



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA:

ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS ESPECIES DEL ECUADOR DEL GÉNERO

***Restrepia (Orchidaceae)* Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE SECUENCIAS**

OBTENIDAS DE GENBANK

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERAS EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORAS:

Amanda Nikole Endara Endara

Mikaela Alexandra Ocaña Flores

TUTORA:

Andrea Denisse Benítez Quintana

Quito-Ecuador

2022

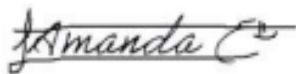
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Amanda Nikole Endara Endara con documento de identificación N° 1724582778 y Mikaela Alexandra Ocaña Flores con documento de identificación N° 1725715286; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

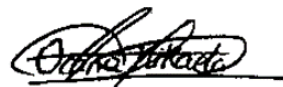
Quito, 04 de agosto del año 2022

Atentamente,



Amanda Nikole Endara Endara

1724582778



Mikaela Alexandra Ocaña Flores

1725715286

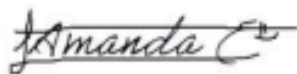
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Amanda Nikole Endara Endara con documento de identificación No.1724582778 y Mikaela Alexandra Ocaña Flores con documento de identificación No.1725715286, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Análisis molecular de las especies del Ecuador del género *Restrepia (Orchidaceae)* y análisis filogenético de secuencias obtenidas de GenBank”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

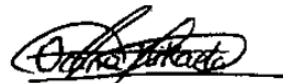
Quito, 04 de agosto del año 2022

Atentamente,



Amanda Nikole Endara Endara

1724582778



Mikaela Alexandra Ocaña Flores

1725715286

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Andrea Denisse Benítez Quintana con documento de identificación N° 1709194938 , docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Análisis molecular de las especies del Ecuador del género *Restrepia* (*Orchidaceae*) y análisis filogenético de secuencias obtenidas de GenBank”, realizado por Amanda Nikole Endara Endara con documento de identificación N° 1724582778 y por Mikaela Alexandra Ocaña Flores con documento de identificación No.1725715286, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 04 de agosto del año 2022

Atentamente,



Lic. Andrea Denisse Benítez Quintana, MSc.

1709194938

Dedicatoria

A mi tío, Iván, por ser el mejor maestro con el corazón más noble, por cuidarme desde que
tengo memoria y darme la mejor infancia.

A mi papá, Fabián y a mis abuelitos, Marco y Luz, por cuidarme cada día desde el cielo, los
extraño mucho, son los angelitos más amorosos que la vida me pudo dar.

A la mejor mamá del mundo, Jenny, por todo tu amor y por tus abrazos que sanan mi
corazón.

A mi hermano, David, por todos tus consejos y todas las risas que nunca faltan.

A mi perrito, Seymour Diera, por su compañía en cada noche y madrugada de estudio que
con su naricita y lengüita preciosa me alegra mis días, te amo con todo mi corazón.

Amanda.

A mis padres, Rolando y Alexandra, por apoyarme en cada paso de mi vida, por todo el
esfuerzo que hacen para que nunca me falte nada, por su amor incondicional y porque cada
día me motivan a ser una mejor persona y cumplir mis metas.

A mi hermano, Ian, por ser la fuente de mi inspiración y mis ganas de seguir siempre
adelante.

A Leslie y Brandon por toda la paciencia, compañía, consejos, además del apoyo
incondicional en cada etapa de mi vida, por ser pilares importantes en mi crecimiento
personal y sobre todo por su infinito amor.

Mikaela

Agradecimiento

Al profesor Marco Cerna Ph.D. por permitirnos formar parte del Grupo de Investigación Nunkui Wakan el cual hizo posible la realización del proyecto, además de compartir su pasión y conocimiento por las orquídeas con nosotras.

A nuestra tutora Denisse Benítez y a la profesora Elizabeth Yugsi, por ser excelentes profesoras y que con su paciencia y apoyo incondicional se logró la realización de este proyecto. Gracias por todo el tiempo compartido a lo largo de este camino.

Al señor Alberto Guerrero, dueño de la colección privada de orquídeas, por proporcionarnos las muestras necesarias para la realización de esta investigación y por su predisposición para llevar a cabo este proyecto.

A nuestros compañeros de laboratorio Sebastián, Sabrina, Alison, Josselin por compartir muchas experiencias juntos y animarnos entre todos para terminar nuestra tesis.

A mis mejores amigos: Fausto Torres, Sebastián Ocaña, Evelyn Pilatuña, Cristina Taipe, gracias por su amistad incondicional de principio a fin, por sus consejos y por todas las experiencias que vivimos juntos. Las risas no faltaron.

Amanda.

Resumen

El género *Restrepia*, pertenece a la familia *Orchidaceae*, la cual se distingue de otros géneros en la sub-tribu *Pleurothallidinae* por la atenuación del sépalo dorsal y la presencia de osmóforos. Se reconocen 61 especies de *Restrepia*, distribuidas en todo Centroamérica y en América del Sur como en Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador, crece a alturas entre 1000 y 3000 m.s.n.m. en áreas del bosque lluvioso montano. En el país se tienen registradas 20 especies del género *Restrepia*, de las cuales 9 son endémicas.

Varios de los estudios filogenéticos que se han realizado en cuanto al género están desactualizados y por ende no cuentan con una clasificación completa de todas las especies descritas hasta el momento. En el presente estudio se recolectaron 24 muestras vegetales del género *Restrepia* pertenecientes al Ecuador, se extrajo ADN mediante el método Doyle & Doyle modificado y se amplificaron con los marcadores moleculares *matK* y *rpoC1* con PCR convencional con el uso del kit Phire Plant Direct PCR Master Mix, se elaboraron árboles filogenéticos en base a secuencias obtenidas en GenBank con los métodos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud (ML), con los modelos evolutivos HKY y Tamura 3-parameter respectivamente. Los análisis de georreferenciación muestran que la zona central del Ecuador es la que presenta mayor presencia de especies del género *Restrepia* para el cual se elaboró un mapa de distribución de las especies estableciendo la correlación de los datos con la información filogenética.

Palabras clave: *Restrepia*, *Orchidaceae*, *matK*, *rpoC1*, filogenia.

Abstract

The *Restrepia* genus belongs to the *Orchidaceae* family, which is distinguished from other genera in the *Pleurothallidinae* sub-tribe by the attenuation of the dorsal sepal and the presence of osmophores. 61 species of *Restrepia* are recognized, distributed throughout Central America and South America such as in Venezuela, Colombia, Peru, Bolivia, and Ecuador, it grows at heights between 1000 and 3000 meters above sea level. in montane rain forest areas. In the country there are 20 registered species of the genus *Restrepia*, of which 9 are endemic.

