cloroplastos presenta una evolución lenta en comparación con los genomas nucleares, por lo cual las secuencias cloroplastídicas se han utilizado frecuentemente en estudios filogenéticos e identificación de especies. Al tener una herencia materna en algunas especies, los cloroplastos también son utilizados como indicadores de la descendencia materna (Zargar, Farhat, Mahajan, Bhakhri, & Sharma, 2016)

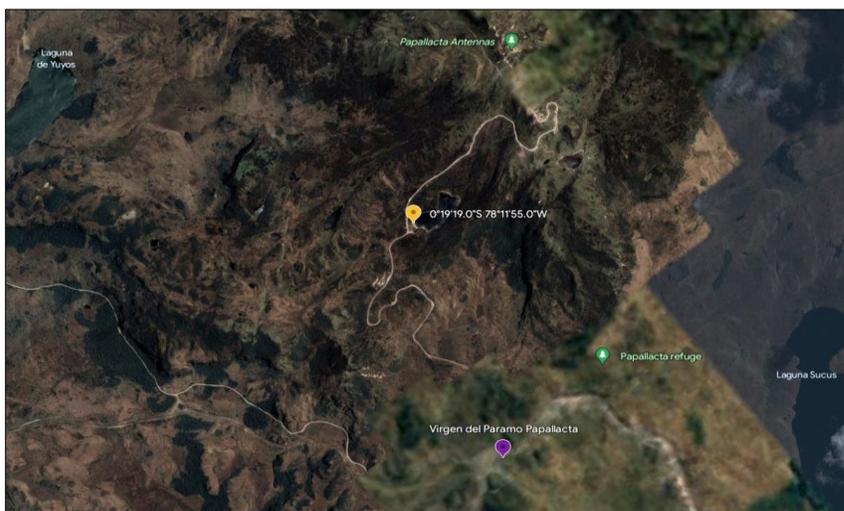
Capítulo III: Materiales y Métodos

Zona de Estudio

El presente estudio se llevó a cabo con muestras recolectadas en el Parque Nacional Cayambe-Coca en la provincia de Pichincha en el sector denominado "Virgen del Páramo-Papallacta" ($0^{\circ}19'19.0''S$ $78^{\circ}11'55.0''W$). En la Figura 4 se presenta la ubicación geográfica de la especie *Valeriana adscendens* Turcz en el sector de "La Virgen", vía a Papallacta.

Figura 4

Ubicación geográfica de la especie *Valeriana adscendens* Turcz

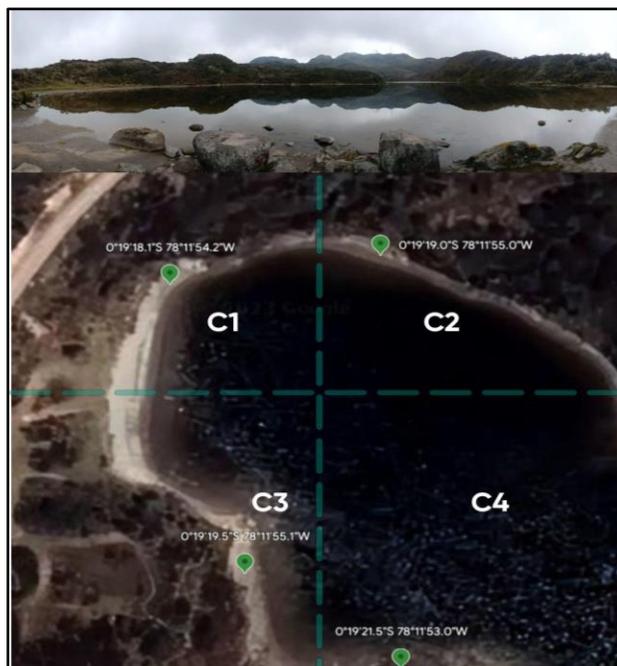


Nota. Ubicación geográfica de la de la especie *Valeriana adscendens* Turcz (amarillo). Parque Nacional Cayambe Coca.

La zona de estudio fue dividida en 4 cuadrantes para facilitar el muestreo y la distribución de las plantas para su análisis al azar. En la Figura 5 se observa los cuatro cuadrantes de muestreo realizados para este ensayo.

Figura 5

Distribución y coordenadas de los cuadrantes de muestreo



Nota. Coordenadas de los cuadrantes en sector de la “Virgen del Páramo-Papallacta”. Parque Nacional Cayambe-Coca.

Recolección de muestras vegetales

El material vegetal fue recolectado durante los meses de abril del 2023 a junio del 2023. Las plantas empleadas para el muestreo fueron escogidas al azar en toda la población de los cuatro cuadrantes. Se seleccionaron 4 individuos por cada sección, procurando que existiera una separación de aproximadamente dos metros por cada planta. En la Tabla 1 se observan las coordenadas de los 4 cuadrantes y el número de muestras tomadas por cada uno de ellos.

Tabla 1*Coordenadas y número de muestras recolectadas por cuadrante*

Cuadrante	Coordenadas	Número de muestras colectadas
C1	0°19'18.1"S 78°11'54.2"W	4
C2	0°19'19.0"S 78°11'55"W	4
C3	0°19'19.5"S 78°11'55.1"W	4
C4	0°19'21.5"S 78°11'53"W	4
Total, de muestras colectadas		16

Se colectaron hojas juveniles de tamaño uniforme y sin la presencia de heridas o patógenos, debido a que este material brinda los mejores resultados en cuanto a cantidad y calidad de ADN extraído. Se recolectaron en total 16 muestras correspondientes a 16 individuos.

En el campo se realizó la desinfección de las hojas rociando etanol al 70% a la muestra. A continuación, se dejó secar a temperatura ambiente el material recolectado sobre papel absorbente durante 5 min. Las hojas desinfectadas se guardaron en una bolsa de papel sellada con cinta making. Las fundas de papel fueron colocadas en fundas ziploc con 50 g de silica gel para su secado. Las plantas muestreadas se fotografiaron con la aplicación Timestamp Camera Free versión 2022, la cual proporcionó datos como hora, fecha, latitud y coordenadas. Estos datos fueron utilizados para realizar un registro fotográfico.

Conservación de muestras y procesamiento

El análisis del material vegetal recolectado se realizó en el Laboratorio de Biología Vegetal de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sede Matriz, ubicada en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui.

La sílice gel de cada funda fue cambiada durante una semana hasta secar el tejido. Una vez que las muestras fueron secadas se procedió a realizar una segunda desinfección de las hojas con etanol al 70 % en una cabina de seguridad. Después de la desinfección, el material fue transferido a tubos Falcon™ de 50 mL y finalmente fueron almacenadas a -20 °C (en caso de que la muestra fuera utilizada inmediatamente para extraer ADN) o -80 °C (si la muestra iba a ser almacenada por más tiempo).

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con varios protocolos descritos en bibliografía para muestras foliares que contienen altas concentraciones de metabolitos secundarios. Se utilizó el protocolo de Chabi y colaboradores (2015) basado en el detergente SDS y el protocolo de Semagn (2013) basado en el detergente CTAB. A continuación, se detalla el protocolo de Semagn que permitió obtener mayor cantidad y calidad de ADN.

Protocolo de extracción de ADN de Semagn (2013)

Este protocolo es un procedimiento para el aislamiento de ADN a partir de material foliar seco, el cual fue previamente estandarizado por Semagn (2013). Este método se basa en la técnica de Doyle y Doyle de 1987, la cual es una técnica ampliamente empleada en la extracción de ADN vegetal de diversas especies. El material vegetal (110-120 mg de tejido seco), fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el cual fue transferido a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Se añadió 600 µl de buffer de extracción (Tris HCl 0.20 M pH 7.5; NaCl 2 M, EDTA 0.05 M pH 8; CTAB 2%, 2b-mercaptoetanol 1%) previamente calentado a 65°C para macerar la muestra en el tubo eppendorf. A continuación, se llevó a incubar los tubos en el baño de agua María a 65°C durante 60 minutos, con una inversión suave cada 10 minutos.

Terminada la lisis, los tubos se retiraron del baño y se dejaron enfriar durante 10 minutos, después, se procedió a centrifugar las muestras a 10000 rpm por 10 minutos. Con la ayuda de una

micropipeta se transfirió la fase acuosa obtenida después de la centrifugación a un nuevo tubo. A esta fase acuosa se añadió 500 μL de cloroformo alcohol isoamílico CIA (24:1), luego se mezcló el tubo suavemente por inversión (50 veces) y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos (este paso se repitió una segunda vez). La fase acuosa obtenida de esta separación de fases se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL.

Posteriormente, se agregó 600 μL de isopropanol frío (almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), a continuación, se trasladó los tubos a un congelador a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos. Luego se retiraron los tubos del congelador y se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Después se procedió a invertir suavemente los tubos hasta que se evidenció la presencia de un material blanquecino en los tubos. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos.

Finalmente, el sobrenadante se descartó y el pellet fue lavado con 600 μL de etanol frío al 70% durante 20 segundos, seguidamente los tubos se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos (este paso se repitió una segunda vez). Se secó durante 60 minutos y se re suspendió con 50 μL de TE al 0,1 X y 3 μL de RNase A (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se procedió a incubar los tubos durante 2 horas en baño de agua a 37°C con inversión suave (50 veces) cada 10 minutos. Las muestras fueron almacenadas a -20°C .

Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar la presencia del producto de interés, en este caso el ADN, se elaboró un gel de agarosa al 1.5%. Se pesó 3.75 g de agarosa en polvo y se disolvió en 210 mL de TBE 1 X mediante agitación magnética por 30 minutos, para permitir que el polímero se hidrate. Esta mezcla se calentó varias veces en el microondas hasta que tomó una apariencia totalmente traslúcida. A continuación, se dejó enfriar la solución hasta que alcanzó una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos, una vez alcanzada la temperatura necesaria se agregó 0.035 μL de SYBR™ Safe DNA Gel Stain Invitrogen™ por cada mL de TBE

y se agitó por 5 min. Una vez lista la solución, se dispensó en el molde previamente preparado con el peine para que se formen los pocillos.

En el gel solidificado se retiró el peine y se colocó en la cámara de electroforesis. Se cubrió el gel con tampón TBE 1X y se procedió a cargar las muestras en cada uno de los pocillos. En cada pocillo se colocó 4 μ L de ADN y 2 μ L de BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X), colocando un volumen final de 6 μ L en cada pocillo, además se cargó 4 μ L del marcador Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp DNA Ladder. La electroforesis se corrió durante 1 hora con 15 minutos a 110 V y 300 mA. Terminada la corrida se visualizó el gel con el fotodocumentador y transiluminador BIOSTEP, FELIX 1040.

Cuantificación de ADN

Para determinar la concentración y la pureza del ADN obtenido, se usó el espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific Multiskan SkyHigh y el software SkanIt Software 6.1.1 RE for Microplate Readers RE, ver. 6.1.1.7. Primero, se seleccionó la opción de medición de ácidos nucleicos y se etiquetó los pocillos que fueron utilizados. A continuación, se limpió la placa de 32 pocillos, colocando 2 μ L de HCL 1N y agua destilada este proceso se repitió dos veces al inicio de las mediciones y al finalizar la evaluación.

Al finalizar la limpieza del equipo se procedió a colocar 2 μ L del blanco en el primer pocillo, que en este caso fue agua DEPC. Posteriormente, se fue agregando 2 μ L de cada muestra ADN. Terminado este proceso se llevó la placa al Multiskan SkyHigh donde se cuantificó los parámetros de concentración de ADN en ng/ μ L y pureza en relación con la absorbancia de 260/280 y 260/230.

Amplificación de secuencias mediante marcadores moleculares

Marcador molecular cloroplástico tRNA-Gly (trnG)

Se diseñaron dos cebadores (forward y reverse) para la región del intrón cloroplástico del gen tRNA-Gly. La secuencia se obtuvo de la base de datos GenBank: HQ878191.1 del National Library of

Medicine (NCBI). El diseño se realizó en el programa Primer3 (v. 0.4.0), donde se seleccionó los cebadores forward y reverse que cumplieron con los siguientes criterios:

- **Longitud:** 18 a 24 nucleótidos
- **Temperatura de melting:** 50-60°C
- **Contenido de guanina y citosina:** 40-60 %
- **Autocomplementariedad :** Valores menores a 3
- **Autocomplementariedad en 3':** Valores menores a 3

En la Tabla 2 se muestran los cebadores seleccionados y sus criterios. Adicionalmente se realizó una PCR *in silico* en el programa FastPCR 6.7.50 para determinar el tamaño del amplicón esperado.

Tabla 2

Cebador forward y reverse diseñados para el gen tRNA-Gly de Valeriana adscendens Turcz

Cebador	Tm	GC%	any_th	3'_th	Secuencia
Forward	58.21	40.91	0	0	ACTGCTGAACTACAAACTTCGT
Reverse	58.35	39.13	0	0	ACCTTGATGACACAAATAACGA

Nota. Cebadores forward y reverse diseñador en el programa Primer3 (v. 0.4.0). Tm: temperatura de melting, GC%: contenido de guanina y citosina, any th: Autocomplementariedad, 3'_th: Autocomplementariedad 3'.

Reactivos y condiciones de amplificación

Las concentraciones finales y volumen de amplificación (Tabla 3), se basaron en el protocolo para marcadores moleculares descrito por Bell y colaboradores (2012). Se emplearon reactivos marca Applied Biological Materials Inc. (amb) y se realizó el ensamblaje en una cámara de bioseguridad tipo II

CBS 120. Las reacciones de PCR se ejecutaron en el termociclador TECHNE-TC-512. El volumen final de reacción fue de 25 μL .

Tabla 3

Concentraciones de los reactivos para la amplificación con el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG)

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen final(μL)
Agua DEPC	-	-	12
Buffer	10	1	2,5
dNTPs (μM)	10	0,2	0,5
MgSO ₄ (mM)	25	1,8	1,8
Primer Forward (μM)	10	0,8	2
Primer Reverse (μM)	10	0,8	2
Taq Polimerasa U/ μL	5	1	0,2
ADN ng/ μL	-	20	4
Volumen total (μL)			25

Nota. Cálculos para la preparación del Master Mix.

Las condiciones de amplificación de tiempo y temperatura para cada fase se detallan en la Tabla 4, este protocolo se tomó de la investigación de Bell y colaboradores (2012).

Tabla 4

Condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) utilizados para el marcador cloroplástico tRNA-Gly

Fases	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	1.5	
Alineamiento	*	2	35

Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	1

Nota. * La temperatura de alineamiento se calculó de acuerdo con el diseño de los primers.

La temperatura óptima de alineamiento se utilizó la calculadora NEB Tm Calculator, versión 1.16.5, desarrollada por New England BioLabs Inc. En este software se introdujo la secuencia de los cebadores (forward y reverse) y las condiciones de PCR. Adicionalmente, se consideró la temperatura probada en los estudios realizados por Bell y colaboradores (2012), donde se diseñaron cebadores para esta misma región y se efectuaron ensayos a temperaturas de 49 y 50 °C.

Se realizaron ensayos con la concentración de ADN. Se probaron tres concentraciones de ADN las cuales fueron 10, 20, 25 ng/μL. Una vez obtenidas las condiciones de amplificación estandarizadas se procedió a realizar la amplificación para las 16 muestras y un control negativo.

Marcadores moleculares ISSRs

El proceso de amplificación se realizó con dos marcadores ISSRs (Tabla 5), los cuales fueron utilizados por Jugran y colaboradores (2013) en estudios en *Valeriana jatamansi* Jones. El proceso de amplificación se aplicó a 16 muestras con dos controles (positivo y negativo). El control positivo correspondió a una muestra de *Polylepis incana*, tomada de la investigación de Vargas (2021).

Tabla 5

Cebadores utilizados en Valeriana jatamansi Jones

Nombre del cebador	Secuencia 5' a 3'	Longitud (pb)
17898 ^a	CACACACACACAAC	14
17898B	CACACACACACAGT	14

Nota. ISSRs utilizados para la caracterización de *Valeriana adscendens* Turz con sus respectivas secuencias 5' a 3' y longitud.

Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como las concentraciones de reactivos utilizados se describen a continuación:

Reactivos y condiciones de amplificación

Las concentraciones finales y volumen de amplificación (Tabla 6), se basaron en el protocolo para marcadores ISSRs descrito por Vargas (2021). Se emplearon reactivos marca *Applied Biological Materials Inc. (amb)* y se realizó el ensamblaje en una cámara de bioseguridad tipo II CBS 120, mientras que las reacciones de PCR se ejecutaron en el termociclador ESCO-SWT-MXB-1. El volumen final de reacción fue de 25 μ L.

Tabla 6

Concentraciones de los reactivos para la amplificación de ISSRs en muestras de Valeriana adscendens Turcz

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen final(μ L)
Agua DEPC	-	-	14
Buffer	10	1	2,5
dNTPs (μ M)	10	0,2	0,5
MgSO ₄ (mM)	25	1,8	1,8
Primer (μ M)	10	0,8	2
Taq Polimerasa U/ μ L	5	1	0,2
ADN ng/ μ L	-	20	4
Volumen total (μl)			25

Nota. Cálculos para la preparación del Master Mix. Recuperado de Vargas (2021).

Las condiciones de amplificación de tiempo y temperatura para cada fase se detallan en la Tabla 7, este protocolo se tomó de la investigación de Vargas (2021).

Tabla 7

Condiciones de amplificación (temperatura y tiempo) utilizados con los cebadores ISSRs con muestras de Valeriana adscendens Turcz

Fases	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	0.5	
Alineamiento	*	0.75	40
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	1

Nota. * La temperatura de alineamiento cambia con cada cebador. Recuperado de Vargas (2021).

La temperatura de alineamiento se mantuvo de acuerdo al protocolo establecido por Vargas (2021) y se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8

Temperaturas de alineamiento para los marcadores ISSRs

Cebador	Temperatura (°C)
17898A	40.4
17898B	45.4

Nota. Temperaturas de alineamiento para cada cebador ISSR. Recuperado de Vargas (2021).

Visualización de productos de amplificación

El análisis de los productos de amplificación se realizó en geles de agarosa al 1.5% con tampón TBE 1X. Para determinar el tamaño de cada una de las bandas amplificadas se colocó 4 μ L del marcador Invitrogen™ TrackIt™ 100 pb Plus DNA Ladder. La electroforesis se corrió a 110 V y 300 mA. por 1 hora con 30 minutos. La corrida se visualizó en un gel de agarosa con ayuda del fotodocumentador y transiluminador BIOSTEP, FELIX 1040.

Registro de datos

El tamaño de cada banda en pares de bases se determinó mediante el programa Gel Analyzer 19.1, para ello se seleccionó las opciones *bands mode* y *MW calibration mode*. Los datos obtenidos con los marcadores ISSRs se registraron en una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) para cada banda. La matriz fue adaptada de acuerdo con los requerimientos de los programas estadísticos utilizados para su posterior análisis.