Several of the phylogenetic studies that have been carried out regarding the genus are outdated and finally do not have a complete classification of all the species described so far. In the present study, 24 plant samples of the genus *Restrepia* belonging to Ecuador were collected, DNA was extracted using the modified Doyle & Doyle method and amplified with the molecular markers *matK* and *rpoC1* with conventional PCR using the Phire Plant Direct PCR Master Mix kit, phylogenetic trees were elaborated based on sequences obtained in GenBank with the Bayesian Inference and Maximum Likelihood (ML) methods, with the HKY and Tamura 3-parameter evolutionary models, respectively. The georeferencing analyzes show that the central zone of the Equator is the one with the greatest presence of species of the *Restrepia* genus, for which a distribution map of the species was elaborated with the contribution of the data with the phylogenetic information.

Keywords: *Restrepia*, *Orchidaceae*, *matK*, *rpoC1*, phylogeny

Índice de contenidos

Introducción	1
Marco Conceptual	5
1. Familia <i>Orchidaceae</i>	5
1.1 Importancia de las orquídeas	6
1.2 Morfología floral	7
1.3 Taxonomía.....	8
2. Género <i>Restrepia</i>	9
2.1 Descripción botánica y morfológica.....	10
2.2 Especies Registradas en el Ecuador.....	11
3. Técnicas moleculares	13
4. Marcadores moleculares en orquídeas	14
4.1. Gen <i>matK</i>	16
4.2. Gen <i>rpoCl</i>	17
5. Filogenia	18
Materiales y Métodos	20
1. Recolección de muestras	20
2. Georreferenciación	20
3. Estudio molecular	20
3.1 Extracción de ADN	21

3.2 Electroforesis	22
3.3 Amplificación de ADN.....	23
4. Filogenia	26
Resultados y discusión	28
1. Colección de muestras	28
2. Georreferenciación.....	29
3. Estudio molecular	31
3.1. Extracción de ADN	31
3.2. Amplificación de ADN.....	32
4. Filogenia	36
Conclusiones	39
Recomendaciones	40

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Orchidaceae</i>	8
Tabla 2. Especies del género <i>Restrepia</i> registradas en el Ecuador	12
Tabla 3. Componentes de la reacción PCR con Phire Plant Direct PCR para región <i>rpoC1</i> y <i>matK</i>	24
Tabla 4. Condiciones de la PCR para <i>matK</i>	25
Tabla 5. Condiciones de la PCR para <i>rpoC1</i>	25
Tabla 6. Listado de plantas del género <i>Restrepia</i> colectadas para el estudio	28

Índice de figuras

Figura 1. Descripción general de la flor de <i>Orchidaceae</i> se ejemplifica <i>Cymbidium</i>	7
Figura 2. Descripción morfológica de <i>Restrepia</i> . Se ejemplifica: <i>Restrepia condorensis</i>	11
Figura 3. Estructura de la región <i>matK</i>	17
Figura 4. Estructura del gen <i>rpoC1</i>	18
Figura 5. Marcador de peso molecular (5000 – 100 pb) que incluye la concentración aproximada en ng/0.5 µg	23
Figura 6. Distribución de las especies del género <i>Restrepia</i> en el Ecuador	30
Figura 7. ADN extraído con buffer dilution	31
Figura 8. ADN Extraído por el método Doyle & Doyle.....	32
Figura 9. Verificación de productos PCR obtenido de las diferentes gradientes de temperatura para el gen <i>matK</i>	33
Figura 10. Verificación de productos PCR obtenido de las diferentes gradientes de temperatura para el gen <i>rpoC1</i>	34
Figura 11. Productos amplificados con el marcador molecular <i>matK</i>	35
Figura 12. Productos amplificados con el marcador molecular <i>rpoC1</i>	35
Figura 13. Modelo evolutivo proporcionado por el programa Mega	36
Figura 14. Árbol consenso del género <i>Restrepia</i> usando la región <i>matK</i>	38

Anexos

Anexo 1. Ubicación geográfica de las especies del género <i>Restrepia</i>	45
Anexo 2. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación del ADN.....	47
Anexo 3. Secuencias del Genbank del género <i>Restrepia</i> y el outgroup de la región <i>matK</i>	49
Anexo 4. Árbol filogenético de la región de <i>matK</i> del género <i>Restrepia</i> con inferencia bayesiana.....	50
Anexo 5. Árbol filogenético de la región de <i>matK</i> del género <i>Restrepia</i> con método de Máxima Verosimilitud.....	51
Anexo 6. Temperatura de Annealing calculada para el primer <i>matK</i> forward.....	52
Anexo 7. Temperatura de Annealing calculada para el primer <i>matK</i> reverse	52
Anexo 8. Temperatura de Annealing calculada para el primer <i>rpoC1</i> forward	53
Anexo 9. Temperatura de Annealing calculada para el primer <i>rpoC1</i> reverse	53

Introducción

Una de las familias más diversas del reino vegetal es la *Orchidaceae* que pertenece a las angiospermas y comprende aproximadamente 25000 especies, las cuales resaltan por su belleza y complejidad floral, su capacidad de adaptación e interacciones ecológicas ya sea con agentes polinizadores o por su simbiosis con hongos (Garcés, 2021). El género *Restrepia* pertenece a la subtribu *Pleurothallidinae* de la familia *Orchidaceae*, las especies pertenecientes a este pequeño género son autóctonas de América Central y del Sur, donde sus hábitats de bosques montanos están bajo una presión cada vez mayor debido a los cambios en el uso de la tierra (Millner & Baldwin, 2016).

La mayoría de las especies de este género han sido identificadas después de 1980 y varias han sido encontradas solamente en uno o dos lugares, teniendo una distribución estrecha en comparación a otros descubrimientos como: *R. antennifera*, *R. contorta*, *R. brachypus* y *R. guttulata*, que tienen una amplia distribución, por otra parte, el estudio de Luer en 1996 es una revisión completa del género, sin embargo, no incluye especies descritas últimamente como *R. archilae* y *R. cobanensis* que son de Guatemala (Millner et al., 2020).

El Ecuador a pesar de ser un país megadiverso que cuenta con una gran variedad genética de especies de flora y fauna se ha visto afectado por la pérdida de hábitats, resultando una amenaza a la conservación de las orquídeas, los principales factores que se tienen son: transformación de ecosistemas, cambio climático, deforestación, sobreexplotación del medio silvestre, tráfico ilegal (Mongrovejo & Proaño, 2020). Cabe destacar que la familia de las orquídeas contribuye con el mayor número de especies endémicas de plantas del país con 1707 especies, es decir que de cada cinco especies de plantas una es orquídea, es por ello, que es importante su registro (Tobar et al., 2018).

En los países intertropicales se tienen crisis muy alarmantes por la pérdida de biodiversidad, que son las zonas exactas donde se concentran las ecorregiones prioritarias que han perdido aproximadamente el 70% de la extensión inicial de su hábitat, siendo estos lugares en donde las orquídeas al ser conocidas como “especies bandera” son el principal tema en los debates de conservación (Tejeda et al., 2017). Por ende, la preservación de especies de orquídeas es relevante para su propia supervivencia y la de otros organismos que las rodean para mantener el equilibrio del ecosistema, además, al preservar el patrimonio genético y su diversidad se contribuye a mantener la información contenida en cada especie con los procesos biológicos que se ha llevado a cabo incluyendo su evolución morfológica codificada por los genes.

Ecuador cuenta con 20 especies del género *Restrepia*, de las cuales 9 son endémicas, entre ellas *R. condorensis* y *R. mendozae* se encuentran en peligro, *R. dodsonii*, *R. ephippium*, *R. iris*, *R. schizosepala* y *R. teaguei* poseen estado vulnerable, y, por último, *R. howei* y *R. cymbula* con datos insuficientes (León et al., 2011).

Mittermeier et al. (1999) demostró que la mayoría de las orquídeas endémicas tienen origen en microhábitats montanos y submontanos, entre los 1000 y 3000 m.s.n.m., identificando a estos bosques como puntos críticos de deforestación, por consecuencia se tiene una pérdida de hábitat y disminución de la población de orquídeas de forma constante, incluyendo las *Restrepia*, en donde solo una pequeña fracción de estas especies ha sido registrada en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) de Ecuador y mediante un análisis en zonas donde suelen encontrarse, se estima que el 85% de las orquídeas endémicas de Ecuador están amenazadas, 2% están críticamente en peligro, 11% están en peligro y el 87% se encuentran vulnerables (Millner et al., 2020).

En el Ecuador existen estudios sobre diversidad genética de orquídeas, pero no existen estudios a nivel específico en el género *Restrepia*, sin embargo, el trabajo de Carrión (2009) en el que realiza un análisis filogenético de 22 especies de orquídeas epífitas, permite deducir que el uso de genes cloroplásticos ayuda a diferenciar con mayor precisión las especies por presentar mayor variabilidad en ciertas regiones.

A pesar de la importancia destacable del género *Restrepia*, la carencia de inventarios de especies que protejan la biodiversidad que posee el país y de sistemas establecidos para la identificación de especies que apoyan la conservación de la diversidad biológica en el Ecuador, surge la probabilidad de que existan especies del género *Restrepia* que aún no sean identificadas o que incluso hayan desaparecido sin tener registros, tomando en cuenta que en el mundo se conoce apenas 1,7 millones de los organismos vivos, pero se estima que existen alrededor de unos 10 millones de especies que aún no se han descrito, es decir no se conoce con exactitud si han desaparecido, mutado o si se trata de especies nuevas (Altamirano & Yáñez, 2016).

Es importante destacar que muchas de las clasificaciones e identificaciones que se han realizado a las orquídeas son de manera morfológica y necesitan ser acompañadas de estudios moleculares para su confirmación, con apoyo de bases de datos en línea que proporcionan la información pertinente, ya que pueden existir dos especies aparentemente iguales por su morfología, pero genéticamente distintas, por ello el uso de marcadores moleculares facilita la identificación y clasificación, no sin antes tener protocolos establecidos para una adecuada extracción y amplificación de las regiones cloroplásticas.

Por ende, estandarizar el protocolo de extracción y amplificación de ADN de especies del género *Restrepia* del Ecuador usando genes como *matK* y *rpoC1* es importante, además del análisis filogenético de secuencias obtenidas de GenBank como paso preliminar para

posteriores identificaciones de especies del género. Para esto se obtendrán las muestras de distintas especies de orquídeas del género *Restrepia* del Ecuador las cuales serán recolectadas en Pichincha de la colección privada de Alberto Guerrero, la cual contiene especímenes de todo el Ecuador.

La delimitación del área geográfica se hará en concordancia a la base de datos Trópicos Missouri Botanical Garden, una página web que ayuda a establecer la ubicación geográfica de las 20 especies registradas en el Ecuador del género *Restrepia*.

Posteriormente se procederá al análisis en el laboratorio, en donde se realizará la extracción y amplificación de las regiones *matK* y *rpoC1* estandarizando los protocolos, además, de que se analizarán secuencias obtenidas en GenBank, con las cuales se realizarán árboles filogenéticos para establecer una clasificación del género.

Marco Conceptual

1. Familia *Orchidaceae*

La familia *Orchidaceae* es una de las más grandes de las plantas vasculares con flores y se distribuyen en casi todo el mundo excepto en la Antártida y los desiertos más secos del mundo, cuenta con alrededor de 30000 a 35000 especies, de las cuales al menos 3000 se encuentran entre Ecuador, Colombia y Perú (Jacinto, 2019).

Las orquídeas se suelen llamar las “maestras del engaño” por poseer mecanismos falsos que atraen a polinizadores, como el producir pseudo polen para atraer insectos, el emitir señales a través de las flores asemejándose al de otra planta que produce néctar para llamar la atención de agentes de polinización sin ninguna recompensa (mimetismo floral engañoso), elaborar sustancias químicas que atraen a los insectos parecidas a las feromonas sexuales, en donde este medio de transferencia de polen se lo denomina pseudo cópula que sorprendentemente se encuentra solo en las orquídeas y que a lo largo de la historia se han destacado como plantas ornamentales más populares desde la era victoriana hasta la actualidad (Śliwiński et al., 2022).

Las orquídeas datan de épocas muy antiguas, Teofrasto (374-287 A.C) fue el primero en describirlas en su obra titulada “La Historia de las plantas”, en donde las nombraba como *Orchis* que viene del latín y significa testículo ya que se parecía a los pseudobulbos presentes en la parte basal de las orquídeas (Chacón et al., 2018; Martín, 2020). Actualmente, las orquídeas se consideran la familia de plantas con flores con más especies sobre el planeta tierra, seguida por las *Asteráceas* es decir la familia del girasol y las margaritas (Palacios, 2014).