Por otro lado, para el marcador cloroplástico se determinó la presencia o ausencia de la banda en el gel. Los datos obtenidos se registraron en una hoja de Excel, donde se detalló la presencia o ausencia de la banda dependiendo del sitio de muestreo. Esta base de datos se utilizó para el posterior análisis en el software estadístico InfoStat.

Marcador molecular cloroplástico trnG

Se realizó una PCR *in silico* con el programa FastPCR 6.8.62 para determinar la longitud del amplicón. Además, se evaluó la eficacia de los cebadores diseñados aplicando un diseño estadístico completamente al azar (DECA). El factor evaluado fue Amplificación de banda por cuadrante (A), con dos niveles denotados como 1= Presencia de banda y 0= Ausencia de banda. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA y la prueba de Duncan a un nivel de significancia (α) del 0.05.

Para verificar que la secuencia obtenida en la PCR *in silico* corresponde a *Valeriana adscendens* Turz, se realizó una comparación de secuencias en la base de datos de ADN (Gen Bank) mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Se evaluó el Query cover, el E-value y el porcentaje de identidad para aquellas alineaciones de secuencias significativas.

Marcadores moleculares ISSRs

Para determinar el grado de información que brindan los marcadores ISSRs se utilizó la calculadora Marker Efficiency Calculator (iMEC). En este programa se determinó los parámetros de: contenido de información polimórfica (PIC), índice del marcador (IM), poder de resolución (R) y poder de discriminación (D).

Además, los datos obtenidos a partir de la matriz binaria se utilizaron para generar una matriz a partir del coeficiente de similitud de Jaccard y un agrupamiento mediante el método "*Neighbor Joining*". Se utilizó el programa Darwin v 6.0.2.1 para construir la matriz de similitud. Este cálculo se realizó mediante la opción *disimilarity*, a continuación, se seleccionó la opción *calculate for single data*. Además, a partir de la matriz obtenida se efectuó un análisis de Coordenadas Principales mediante la opción *factorial analysis*. Finalmente se construyó un dendrograma con el método "*Neighbor Joining*" y la opción *Tree construction*.

Capítulo IV: Resultados

Muestreo, recolección y conservación de las muestras

Las muestras de *Valeriana adscendens* Turcz se recolectaron en el sector de la Virgen de Papallacta situado en el Parque Nacional Cayambe-Coca. Se recolectaron 4 muestras foliares de la planta por cada cuadrante, en total 16 muestras. El protocolo empleado tanto para la recolección como para la preservación del tejido vegetal es el descrito por Di Sacco y colaboradores (2020) con ciertas modificaciones. Las muestras fueron secadas durante mayor tiempo, modificando el tiempo de secado de 3 a 7 días con el fin de mejorar la preservación. Al final de los 7 días, las muestras no presentaron necrosamiento permaneciendo sin evidencia de oxidación o quemadura (Figura 6). Por lo tanto, este protocolo es óptimo para preservar muestras foliares de *Valeriana adscendens* Turcz ya que mantiene en un buen estado a la hoja.

Figura 6

Hojas de Valeriana adscendens Turcz



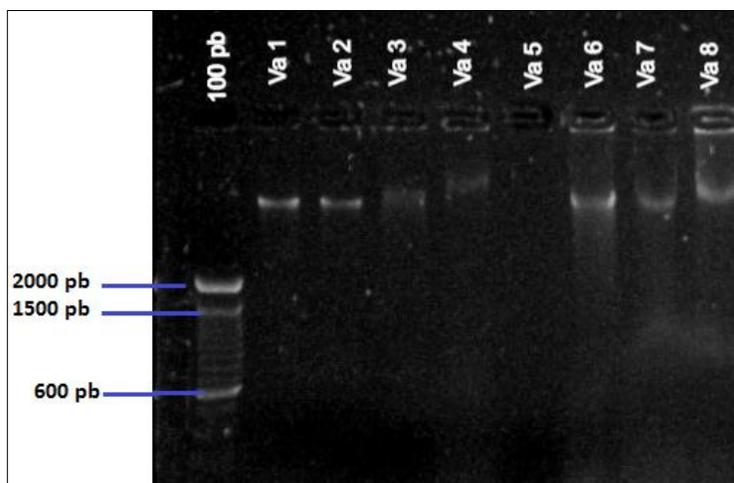
Nota. A) Muestra foliar seca con silica después de 48 horas. B) Muestra foliar en estado natural.

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN de *Valeriana adscendens* Turcz se realizó en muestras de tejido foliar secas. Se empleó el método de extracción descrito por Semagn (2013), donde se utilizó el detergente CTAB al 2%. En la figura 7 se observa el resultado obtenido con este protocolo.

Figura 7

Electroforesis en gel de agarosa del ADN de Valeriana adscendens Turcz obtenida con el método de Semagn (2013)

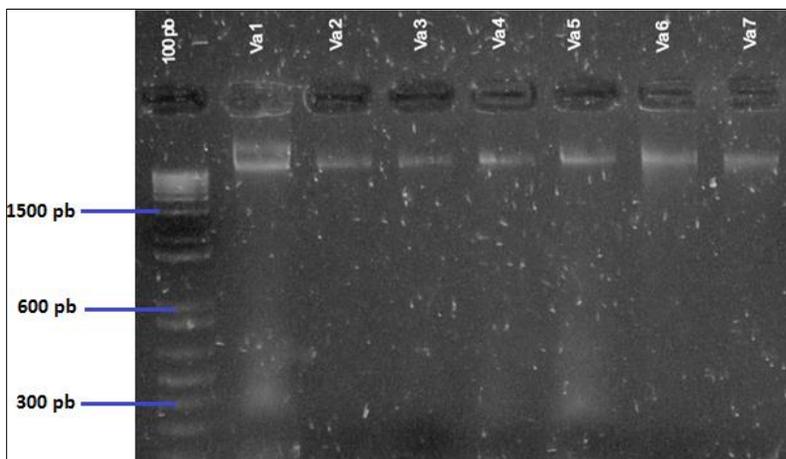


Nota. En la figura se observa el ADN de 8 muestras de *Valeriana adscendens* Turz en un gel de agarosa al 1% y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder).

En la Figura 7 se observa que únicamente las muestras Va1 y Va2 presentaron una buena calidad, el resto presentó degradación y presencia de ARN. Por tal razón, se procedió a modificar el protocolo de extracción, centrifugando la muestra por 10 minutos a una velocidad de 10 000 rpm. La modificación efectuada permitió obtener bandas visibles y con poca degradación del material genético (Figura 8).

Figura 8

Electroforesis en gel de agarosa del ADN de Valeriana adscendens Turcz obtenidas con el método de Semagn (2013) modificado



Nota. ADN para 7 individuos de *Valeriana adscendens* Turz en un gel de agarosa al 1% y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder).

En la Figura 8 se observa que las muestras presentaron una buena integridad y calidad de ADN. A partir de esto se procedió a valorar la concentración y la pureza del ADN. La concentración de ADN promedio fue de 959.81 ng/ μ L con un rango de 635 a 1635 ng/ μ L. En relación con la pureza se obtuvo un índice promedio de 1.64 para la absorbancia de 260/280, mientras que para la absorbancia de 260/230 se obtuvo un promedio de 0.62, lo que indica una cantidad aceptable.

Amplificación con el marcador molecular cloroplástico trnG (trnG)

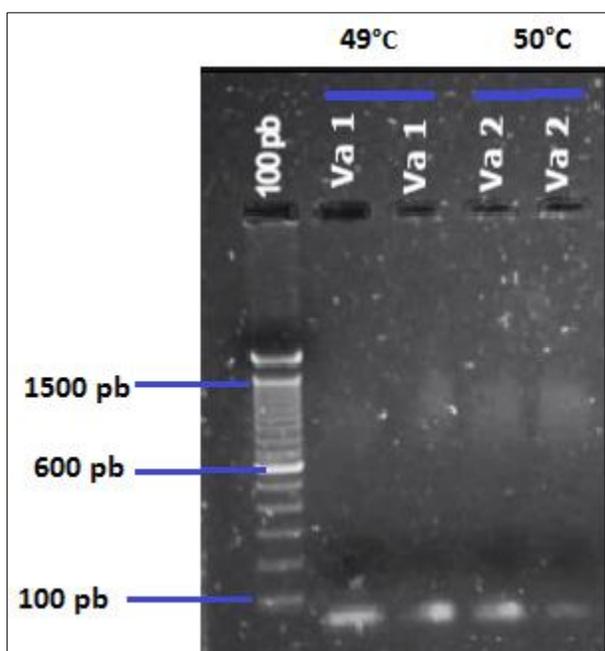
La amplificación del marcador molecular trnG se basó en condiciones estándares descritas en estudios de Bell et al (2012) y Li et al (2020) donde también emplearon marcadores diseñados en base al genoma del cloroplasto. Sin embargo, para este estudio se evaluó el efecto de diferentes temperaturas y concentraciones de ADN para determinar las concentraciones óptimas.

Estandarización de la temperatura de alineamiento y concentración de ADN

En los ensayos de estandarización se evaluó diferentes temperaturas (49°C y 50 °C) y diferentes concentraciones de ADN (10, 20, 25 ng/μL). En la Figura 9, se observa la amplificación de ADN en las diferentes condiciones ensayadas.

Figura 9

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



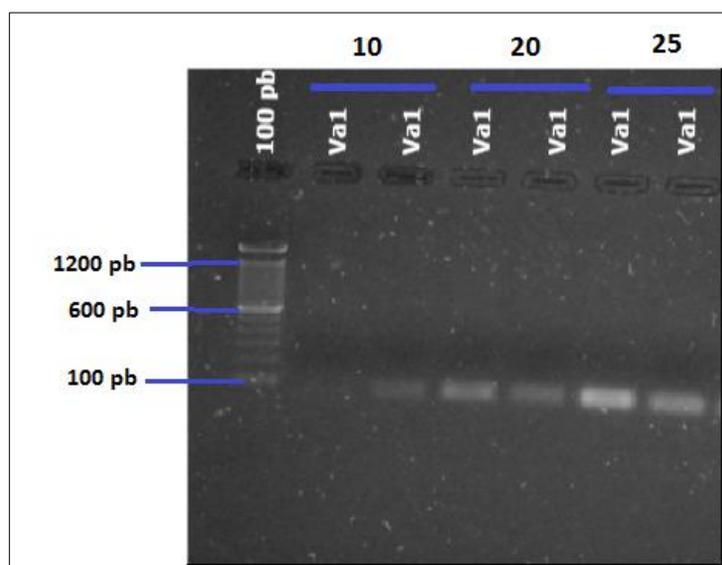
Nota. Gel de agarosa al 1.5 % y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder). Se utilizó ADN de los individuos Va5 y Va6 con dos repeticiones para cada temperatura probada (49 y 50 °C).

En la Figura se puede observar que a la temperatura de 50 °C las bandas pierden nitidez mientras, que al mantener la temperatura de 49 °C las bandas se mantienen visibles. Según, estos resultados la mejor temperatura para amplificar este marcador es la de 49 °C.

En relación a la concentración del ADN, en la Figura 10 se observa los resultados de la amplificación del marcador *trnG* a diferentes concentraciones de ADN.

Figura 10

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



Nota. Gel de agarosa al 1.5 % y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder). Se utilizó ADN de los individuos Va5 y Va6, Va7 con dos repeticiones para cada concentración de ADN (10, 20 ,25 ng/μL).

En esta Figura se evidencia que a la concentración de 25 ng/μL se observan bandas visibles más definidas, mientras que a concentraciones de 20 y 10 ng/μL las bandas se van perdiendo. Por lo que se continuó trabajando a la concentración de 25 ng/μL en el resto de los ensayos.

PCR *in silico* de la secuencia tRNA-Gly (*trnG*)

Antes de realizar la amplificación con el marcador tRNA-Gly (*trnG*), se realizó una PCR *in silico* para determinar el tamaño del producto de amplificación y la eficacia de los cebadores diseñados para esta región (Figura 11).

Figura 11

PCR *in silico* con los cebadores diseñados para tRNA-Gly (trnG)

```

In silico Primer(s) search for: hg878191.1 valeriana adscendens voucher bell, #ec006 (yu) trna-gly (trng) gene, intron: chloroplast
f 5'-actgctgaactacaaaacttcgt
Position: 19->40 22bp 100% Tm = 54,4°C
5-actgctgaactacaaaacttcgt->
|||||
tatgacgacttgatggttgaagcaagta
r 5'-acottggatgacacaaataacga
Position: 102<-124 23bp 100% Tm = 54,2°C
<-agcaataaacacagtaggtcca-5
|||||
tctcgttatttctgcatccaagggtgac

f 5'-actgctgaactacaaaacttcgt
r 5'-acottggatgacacaaataacga
PCR product size: 106bp

```

En esta Figura se puede observar que luego de realizar la PCR *in silico* obtuvo un producto de amplificación de 106 pb. Con el objetivo de determinar que la secuencia obtenida en la amplificación es parte del genoma de *Valeriana adscendens* Turcz se realizó un Nucleótido Blast (Figura 12).

Figura 12

Nucleotide Blast para la secuencia obtenida en la PCR *in silico*

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 2 sequences selected		Download Select columns Show 100						
		GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Valeriana adscendens voucher Bell, #EC006 (YU) tRNA-Gly (trnG) gene, intron: chloroplast	Valeriana adscendens	198	198	100%	1e-46	100.00%	584	HQ878191.1
<input checked="" type="checkbox"/> Valeriana secunda voucher Bell # EC015 (YU) tRNA-Gly (trnG) gene, intron: chloroplast	Valeriana secunda	191	191	99%	2e-44	99.06%	588	HQ878282.1

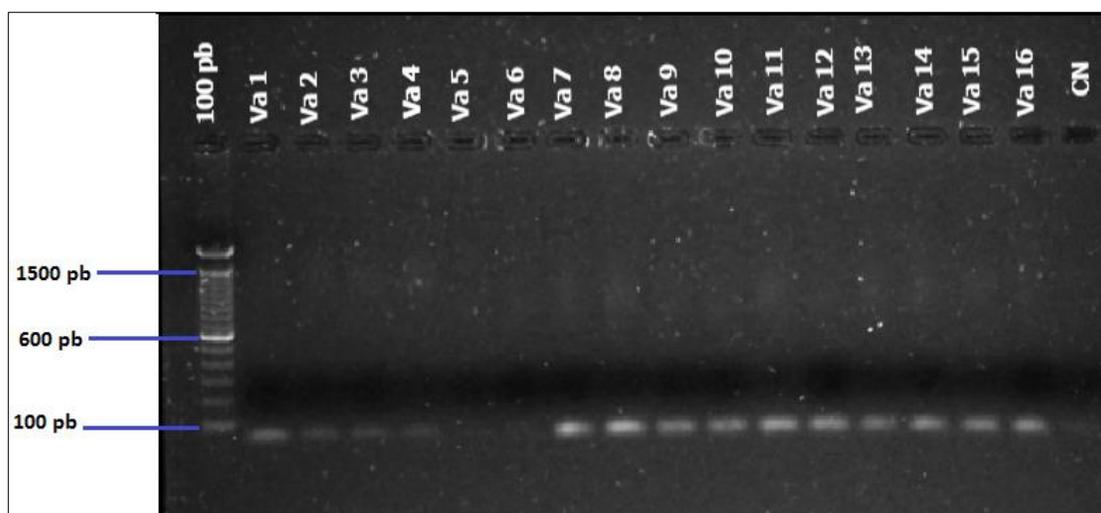
En el Nucleotide Blast se determinó dos secuencias que presentaron un alineamiento significativo. La primera correspondiente a *Valeriana adscendens* Turcz con un Query cover del 100%, un E-value 1×10^{-46} y un porcentaje de identidad del 100%. La segunda secuencia identificada para *Valeriana secunda* con un Query cover del 99%, un E-value 2×10^{-44} y un porcentaje de identidad del 99.06%.

PCR de la secuencia tRNA-Gly (trnG)

Al realizar la PCR del marcador tRNA-Gly (trnG) se evidencia 16 bandas amplificadas con los cebadores diseñados para esta región. Se observó once muestras con bandas definidas, tres muestras con bandas que presentaron baja definición y dos muestras sin bandas. Los productos generados con estos cebadores tuvieron una longitud de 104 pb. En este ensayo el control negativo no presentó amplificación. En la Figura 13 se observa la amplificación de las 16 muestras con los cebadores para un gel de agarosa al 1.5%.

Figura 13

Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los cebadores diseñados para tRNA-Gly (trnG) en muestras de Valeriana adscendens Turcz



Nota. Ampliaciones para 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz en gel de agarosa al 1.5% y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder). CN) Control negativo.

Análisis de datos para el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG)

Los datos obtenidos de la amplificación con los cebadores (forward y reverse) para el gen tRNA-Gly (trnG) presentaron una distribución normal. Por lo tanto, se realizó un análisis de la varianza ANOVA. En esta prueba se obtuvo un p -valor mayor que el estadístico de prueba ($\alpha=0.05$). Este resultado indica

que no existe una diferencia estadísticamente significativa en la amplificación de las bandas con respecto al cuadrante de muestro.

La prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) confirmo los resultados obtenidos con el ANOVA. En esta prueba se observó que las medias para los cuatro cuadrantes tienen la misma letra de clase, lo que implica que no hay una diferencia significativa entre los cuadrantes y ni en la presencia o ausencia de bandas. A partir de estos resultados se determinó el porcentaje de bandas amplificadas, el error muestral y el intervalo de confianza al 95% para cada cuadrante (Tabla 9).

Tabla 9

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

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

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

En la Tabla se observa que el cuadrante tres (C3) presenta un mayor porcentaje de amplificación, el cuadrante uno y cuatro (C1 y C4) presentan un porcentaje de amplificación similar mientras que el cuadrante dos presenta el porcentaje de amplificación más bajo. Esto sugiere el primer diseñado amplifica la región del gen trnG.