La mayor diversidad de estas plantas se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, en el que está incluido Ecuador donde existe una gran variedad de especies de las cuales

219 son géneros de orquídeas y de este número un 40% aproximadamente son endémicas, es por ello que Ecuador fue declarado como País de las orquídeas (Carvajal & Salas, 2021).

1.1 Importancia de las orquídeas

Las orquídeas han sido las plantas más utilizadas por varias civilizaciones desde hace varios años atrás, colectadas para usos etnobotánicos, para la medicina china, se usaba también para la elaboración de pasteles y helados, incluso para la obtención de mucílago para elaborar adhesivos, actualmente se utilizan como flores ornamentales por su gran belleza, además de su gran importancia por su sistema de polinización (Pantaleón Bautista, 2011).

Las orquídeas además de ser útiles en la polinización y asociaciones con hongos específicos para obtener nutrientes tienen una gran importancia en los ecosistemas que habitan, ya que contribuyen directamente a su regulación hídrica y también sirven como refugio y alimento para otros organismos (Londoño, 2021).

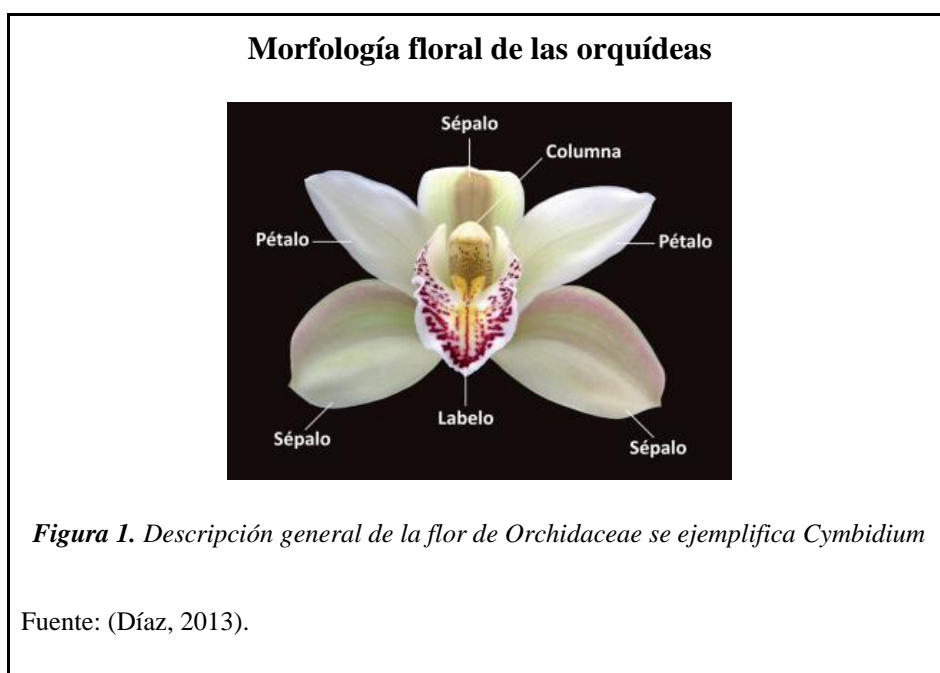
El estudio de este grupo de plantas para obtener una conservación y estabilidad en la naturaleza es de suma importancia para el equilibrio de la vegetación y el ecosistema, siendo que varios representantes de esta familia aparecen en áreas con poca manipulación del ser humano en donde se puede observar cierta estabilidad, sirviendo como bioindicadores en la gestión ambiental de algunos territorios (De La Torre Llorente, 2018). Además de que gracias a sus características como su belleza y fragancia han hecho que este género presente gran demanda en el mercado obteniendo así grandes beneficios económicos; es por ello que una identificación adecuada y precisa del género *Orchidaceae* es relevante para que tenga un uso seguro, además de la protección de su biodiversidad y los recursos genéticos presentes (Li et al., 2021).

En las últimas décadas la actividad humana como el tráfico ilegal, la explotación y el cambio climático, han puesto a esta familia en estado vulnerable (Rocha & Duque, 2017). En Ecuador

existen varias especies de orquídeas y entre ellas se encuentran varias especies endémicas las cuales se ven afectadas por la tala indiscriminada de los bosques, los incendios forestales, la minería antitécnica, la actividad petrolera, la apertura de carreteras y la sobre recolección de orquídeas para abastecer mercados internacionales (Jiménez, 2014).

1.2 Morfología floral

Las flores de las orquídeas se caracterizan por ser hermafroditas, zigomorfas o con simetría bilateral, poseen dos verticilos uno externo de tres sépalos y uno interno de tres pétalos, de los cuales dos pétalos se disponen en los laterales y un pétalo en el medio el cual se encuentra modificado a este se lo conoce como labelo y suele ser de colores llamativos u ornamentales; normalmente la posición del labelo en las orquídeas se encuentra en la parte inferior debido a una etapa en su desarrollo que se lo conoce como resupinación, de esta manera se encuentra opuesta a la antera fértil demostrando el resultado de la adaptación a polinizadores específicos; usualmente suele presentar inflorescencias en forma de espiga, racimos o panículas, aunque algunas orquídeas poseen flores solitarias protegidas por una bráctea (Mosquera, 2012).



Las flores de la familia *Orchidaceae* en su mayoría presentan un androceo y un gineceo fusionados en una estructura llamada columna, que está formado por tres lóbulos estigmáticos, con un lóbulo mediano no receptivo conocido como rostelo en donde se secreta una sustancia pegajosa que ayuda en el proceso de polinización, también presentan una única antera fértil; en cuanto al polen este suele estar aglutinado en unidades discretas denominadas polinias, cuyas características suelen depender de su grupo taxonómico (Singer, 2009).

1.3 Taxonomía

La clasificación de las *Orchidaceae* de manera interna ha sido discutida durante siglos, ya que se basaba en características morfológicas como las flores, sin embargo, muchas de las especies que tienen flores similares no se encuentran cercanamente relacionadas. Es por ello que se han usado métodos de reconstrucción evolutiva de los organismos, además de información que se ha podido obtener con el avance de la tecnología como el ADN para establecer las relaciones filogenéticas de las especies en clasificaciones más naturales (Téllez, 2011).