Marcadores moleculares ISSRs

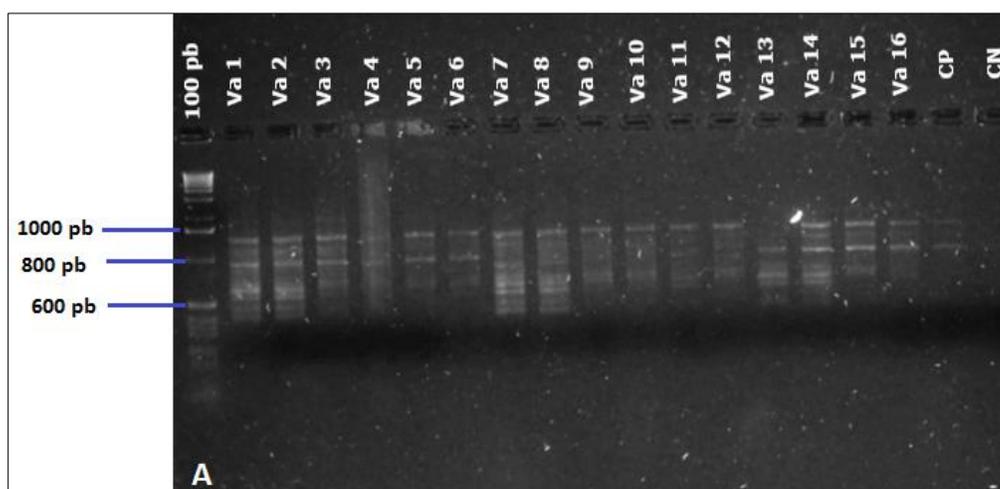
Amplificación de marcadores ISSRs

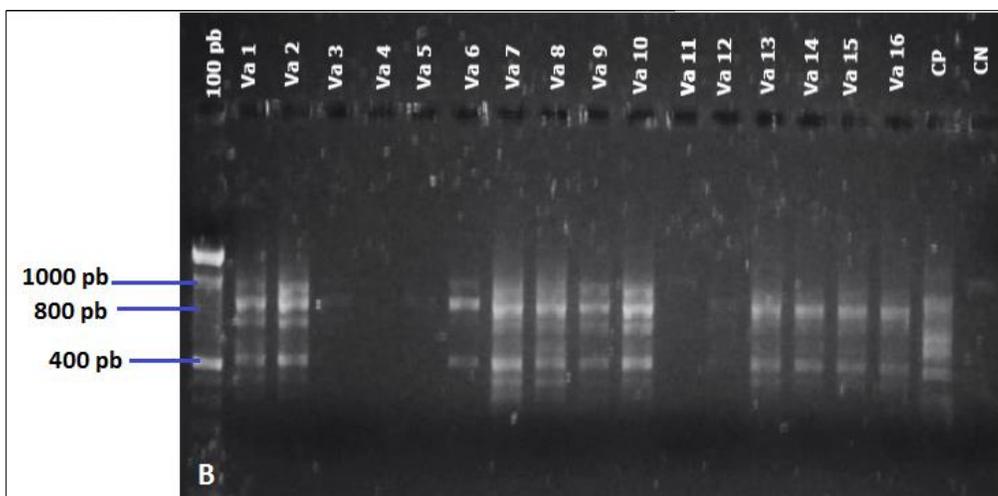
La amplificación con marcadores ISSRs se realizó bajo condiciones estándares descritos en el estudio de Vargas (2021). Para esta amplificación se utilizaron 16 muestras, un control positivo y un control negativo. Se observaron 82 bandas amplificadas con estos cebadores, las cuales presentaron longitudes entre 376 y 1560 pb con un promedio de 41 bandas por cebador. El cebador 17898A presentó bandas en un rango de 376- 1171 pb, mientras que el cebador 17898B presento bandas en un rango de 425-1560 pb. El control negativo no presentó amplificación mientras que el control positivo mostró bandas entre 423-1611 pb.

El marcador 179898B presentó bandas visibles en las dieciséis muestras, así como el control positivo. Por otro lado, el marcado 17898A presentó bandas visibles en once muestras así como en control positivo. En la Figura 14 se visualiza los productos de amplificación con los cebadores 17898B y 17898A en un gel de agarosa al 1.5%.

Figura 14

Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los cebadores 17898B y 17898A en muestras de Valeriana adscendens Turcz





Nota. Amplicones para 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz en gel de agarosa al 1.5% y marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™ TrackIt™ 100 bp Plus DNA Ladder). CN) Control negativo. CP) Control positivo. A) Cebador 17898B. B) Cebador 17898A.

Análisis de datos para los marcadores ISSRs

Los marcadores ISSRs utilizados mostraron una buena capacidad para generar bandas de ADN polimórfico. Estas bandas fueron analizadas en el programa Gel Analyzer y los resultados obtenidos de este análisis fueron empleados para calcular el contenido de información polimórfica (PIC), el índice del marcador (IM), el poder de resolución (R) y el poder de discriminación (D). El cebador 17898B presentó un índice de marcador (IM) de 0.0013, mientras que el valor para el cebador 17898A fue de 0.0068. El valor más alto en el contenido de información polimórfica fue de 0.1742 para el cebador 17898B y el más bajo de fue 0.1317 para el cebador 17898B. El poder de resolución del marcador 17898B fue de 10.37 y para el 17898A de 5.37. En cuanto al poder discriminatorio se obtuvo valores de 0.98 para el marcador 17898B y 0.99 para el 17898B.

Para determinar el nivel de similitud entre las muestras se calculó el coeficiente Jaccard. A partir de este coeficiente se obtuvo una matriz de triangular. En esta matriz se observó que las muestras con un valor de cero no tienen similitud, mientras que con valores cercanos a uno se presentan similitud. En

este estudio el valor máximo de similitud fue de 1, mientras que el valor mínimo fue de 0.57. Además, encontró una similitud de 1 entre varios individuos, mientras que el menor valor de similitud se identificó entre los individuos V10 y V15. En la Figura 15 se observa los valores obtenidos para el índice de Jaccard.

Figura 15

Matriz triangular en base al índice de similitud de Jaccard

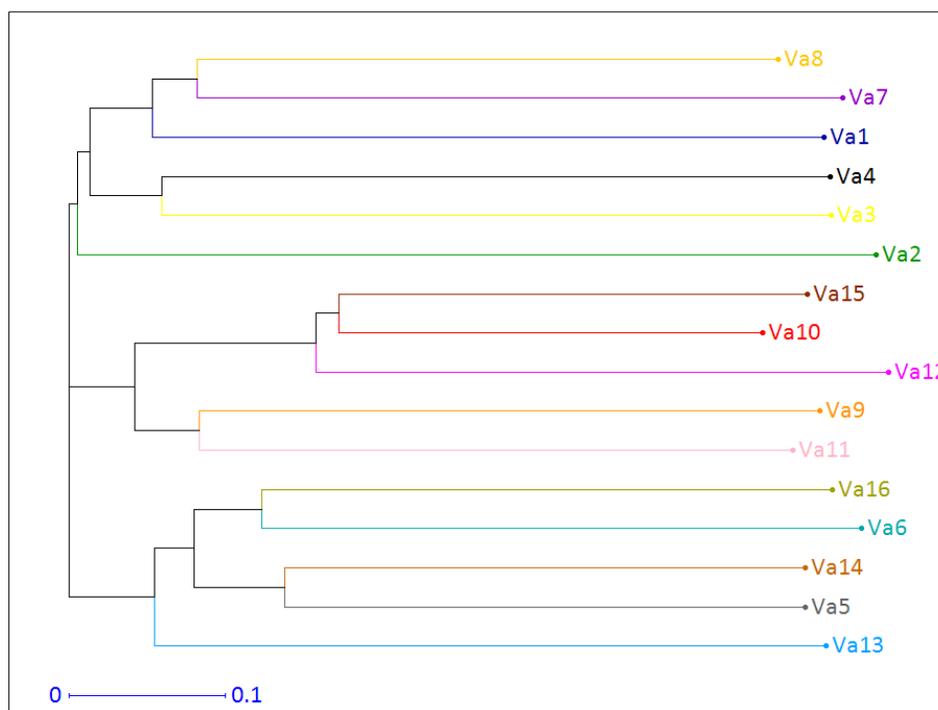
Unidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	1.00														
3	0.91	1.00													
4	0.89	1.00	0.86												
5	1.00	1.00	1.00	1.00											
6	1.00	1.00	1.00	1.00	0.80										
7	0.85	0.92	1.00	1.00	1.00	1.00									
8	0.86	1.00	0.92	1.00	0.80	0.91	0.79								
9	1.00	1.00	0.89	1.00	1.00	1.00	1.00	0.92							
10	0.91	1.00	1.00	1.00	0.86	0.86	0.92	0.83	0.89						
11	0.92	1.00	0.90	0.88	1.00	1.00	1.00	1.00	0.78	0.90					
12	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	0.67	0.88				
13	1.00	1.00	1.00	0.91	0.80	0.91	1.00	0.88	1.00	0.92	1.00	1.00			
14	1.00	1.00	1.00	1.00	0.67	0.86	0.92	0.73	1.00	0.75	1.00	1.00	0.83		
15	1.00	1.00	1.00	1.00	0.86	0.86	1.00	0.92	0.89	0.57	0.90	0.67	0.92	0.89	
16	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75	0.75	1.00	0.90	1.00	0.83	0.86	1.00	0.90	0.83	0.83

Nota. El color celeste representa los valores bajos de similitud, el color verde los valores medios y el amarillo los valores altos.

A partir de las medidas de distancia del coeficiente de similitud se realizó un dendrograma mediante el método "Neighbor Joining". Este método emplea la matriz de similitud para construir un dendrograma que determina que muestras están relacionadas mediante un proceso de agrupación iterativo. En la Figura 16, se observa que el método generó tres agrupaciones. El primer grupo está constituido los individuos Va8, Va7, Va1, Va4, y Va3. El segundo grupo por Va15, Va10, Va12, Va11, y Va9. El tercer grupo por los individuos Va16, Va6, Va14, Va5, y Va13.