De esta manera la clasificación taxonómica de la familia *Orchidaceae* de acuerdo con (Cronquist, 1981) se detalla en la **Tabla 1**

Tabla 1. Taxonomía de *Orchidaceae*

Reino	Plantae
Fhyllum	Angiospermas
Clase	Liliopsida
Subclase	Lilidae
Orden	Orchidales

Familia	<i>Orchidaceae</i>
----------------	--------------------

Fuente: (Cronquist, 1981).

Actualmente se reconocen cinco linajes dentro de las *Orchidaceae*, los cuales se consideran subfamilias y estas, en orden de aparición en el árbol evolutivo, son: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanilloideae*, *Orchidoideae* y por último *Epidendroideae* en la que pertenece *Restrepia* (Téllez, 2011).

2. Género *Restrepia*

El género *Restrepia* fue dedicado por Kunth a Don José Manuel Restrepo, colombiano destacado en historia y política (Tobar et al., 2018). Este pequeño género de orquídeas comprende 61 especies pertenecientes a la *Pleurothallidinae*, la sub-tribu más grande del *Orchidaceae*. Estas especies se encuentran en todo Centroamérica, además de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia en América del Sur, creciendo a alturas entre 1000 y 3000 m.s.n.m. en áreas del bosque lluvioso montano, los cuales han sido identificados como "puntos críticos" de deforestación (Millner et al., 2020).

Este género es de gran interés hortícola, el cual posee pequeñas flores pero que resultan muy atractivas, muchas de las especies pertenecientes a *Restrepia* están amenazadas con la disminución de la población o extinción por destrucción y fragmentación de sus hábitats, en donde los llamados "puntos calientes" de orquídeas que se encuentran en América del Sur coinciden con los centros de diversidad vegetal, como en los Andes ecuatorianos, de los cuales *Restrepia* es endémica, las epífitas constituyen el 30% de las especies de plantas vasculares en los puntos críticos de biodiversidad que pone a varios géneros de orquídeas en riesgo incluyendo a *Restrepia* (Millner et al., 2008).

2.1 Descripción botánica y morfológica

En general las orquídeas al ser muy diversas pueden ser epífitas, litófitas o plantas herbáceas perennes terrestres sin poseer estructuras leñosas permanentes, con un crecimiento simpodial o monopodial y muchas de ellas en su fase adulta pueden obtener carbono a través de la fotosíntesis, sin embargo, otros taxones necesitan de hongos para obtenerlo. Varias de estas especies producen bulbos y pseudobulbos como órganos de almacenamiento, presentan hojas planas que se pueden encontrar en diversas formas en el tallo e incluso pueden crecer sólo en la base de la planta (Śliwiński et al., 2022).

En cuanto a las Orquídeas del género *Restrepia* las principales características florales distintivas del género fueron documentadas por primera vez por Humboldt en 1816 y luego descrito con más detalle por Luer en 1996, en donde se debe tener en cuenta que todas las especies dentro de los géneros son similares con respecto a su estructura floral, un ejemplar típico del género es *R. brachypus* (Millner & Baldwin, 2016).

En este género las flores son solitarias, presentan los pétalos y el sépalo dorsal delgado y largo, los sépalos laterales están fusionados para formar un colorido sinsépalo, que es la parte más llamativa de la flor; el labelo es distintivo con un hipochilo cóncavo y un par de apéndices en la base (Tobar et al., 2018).

Como otros géneros en la sub-tribu, *Restrepia* es epífita y es caracterizado vegetativamente por un crecimiento simpodial, hojas coriáceas, brotes unifoliados, tallo de tipo ramicaule, carece de pseudobulbos y raíces velamentosas. *Restrepia* se distingue de otros géneros en la sub-tribu por la atenuación del sépalo dorsal y dos pétalos hasta ápices glandulares que producen olor, denominados osmóforos (Pridgeon & Stern, 1983).

Morfología del género *Restrepia*

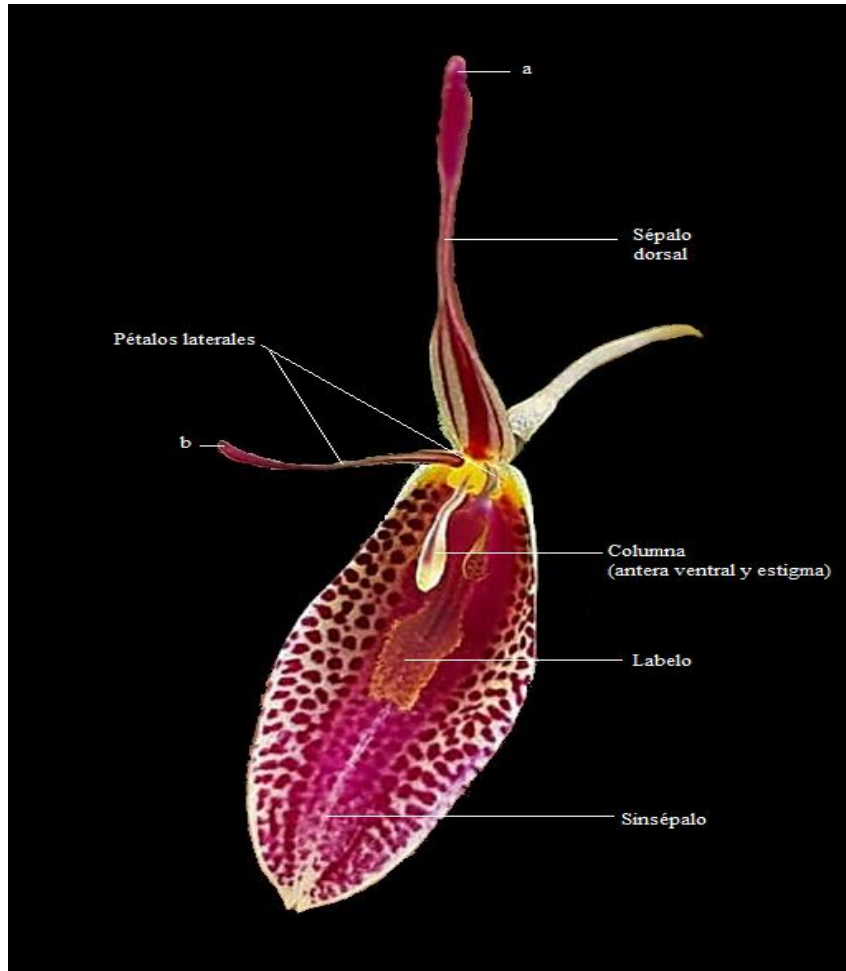


Figura 2. Descripción morfológica de *Restrepia*. Se ejemplifica: *Restrepia condorensis*













El sépalo dorsal y los pétalos laterales son alargados y filamentosos que contienen osmóforos (a y b).