Figura 16

Dendrograma generado mediante el método "Neighbor Joining"

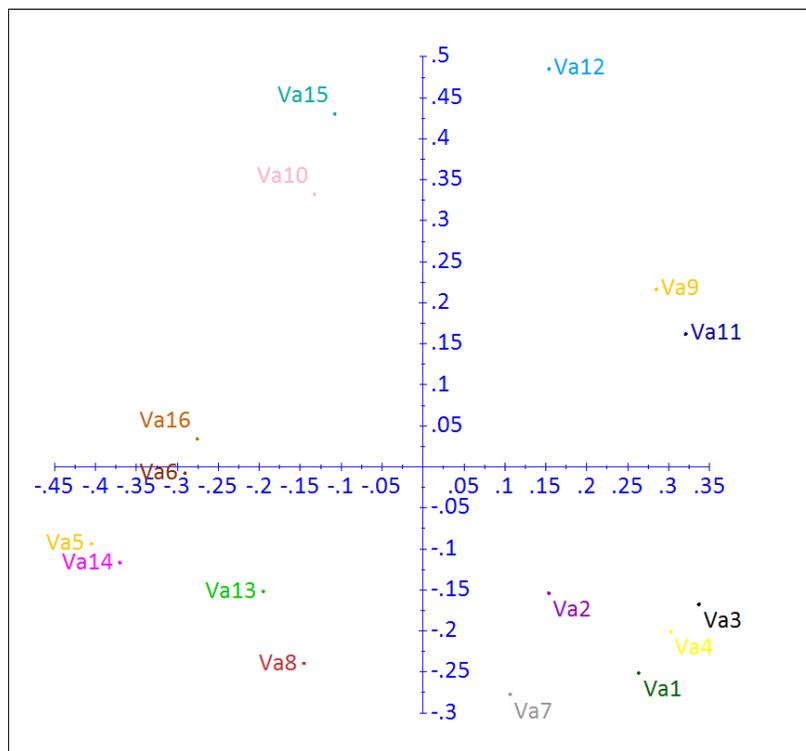


Adicionalmente, se construyó un análisis de coordenadas principales (PCoA) en base a la matriz de similitud. Este método permite representar en un gráfico de dos o tres dimensiones las agrupaciones de las muestras que presentan similitud. La Figura 17 permite visualizar las proximidades entre las muestras en dos dimensiones.

Figura 17

Análisis de coordenadas principales (PCoA) generado para las 16 muestras de Valeriana adscendens

Turcz



Los individuos Va9, Va11, Va3, Va2 y Va7 se encuentran ubicados en el primer cuadrante. En el segundo cuadrante están ubicadas las muestras Va1, Va4 y Va12. En el tercer cuadrante los individuos Va8, Va16, Va6, Va14 y Va5 y el cuarto cuadrante las muestras Va15, Va10 y Va13. Al analizar estos datos con los cuadrantes donde fueron recolectadas las muestras, se puede mencionar que Va1 y Va9 son los únicos individuos que se encuentran en el cuadrante correspondiente a su lugar de recolección.

Capítulo V: Discusión

El conocimiento de las características de las especies vegetales de los bosques andinos y páramos es importante para su conservación y distinción, tanto a nivel genético como fenotípico. Algunas especies que habitan en estas zonas muestran variación morfológica, fisiológica y de estructura genética de sus poblaciones. La variación es consecuencia de diversos factores, sobre todo, el altitudinal. Por lo tanto, es común encontrar varios fenotipos de una misma especie entre poblaciones que se han desarrollado a diferentes altitudes (Ohsawa & Ide, 2008).

La descripción morfológica de hojas, flores, semillas y frutos de estas especies ha sido de gran utilidad para la caracterización y evaluación de los recursos genéticos de estas zonas. Estas características son atributos heredables que son cuantificables e identificables para discriminar fenotipos (Lowe, Hanotte, & Guarino, 1996). Los rasgos físicos son fáciles de observar y se pueden expresar de forma uniforme, según las condiciones del ambiente. Sin embargo, las descripciones morfológicas son limitadas por el tipo de herencia (dominante, recesiva o codominante) (Barcaccia, 2009)

En los últimos años, la utilización de técnicas moleculares ha permitido ampliar la taxonomía molecular y complementar la caracterización de las especies (Guo, Yang, Chen, Li, & Guo, 2018). El desarrollo de estas técnicas contribuye a mejorar la distinción entre especie o variedad, entre familias o géneros de varias especies andinas (Rodríguez & Sytsma, 2006) Los marcadores moleculares son técnicas usadas para caracterizar y evaluar la diversidad genética en plantas endémicas de los bosques andinos y páramos. En base a ello, el presente estudio tiene como objeto caracterizar a nivel molecular la especie *Valeriana adscendens Turcz* mediante marcadores moleculares en Bosques Andinos del Ecuador.

Recolección y Conservación de muestras foliares

La recolección y conservación de las muestras es el primer paso fundamental en la caracterización a nivel molecular de cualquier especie. Es importante preservar las muestras utilizando métodos que mantengan la integridad del ADN a largo plazo (Guo, Yang, Chen, Li, & Guo, 2018). Los métodos más usados para evitar la degradación del tejido son la congelación y la desecación. La congelación es una técnica poco empleada en campo, debido a que no es útil para excursiones prolongadas. Por lo que se emplea la sílica gel como un agente desecante por la capacidad de absorber humedad. La desecación es un método económico y rápido de aplicar, en donde la muestra de hoja se demora en secar entre 12 a 24 horas. Por lo tanto, permite preservar hojas con suficiente ADN de alta calidad para diferentes ensayos (Male, Kato, & Mukankusl, 2018).

En el presente estudio, se utilizó la sílica gel para conservar las muestras foliares recolectadas en el campo. En total se recolectaron 16 muestras por cuadrante. Las muestras no presentaron daño en el tejido, es decir no existió un cambio de tonalidad de las hojas (verde a marrón oscuro). Según Till y colaboradores (2015) cuando una hoja esta preservada correctamente por sílice gel, se observa un leve desvanecimiento en el color. Este cambio de coloración es un indicador de que la sílice gel ha permitido eliminar el agua del tejido vegetal de forma correcta.

El tiempo del secado del tejido es otra variable que se debe considerar al momento de usar este método. En este trabajo se determinó que el tiempo ideal de secado para muestras foliares de *Valeriana adscendens* Turcz es de 7 días, en donde se evidenció un ADN de calidad aceptable (1.64 en el radio de absorbancia de A260/280). Sin embargo, Chase y Hills (1991), en sus investigaciones mencionan que el tiempo de secado idóneo para hojas es de 48 horas a 120 horas dependiendo de la cantidad de agua que presente el tejido. Es importante mencionar, que, al ser especies de páramo, estas retienen mayor cantidad de agua, por lo tanto, su secado requiere más días de tratamiento. El protocolo de secado empleado fue eficiente para preservar las muestras recolectadas.

Amplificación marcadores moleculares

El primer paso para la amplificación con marcadores moleculares es la extracción de ADN. En la extracción de ADN de muestras vegetales es necesario elegir el método más adecuado para conservar la calidad del material genético. Estos métodos tienen que estar enfocados en remover la mayor cantidad de contaminantes como polisacáridos, polifenoles, proteínas y lípidos (Heikrujam, Kishor, & Behari, 2020).

Las hojas de *Valeriana adscendens* Turcz presentan compuestos activos como el ácido valérico y los valepotriatos. Estos compuestos son contaminantes que pueden inhibir algunas técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Haile, y otros, 2021). Por lo anteriormente descrito, se empleó en el presente trabajo, un método basado en el detergente CTAB con modificaciones para la extracción de ADN genómico de alta calidad de 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz analizadas.

Los resultados obtenidos muestran que el uso del detergente CTAB en el protocolo de extracción favorece a la obtención de ADN de concentración y pureza adecuada. Según Brandfassy y Karlovsky, 2008, el CTAB es un detergente catiónico que incrementa la lisis celular debido a que solubiliza los lípidos de la membrana. Además, el CTAB forma complejos insolubles con proteínas y polisacáridos, permitiendo la eliminación de estos mediante centrifugación o decantación, lo que permite obtener ADN relativamente puro (Dairawan & Shetty, 2020). Por lo tanto, este método es útil para la extracción de ADN de plantas que presentan gran cantidad de compuestos fenólicos y polisacáridos como *Valeriana adscendens* Turcz.

La calidad promedio de ADN extraído de este método de acuerdo con la relación de absorbancia A260/280 fue de 1.64. De acuerdo con Abdel y Osman (2017), se considera que el ADN posee una pureza óptima si presenta un valor entre 1.8 a 2.0 en el radio de absorbancia de A260/280. Mientras que un valor A260/280 > 1.6 es considerado como un ADN aceptable. Por lo tanto, el ADN extraído tiene calidad aceptable para ser utilizado en otras técnicas moleculares como la PCR.

La amplificación de marcadores moleculares se realiza mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN específico. Estas copias son utilizadas para análisis posteriores como la secuenciación. Por lo tanto, la elección del marcador molecular generalmente depende del nivel de polimorfismos a detectar y de su cobertura en el genoma (Kumar, y otros, 2022) Además, la elección del marcador molecular también dependerá del tipo de investigación que se lleve a cabo. En la caracterización molecular los marcadores son utilizados para identificar diferentes especies (Barcaccia, 2009).

Los ISSRs o "Inter Simple Sequence Repeticiones" por sus siglas en inglés, son marcadores moleculares utilizados para evaluar la diversidad genética o identificación de especies. Estos marcadores se caracterizan por ser dominantes y presentan un alto grado de polimorfismos (Newell, Fricker, Roco, Chandrangsu, & Merkel, 2013). En este trabajo se utilizaron dos marcadores ISSRs (17898B y 17898A) para caracterizar la especie *Valeriana adscendens* Turcz. Los cebadores 17898B y 17898A son dos secuencias que se han utilizado anteriormente en estudios para evaluar las características de la subfamilia Valerianaceae. Jugran y colaboradores (2013) en sus estudios con *Valeriana jatamansi* Jones, emplearon este tipo de marcadores por su robustez, simplicidad de técnica y fácil adaptabilidad a cualquier tipo de planta. Además, los ISSRs no requieren datos de las secuencias para la síntesis de cebadores (Mir, Shafi, & Zargar, 2023). Por lo tanto, estos marcadores pueden ser empleados para el estudio de especies como *Valeriana adscendens* Turcz que presenta poca información su genoma.

Al aplicar los marcadores ISSRs en muestras de *Valeriana adscendens* Turcz se obtuvo 82 bandas con pesos entre los 376 y 1560 pb. Estos datos son similares con los obtenidos por Jugran, Bhatt, y Rawal (2015) para *Valeriana jatamansi* Jones, donde obtuvieron fragmentos de 200-2000 pb. Por lo tanto, es evidente que los fragmentos obtenidos con las muestras analizadas en el presente estudio se

encuentran en el intervalo reportado para especies del género *Valeriana*. Los marcadores ISSRs proporcionan una gran cantidad de información útil para caracterizar a un individuo. Por lo tanto, es necesario analizar la información polimórfica de estos cebadores con varios índices.

El contenido de información polimórfica (PIC), es un índice que hace referencia al grado de información que brinda un marcador genético (González, León, Morillo Coronado, & Ochoa, 2016). Esta medida, depende del número de alelos para ese locus y frecuencias relativas. Los marcadores 17898B y 17898A, evaluados en este estudio presentaron un PIC de 0.1742 y 0.1317, respectivamente. Según De Riek y colaboradores (2001), el valor del PIC para marcadores dominantes se encuentra entre 0 y 0.5. Estos marcadores son considerados como no informativos si presentan un valor menor a 0.15, informativos si presentan un valor entre 0.15 y 0.25 y altamente informativos si su valor es mayor a 0.25. En este contexto, se consideran a estos marcadores como dominantes, sin embargo, el marcador 17898B también es considerado como informativo.

En este estudio se evaluó el índice de marcador (IM) para cada marcador y los valores fueron de 0.0068 para el cebador 17898B y 0.0013 para el cebador 17898A. De acuerdo con Zargar y colaboradores (2016), el índice de marcador es una medida utilizada para evaluar la utilidad de un marcador particular para identificar un perfil genético o genotipo común. El valor del IM se encuentra entre 0 y 1. Un valor de 1 indica que el marcador está asociado con el rasgo de interés, mientras que un valor de 0 indica que el marcador no está asociado con el rasgo de interés.

Además, se evaluó el poder discriminatorio y el poder de resolución para cada cebador. El poder de discriminación evalúa la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar presenten patrones de bandas diferentes. Los marcadores 17898B ($D=0.98$) y 17898A ($D=0.99$) tienen valores similares, lo que indica que los dos marcadores tienen una eficiencia similar para discriminar entre las muestras de *Valeriana adscendens* Turcz. Por otro lado, el poder de resolución para estos marcadores fue de 10.37 (17898B) y 5.37 (17898A). Según Zargar y colaboradores (2016), el poder de resolución muestra la

capacidad de los cebadores para diferencias entre los genotipos. En este estudio se observa que el cebador 17898B presenta mayor poder de resolución.

De igual forma, se calculó el valor de similitud a partir del coeficiente de Jaccard. El coeficiente de Jaccard, se usa para analizar qué tan similares son dos muestras respecto a las especies encontradas. Es decir, permite determinar comparaciones entre las mismas especies. En este estudio, los índices de similitud entre las muestras oscilan entre 0.57 y 1. Según Saki y colaboradores (2016), mientras más cercano es a 1, más similitud presentan las muestras. Los datos obtenidos con el coeficiente de Jaccard permiten emplear los diferentes métodos de agrupamiento y generar un dendrograma para evaluar los niveles de similitud de los conglomerados que se forman. El dendrograma generado en este estudio presenta cuatro conglomerados, en donde se ha agrupado a las muestras según su similitud.

Por otro lado, los marcadores cloroplásticos se han diseñado a partir de diversas secuencias de ADN del genoma de los cloroplastos. Estos marcadores son utilizados para evaluar la diversidad genética de las poblaciones, identificar especies y conservar especies silvestres (Li, Zheng, & Huang, 2020). En este estudio, se evaluó el gen del cloroplasto de *Valeriana adscendens* Turcz tRNA-Gly (trnG) con el diseño de dos cebadores (forward y reverse) para esta región. Esta región ya ha sido empleada anteriormente por Bell y colaboradores (2012), en los estudios sobre filogenia y diversificación de Valerianáceas, en donde, el gen tRNA-Gly (trnG) presenta una secuencia de ADN lineal de 584 pb.

Para determinar la eficacia de los cebadores diseñados se realizó una PCR *in silico* con el fin de obtener el producto de amplificación. El producto de amplificación obtenido fue de 106 pb y esta secuencia se analizó mediante alineamiento de secuencias de tipo local. Según Samal 2021, el software BLAST permite comparar una secuencia desconocida con una base de datos para identificar similitudes y relaciones funcionales. El alineamiento de secuencias realizado al producto de amplificación dio como resultado dos secuencias homólogas correspondientes a *Valeriana adscendens* Turcz y *Valeriana secunda*. Sin embargo, para este estudio se determinó que la secuencia presenta un mejor alineamiento

para *Valeriana adscendens* Turcz por un Query cover del 100% y un E-value 1×10^{-46} . De acuerdo Newell y colaboradores (2013), para que dos secuencias se han homologas necesita presentar un Query cover con alto porcentaje y un E-value pequeño para que la coincidencia sea más "específica". Estos datos permiten sugerir que la alineación para *Valeriana adscendens* Turcz es específica y correcta.

La presente investigación permitirá continuar con la caracterización molecular de *Valeriana adscendens* Turcz, dando paso a diferentes estudios de variabilidad genética con la posibilidad de establecer un sistema de "código de barras" (*Barcoding*) para clasificar las especies de este género basado en su genoma. Esta investigación además permitirá, fomentar la conservación de recursos genéticos de especies poco exploradas en los bosques andinos mediante la implementación de bancos de germoplasma.

Capítulo VI: Conclusiones

- Los marcadores ISSRs (17898A y 17898B) y el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG) permitieron obtener información a nivel molecular útil para la caracterización molecular de *Valeriana adscendens* Turcz.
- La recolección del material vegetal de muestras foliares de *Valeriana adscendens* Turcz en el Parque Nacional Cayambe-Coca y el almacenamiento con el método de silica gel permitió, obtener muestras adecuadas para la extracción de ADN genómico.
- El método de extracción con CTAB para obtener ADN genómico de *Valeriana adscendens* Turcz permitió obtener una buena calidad de ADN con una pureza 1.64 y con una concentración de 959.81 ng/ μ L.
- La amplificación de las 16 muestras de *Valeriana adscendens* Turcz con marcadores moleculares ISSRs (17898B y 17898A) mostraron una diversidad de bandas de entre 376 a 1176 para el marcador B y una diversidad de bandas de 425 a 1560 para el marcador A.
- El análisis de los marcadores moleculares ISSRs evidenció que el marcador 17898B tiene un Contenido de Información Polimórfica (PIC) de 0.1742 por lo tanto esta secuencia es un tipo de marcador informativo, útil para la caracterización molecular de *Valeriana adscendens* Turcz.
- Los porcentajes de amplificación para el marcador cloroplástico tRNA-Gly (trnG) en cada cuadrante presentaron valores entre el 63% hasta el 88% por lo tanto este marcador es útil para los ensayos de caracterización molecular de la especie *Valeriana adscendens* Turcz.

Capítulo VII: Recomendaciones

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

Capítulo VIII: Referencias

- Abdel, A., & Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant methods*, 1-13.
- Amiteye, S. (2021). *Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding*. Heliyon.
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 221-242.
- Barcaccia, G. (2009). Molecular markers for characterizing and conserving crop plant germplasm. *Molecular Techniques in Crop Improvement*, 231-254.
- Bell, C., KutschkeR, A., & Arroyo, M. (2012). Filogenia y diversificación de Valerianaceae (Dipsacales) en los Andes meridionales. *Filogenética molecular y evolución*, 63(3), 724-737.
doi:10.1016/j.ympcv.2012.02.015
- Bobo, J., Salmerón, E., Mota, J., & Peñas, J. (n.d.). Genetic conservation strategies of endemic plants from edaphic habitat islands: The case of *Jacobaea auricula* (Asteraceae). *Journal for Nature Conservation*. doi:10.1016/j.jnc.2021.126004
- Buytaert, W., Célleri, R., De Bièvre, B., & Cisneros, F. (2006). *Buytaert, Hidrología del páramo andino: propiedades, importancia y vulnerabilidad*. Cuenca. From http://www.paramo.org/files/hidrologia_paramo.pdf.
- Camacho, M. (2014). Los páramos ecuatorianos: caracterización y consideraciones para su conservación y aprovechamiento sostenible. *Revista Anales*, 372(1), 77-92. From <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/anales/article/view/1241>

- Campaña, C. (2005). Filogenia y biogeografía de Valerianaceae (Dipsacales) con especial referencia a la valeriana sudamericana. *Organisms Diversity & Evolution*, 5(2), 147-159.
doi:10.1016/jode.2004.10.014
- Carrodegua, A., & Zúñiga, A. (2021). *Aplicación de herramientas moleculares para el mejoramiento genético de pasturas*. Pastos y Forrajes.
- Cortés, L., Camacho, S., & Matoma, M. (2020). Estudio de la composición y estructura del bosque andino localizado en Potrero Grande, Chipaque (Colombia). *UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1).
- Dairawan, M., & Shetty, P. (2020). The evolution of DNA extraction methods. *Am. J. Biomed. Sci. Res*, 8(1), 39-45. doi:10.34297/AJBSR.2020.08.001234
- De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., & Van Bocksta, E. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and applied genetics*, 1254-1265.
- DiVittorio, C., Singhal, S., & Roddy, A. (2020). Natural selection maintains species despite frequent hybridization in the desert shrub *Encelia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(52), 33373-33383. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2001337117>
- El-Esawi, M. (2019). Introductory Chapter: Assessment and Conservation of Genetic Diversity in Plant Species. *Genetic Diversity in Plant Species - Characterization and Conservation*.
doi:10.5772/intechopen.86060
- Garrido, J. (2007). Análisis por cromatografía líquida de alta resolución de ácido valerénico o sus derivados en extracto de hojas y raíz de valeriana (*Valeriana prionophylla* Standl.).
- Goldberg, I., & Rokem, J. (2009). Gold Organic and Fatty Acid Production, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology*, 421-442. doi:10.1016/b978-012373944-5.00156-5