Fuente: (Las autoras, 2022).

2.2 Especies Registradas en el Ecuador

De acuerdo con la base de datos Trópicos Missouri Botanical Garden y el Catálogo de plantas vasculares del Ecuador, existen 20 especies del género *Restrepia* registradas en el Ecuador las cuales se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Especies del género Restrepia registradas en el Ecuador

			
<p><i>Restrepia condorensis</i></p>	<p><i>Restrepia mendozae</i></p>	<p><i>Restrepia dodsonii</i></p>	<p><i>Restrepia mohrii</i></p>
			
<p><i>Restrepia ephippium</i></p>	<p><i>Restrepia iris</i></p>	<p><i>Restrepia schizosepala</i></p>	<p><i>Restrepia portillae</i></p>
			
<p><i>Restrepia teaguei</i></p>	<p><i>Restrepia howei</i></p>	<p><i>Restrepia cymbula</i></p>	<p><i>Restrepia contorta</i></p>

 <p><i>Restrepia antennifera</i></p>	 <p><i>Restrepia brachypus</i></p>	 <p><i>Restrepia lansbergii</i></p>	 <p><i>Restrepia piperitosa</i></p>
 <p><i>Restrepia flosculata</i></p>	 <p><i>Restrepia guttulata</i></p>	 <p><i>Restrepia muscifera</i></p>	 <p><i>Restrepia trichoglossa</i></p>

Fuente: (IOSPE, 2022; OrchidRoots, 2022).

3. Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular permiten analizar los ácidos nucleicos para la detección e identificación de diferentes genotipos y genes de importancia en las distintas investigaciones, para ello se realiza extracciones de ADN o ARN, posteriormente se realiza el análisis cuantitativo o cualitativo verificando la cantidad o presencia de lo extraído, luego se amplifica la región de interés con el uso de primers específicos a través de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y finalmente se procede a secuenciar, tomando en cuenta que la purificación en el proceso garantiza que no existan inhibidores o sustancias contaminantes que impidan la realización de la técnica molecular (Díaz, 2020; Miño, 2018).

La palabra secuenciación hace referencia al análisis de distintas entidades moleculares con el propósito de establecer su composición nucleotídica (Adenina, Guanina, Citosina y Timina) en un orden específico y de una manera precisa, esta técnica ayuda a analizar genomas completos, exomas, el transcriptoma, paneles de genes y patrones genómicos de metilación (Mordoh, 2019). Para ello se encuentran varios métodos de laboratorio como los desarrollados por Roche-454 (pirosecuenciación), Ion Torrent (secuenciación por semiconductores), Illumina/Solexa (secuenciación con terminadores reversibles), SOLiD (secuenciación por ligamiento) y el método Sanger que comúnmente se utiliza para ADN BARCODE (Oyhenart, 2013; Suárez, 2015; Valderrama et al., 2020).

4. Marcadores moleculares en orquídeas

Un marcador molecular es un segmento de ADN perteneciente a un gen o una región de este en el que se puede identificar sus variantes (alelos) y su ubicación física en los cromosomas, es decir el locus en él (Esperbent, 2018). Las diferencias que se encuentran en estos segmentos se los llama polimorfismos y se pueden determinar por secuenciación de nucleótidos, hibridación de secuencias de ácidos nucleicos, por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y también por enzimas de restricción (Cortés et al., 2020). Existen dos tipos de marcadores los morfológicos que fueron los más utilizados, pero cuya identificación no era muy correcta ya que se basaba en rasgos físicos de la planta, y los marcadores moleculares los cuales presentan polimorfismos morfológicos y se pueden ver desde que la planta se encuentra en desarrollo (Azofeifa, 2006).

Dentro de los marcadores moleculares se encuentran dos tipos: los marcadores bioquímicos como las proteínas en donde se encuentran las isoenzimas que son variantes de una enzima y comparten un sustrato pero poseen diferente movilidad electroforética y su variabilidad es producida por factores genéticos o epigenéticos; el segundo grupo de marcadores es el de ADN

y en este se incluyen tres grupos, el primero basado en locus específicos como son los RFLPs, CAPs, SSRs, SNPs, VNTR, etc., los cuales suelen realizarse mediante la técnica de hibridación tipo Southern; el segundo grupo basado en amplificaciones al azar como RAPDs, ISSRs, AFLPs, DAF, etc., este tipo de marcadores suelen ser usados en técnicas como la PCR con la ayuda de cebadores específicos; y finalmente, están los RAHM y RAMPO (amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites) los cuales combinan las técnicas de PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern (Azofeifa, 2006; Solís & Andrade, 2005).

Además se tienen cuatro tipos de ADN en los cuales se encuentran gran cantidad de polimorfismos, entre estos genomas se incluye el ADN nuclear (ADN_n), que representa el 99% del contenido de la célula encontrándose empaquetado y asociado a proteínas histonas, conformando así los cromosomas; el ADN mitocondrial (ADN_{mT}) tiene un tamaño que varía entre especies pero que va desde los 15 a los 17 kb, este tipo de ADN en algunos hongos y plantas no codifica debido a que se encuentra formado por intrones y el de los animales carece de intrones por lo que se transcriben como ARN policistrónico que se divide en ARN monocistrónico antes de la traducción (Méndez & González, 1997).

Por otro lado el ADN ribosomal (ADN_r) contiene la información para el ARN por lo que su información no se traduce solo se transcribe, y finalmente el ADN de cloroplasto (ADN_{cl}) que es una molécula circular de ADN de doble cadena y que contiene intrones y exones, se lo considera muy conservado porque es el mismo genoma desde las plantas hepáticas hasta las plantas superiores que codifican para proteínas de la maquinaria fotosintética, además, tanto las moléculas de las mitocondrias como las de los cloroplastos son las que ayudan a generar historias filogenéticas y de estructura poblacional genética relacionadas al linaje, por su herencia uniparental además de que no recombinan (Espinosa & Chávez, 2019).

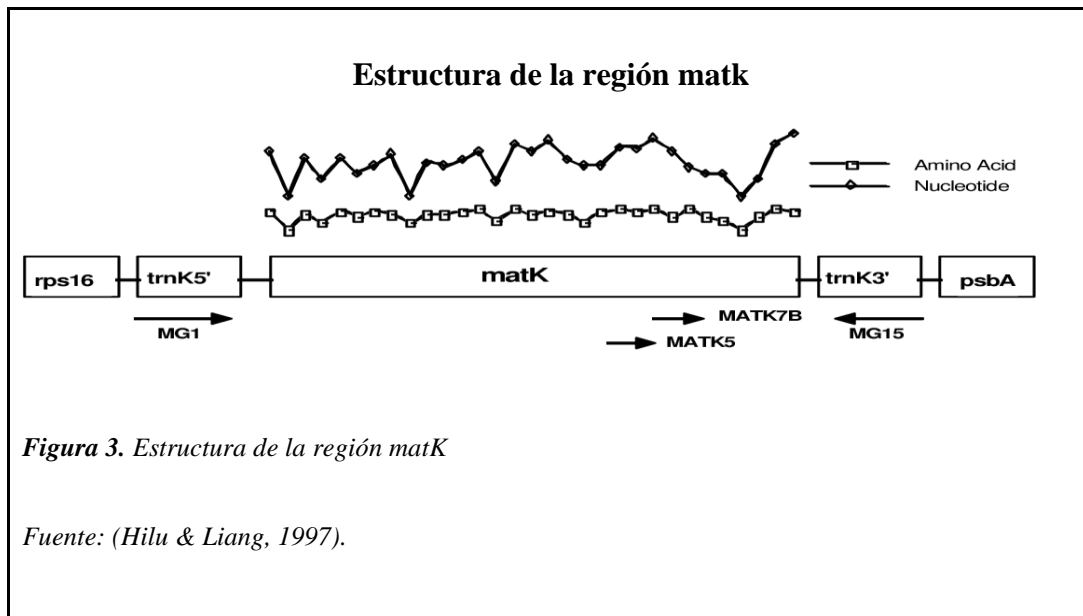
Entonces el uso de marcadores moleculares contribuye en estudios de relaciones filogenéticas ya sea en plantas, animales u otros seres vivos, en el caso de las plantas los marcadores moleculares más utilizados son los que se encuentran en algunas regiones del genoma del cloroplasto como *atpF-H*, *gen matK*, *psbK-I*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1* y *trnH-psbA* los cuales han demostrado ser buenos candidatos en este tipo de estudios (Iza, 2018).

Mark Chase fue el precursor de realizar análisis moleculares en orquídeas, contribuyendo así en la taxonomía durante más de 10 años usando el marcador molecular del cloroplasto *rbcL*, logrando evitar y rectificar los errores que se cometen al identificar, impulsando la información en el área botánica (Aguilar et al., 2003). Lahaye en el 2008 sugirió que el gen *matK* era el código de barras universal preferido para plantas con flores, incluidas las orquídeas y reafirmó el mejor potencial de esta región (Vu et al., 2017). Sin embargo, existen otros marcadores moleculares utilizados para el análisis de la familia (*Orchidaceae*) como lo son: *ycf-1* y *ndhf* (Londoño, 2021).

4.1. Gen *matK*

El gen *matK*, antes llamado como *orfk*, es un gen del cloroplasto que codifica la proteína maturasa, la cual está involucrada en el empalme (splicing) de intrones grupo II siendo un factor de maduración del pre-ARNm (Hilu & Liang, 1997). Esta secuencia codificante es una de las que posee mayor rapidez en la evolución del genoma plástido (Orozco et al., 2019).

El segmento del gen *matK* tiene un tamaño aproximado de 1570 pb y se lo encuentra en un intrón del gen cloroplasto *trnK* (Miño, 2018). Su ORF tiene alrededor de 1500 pb aproximadamente permite la formación de 500 aminoácidos, la gran variabilidad que se encuentra en sus nucleótidos es mayor que en el *rbcL*, por lo que puede generar un número mayor de informes de parsimonia y una fuerte señal filogenética (Albán & Toapanta, 2019).



4.2. Gen *rpoC1*

El gen *rpoC* codifica la subunidad β de la ARN polimerasa en un cloroplasto, esta región es similar a la unidad de ARN polimerasa de *Escherichia coli*; el gen *rpoC* se divide en dos genes *rpoC1* y *rpoC2*, estos se encuentran dentro de la gran región de una sola copia del genoma plástido en la mayoría de las angiospermas, participando en el proceso de transcripción de los genes cloroplásticos, específicamente el gen *rpoC1* tiene alrededor de 500 - 750 pb y está rodeado de regiones flanqueantes de porciones de genes como *rpoB* y *rpoC2*; (Downie & Katz, 1996).

Organización estructural del gen *rpoC1* del cloroplasto y regiones flanqueantes

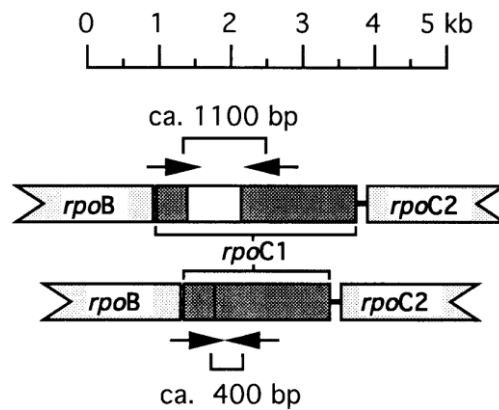


Figura 4. Estructura del gen *rpoC1*

Fuente: (Downie & Katz, 1996).

5. Filogenia

La filogenia se refiere al estudio de la evolución a través del tiempo de un grupo biológico, esta palabra fue acuñada por Haeckel y a partir de esto se permitió establecer clasificaciones y representarlas de manera confiable, comenzando a finales del siglo XIX el uso de árboles evolutivos; para poder reconstruir una filogenia es importante contar con un grupo interno que corresponden a las especies de interés, versus un grupo externo que son especies cercanamente emparentadas al grupo de interés pero lo suficientemente distinta para encontrarse fuera del grupo que permite enraizar el árbol filogenético, permitiendo definir la dirección del cambio de los estados de un carácter (Sosa, 2009).

Al usar secuencias de ADN, es relevante realizar un alineamiento organizando las secuencias para una mejor visualización de la comparabilidad y compatibilidad entre las mismas, posteriormente se debe seleccionar el modelo evolutivo que mejor se acople al estudio para un análisis correcto, para ello se hace uso de programas bioinformáticos que facilitan estas tareas (Leopardi & Escobedo, 2021).