- González , C., León, M., Morillo Coronado, A. C., & Ochoa, E. (2016). Caracterización molecular de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., procedente de diferentes orígenes (Zaire y Camerún) usando marcadores microsatelites. *Acta Agronómica*, 276-283.
- Guo, Y., Yang, G., Chen, Y., Li, D., & Guo, Z. (2018). A comparison of different methods for preserving plant molecular materials and the effect of degraded DNA on ddRAD sequencing. *Plant diversity*, 40(3), 106-116. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.04.00>
- Gutiérrez , B., Ipinza , R., & Barros , A. (2015). *Conservación de recursos genéticos forestales. Principios y prácticas*.
- Haile, T., Johnsen, S., Kovi, M., Hvoslef-Eide, T., Tesfaye, B., & Rognli, O. (2021). Comparison of Different Leaf Preservation Methods To Obtain High Quality DNA From Enset (*Ensete Ventricosum* (Welw.) Cheesman). *A Native And Orphan Food Security Crop In Ethiopia*.
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Behari , P. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*.
- Hofstede , R., & Llambí. (2019). Plant Diversity in Páramo—Neotropical High Mountain Humid Grasslands. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. doi: 10.1016/b978-0-12-409548-9.11858-5
- Jugran, A., Bhatt, I., & Rawal, R. (2015). Identificación de marcadores ISSR asociados con el contenido de ácido valerénico y la actividad antioxidante en *Valeriana jatamansi* Jones en el Himalaya occidental. *Mejoramiento molecular*.
- Karp, A. (1997). *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies* . Bioversity International.
- Khan, S., Al-Qurainy, F., & Nadeem, M. (2012). Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and endangered plants of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(1), 1-11. doi:10.1016/j.sjbs.2011.11.001

- Kumar, S., Susmita, C., Sripathy, K., Agarwal, D., Pal, G., & Singh, A. (2022). Molecular characterization and genetic diversity studies of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars using SSR markers. *Molecular biology reports*, *49*(3), 2129-2140. doi:<https://doi.org/10.1007/s11033-021-07030-4>
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género *Valeriana* (Valerianaceae) en Sudamérica austral. *Botánica*, 244-296. doi: [10.4067/s0717-66432011000200016](https://doi.org/10.4067/s0717-66432011000200016)
- Leal, E. (2020). La importancia de la preservación de los ecosistemas de páramo como fuentes de agua y vida en Colombia. *Diálogos de Saberes*, *52*, 111-126. doi: <https://doi.org/10.18041/0124-0021/diálogos.52.2020.8651>
- Li, C., Zheng, Y., & Huang, P. (2020). Molecular markers from the chloroplast genome of rose provide a complementary tool for variety discrimination and profiling. *Scientific reports*, *10*(1). doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68092-1>
- Llambí, L., Soto, W., Céleri, R., De Bievre, B., Borja, P., & Ochoa, B. (2012). *Páramos andinos*. Ecología, hidrología y suelos de páramo. From <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/56479.pdf>
- Loo, J., & Canadian, F. (2011). *Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica*. . Jalisco : Comisión Nacional Forestal de México.
- Loo, J., & Canadian, F. (2011). *Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica*. . Zapopan: Comisión Nacional Forestal de México.
- Lowe, A., Hanotte, O., & Guarino, L. (1996). Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*.

- Lu, Z., Cui, J., Wang, L., Teng, N., Zhang, S., Lam, H., & Jin, B. (2021). Genome-wide DNA mutations in Arabidopsis plants after multigenerational exposure to high temperatures. *Genome Biology*, 22(1). doi:10.1186/s13059-021-02381-4
- Male, A., Kato, F., & Mukankusi, C. (2018). DNA extraction from silica gel-preserved common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 17(49), 1338-1388. doi:10.5897/ajb2018.16620
- Maxted, N., Hunter, D., & Ríos, R. (2020). *Plant genetic conservation*. Cambridge University Press.
- Mena, P., & Hofstede, R. (2006). *Los páramos ecuatorianos*. Botánica Económica de los Andes Centrales.
- Minas, K., McEwan, N., Newbold, C., & Scott, K. (2011). Optimization of a high-throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure cultures. *FEMS Microbiology Letters*, 352(2), 162-169. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02424.x
- Mir, R., Shafi, S., & Zargar, S. (2023). *Principles of Genomics and Proteomics*. Elsevier.
- Morocho, C., & Chuncho, G. (2019). Páramos del Ecuador, importancia y afectaciones : Una revisión. *Bosques Latitud Cero*, 71-83. From https://www.researchgate.net/profile/Guillermo-Chuncho-2/publication/344180955_Paramos_del_Ecuador_importancia_y_afectaciones_Una_revision/links/5f599caaa6fdcc11640482c4/Paramos-del-Ecuador-importancia-y-afectaciones-Una-revision.pdf
- Murray, M. (2020). *Valeriana officinalis (Valerian)*. Textbook of Natural Medicine. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43044-9.00123-0>.
- Nadeem, M., Nawaz, M., Shahid, M., Doğan, Y., Comertpay, G., & Yıldız, M. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(1), 261-285.

- Newell, P., Fricker, A., Roco, C., Chandrangsu, P., & Merkel, S. (2013). ChA Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal of microbiology & biology education*, 14(2), 238-243. doi: <https://doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.63>
- Ohsawa, T., & Ide, Y. (2008). Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, 17(2), 152-163.
- Pinos, D., Morales, O., & Durán, E. (2021). Paramo soils: analysis of perceptions of ecosystem services and economic valuation of carbon content in the southeastern sierra of Ecuador. *Revista de Ciencias Ambientales*, 52(2), 151-173. doi:<https://doi.org/10.15359/rca.55-2.8>
- Restrepo, C. (2020). Recambio foliar en seis especies de plantas en dos localidades de los páramos ecuatorianos. *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*.
- Rocha, P. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*, 24(2), 11-25.
- Rodriguez, A., & Sytsma, K. (2006). Phylogenetics of the " Tiger-flower" group (Tigridieae: Iridaceae): molecular and morphological evidence. *Aliso: A Journal of Systematic and Floristic Botany*, 412-424.
- Romoleroux, K., Tandalla, D., & Erler, R. (2019). *Valeriana adscendens* . From Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi:
<<https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Valeriana%20adscendens>>.
- Sabogal, A., & Quinteros, Y. (2013). Diversidad vegetal y uso antrópico de los páramos de Samanga (Sector Espíndola y El Toldo) y San Juan de Cachiaco (Caseríos San Juan y Totorá), Ayabaca, Piura. *Ecología Aplicada*, 12(1), 9-17. From http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162013000100002&lng=es&tlng=es.

- Saki, S., Bagheri, H., Deljou, A., & Zeinalabedin, M. (2016). Evaluation of genetic diversity amongst *Descurainia sophia* L. genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiology and molecular biology of plants*, 22(1), 97–105. doi: <https://doi.org/10.1007/s12298-015-0330-2>
- Samal, K., Sahoo, J., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic local alignment search tool). 36(1), 55-61.
- Şen, B., & Mat, A. (2015). Chemical and Medicinal Evaluations of the Valeriana species in Turkey. *Journal of Pharmacy of Istanbul University*. From [.https://www.researchgate.net/publication/292398689_Chemical_and_Medicinal_Evaluations_of_the_Valeriana_sp](https://www.researchgate.net/publication/292398689_Chemical_and_Medicinal_Evaluations_of_the_Valeriana_sp)
- Shriver, M. (2008). Forensic DNA Analysis: From Modest Beginnings to Molecular Photofitting, Genics, Genetics, Genomics, and the Pertinent Population Genetics Principles. *Molecular Photofitting*, 1-34. doi:10.1016/b978-012088492-6.50004-9
- Simpson, M. (2019). Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. *Plant Systematics*, 285-466. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812628-8.50008-0>.
- Song, L., Wang, R., Yang, X., Zhang, A., & Liu, D. (2023). Song, L., W Molecular Markers and Their Applications in Marker-Assisted Selection (MAS) in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriculture*, 13(62).
- Sorof Uddin, M., & Cheng, Q. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*, 195-212. doi:10.1016/b978-0-08-100068-7.00012-4
- Terán, A., Pinto, E., Cuesta, F., & Ortiz, E. (2019). *Conservación y uso sostenible de los páramos de Tungurahua. Conocer para manejar. Proyecto EcoAndes*. Quito: CONDESAN.
- Weberling, F., & Bittrich, V. (2016). Valerianaceae. *Flowering Plants. Eudicots*, 385-401. doi:10.1007/978-3-319-28534-4_35

Zargar, S., Farhat, S., Mahajan, R., Bhakhri, A., & Sharma, A. (2016). Unraveling the efficiency of RAPD and SSR markers in diversity analysis and population structure estimation in common bean.

Saudi Journal of Biological Sciences, 23(1), 139-149. doi:10.1016/j.sjbs.2014.11.011