La bioinformática ayuda a comprender las correlaciones, la estructura y los patrones de los datos biológicos, esto debido al conjunto de varias disciplinas como la informática, las matemáticas, la estadística, la química y las ciencias biológicas no tradicionales, que junto a las técnicas computacionales ayudan a realizar proyectos de descubrimiento y desarrollo de fármacos, análisis del genoma y control biológico entre otros; para ello se analizan las secuencias de ADN para encontrar similitudes o diferencias tanto funcionales como estructurales de múltiples secuencias biológicas; este tipo de análisis nos permite alinear secuencias, buscar en bases de datos de secuencias, descubrir patrones, reconstruir relaciones evolutivas, además de formar y comparar el genoma (Meneses et al., 2011).

Materiales y Métodos

1. Recolección de muestras

El material vegetal estudiado pertenece a especies de orquídeas del Ecuador del género *Restrepia*, las cuales fueron recolectadas de la colección privada de Alberto Guerrero ubicada en Pichincha y contiene especímenes de todo el Ecuador.

Para la recolección de las 24 muestras se seleccionaron las hojas jóvenes, sanas y que no poseían daños mecánicos. Cada muestra se almacenó en bolsas de papel Kraft etiquetadas, se transportaron al laboratorio y se almacenaron en un congelador a -20°C , hasta su análisis.

2. Georreferenciación

Para el análisis de georreferenciación se empleó el programa DIVA GIS 7.5. Primero se obtuvo información de la distribución de especies del género *Restrepia* en el Ecuador mediante la plataforma GBIF que está vinculada a la base de datos Trópicos en la que se obtuvo las coordenadas (latitud y longitud) de las 20 especies registradas en el país, posteriormente se subieron los datos obtenidos al programa diferenciando las especies endémicas para finalmente tener una representación visual que incluye el mapa, los puntos de distribución de *Restrepia* y su respectiva escala.

3. Estudio molecular

El proceso experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana ubicado en el campus Norte de la ciudad de Quito, en el campus el Girón, durante el período abril-junio del 2022.

3.1 Extracción de ADN

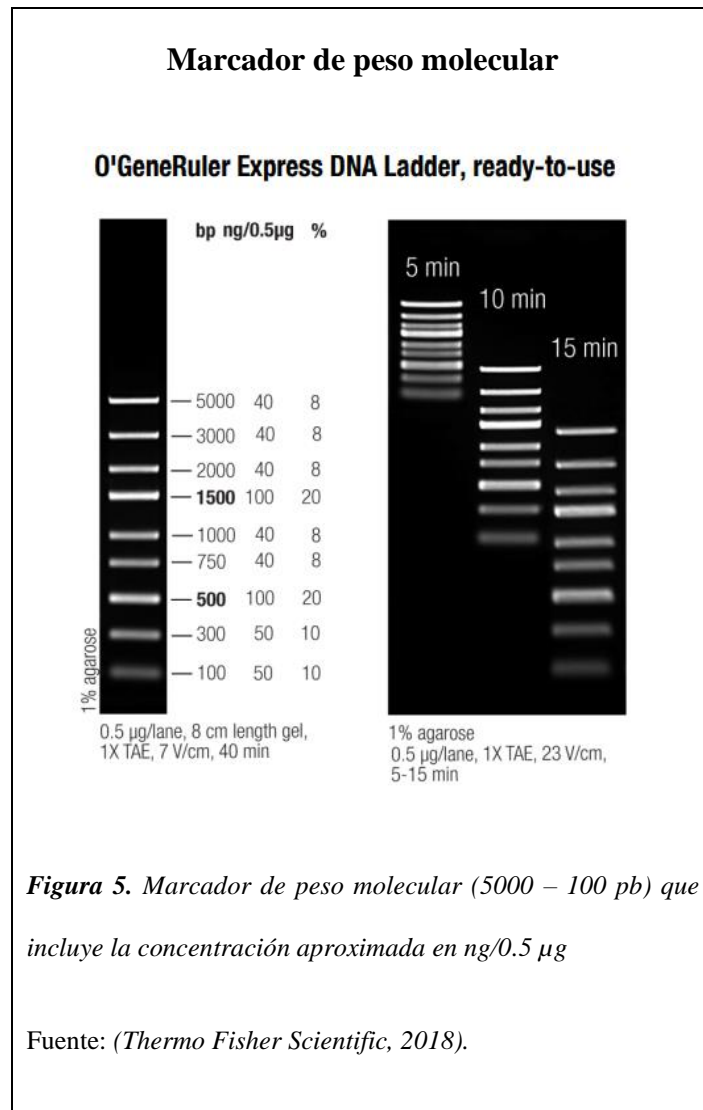
Para la extracción de ADN total se probó dos protocolos; el método Doyle & Doyle (1987), modificado por Iza (2018) y las autoras (2022) en el cual se inició macerando 50 mg de muestra en microtubos de 1.5 mL con 480 μ L de Buffer de Lisis y macerando con un pistilo colocado en un Taladro atornillador GSR 1000 Smart marca BOSCH hasta que se obtuvo una mezcla homogénea, luego se añadió 75 μ L de Dodecilsulfato sódico SDS 10%, y se mezcló por inversión de 5 a 8 veces, posteriormente se incubó la solución en un termo bloque de Thermo Scientific™ por 25 minutos a 65°C; transcurrido ese tiempo se añadió 94 μ L de acetato de potasio (5M) y se realizó inversión de 5 a 8 veces, luego se refrigeró por 2 horas; después se centrifugó por 5 minutos a 12 000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo de 1.5 mL y se añadió 600 μ L de fenol: cloroformo (1:1), se centrifugó nuevamente a 12 000 rpm por 5 minutos, aquí se transfirió la fase intermedia (250 μ L aproximadamente) con una micropipeta en un nuevo microtubo de 1.5 mL, evitando tomar las proteínas precipitadas, posteriormente se añadió 200 μ L de isopropanol frío, agitando por inversión de 5 a 8 veces, finalmente se almacenó a -20°C por toda la noche; una vez terminado el tiempo se centrifugó las muestras durante 3 minutos a 12 000 rpm, observándose el pellet en la parte final del tubo, se eliminó el sobrenadante mediante inversión, se ejecutaron tres lavados añadiendo 300 μ L de etanol (70%) y centrifugando cada vez por 3 minutos a 12 000 rpm, luego se usó del termo bloque a 37°C para evaporar el alcohol restante y así resuspender el pellet en 30 μ L de TE 1X y almacenarlo a -20°C.

El segundo método fue mediante el kit *Phire Plant Direct PCR Master de Thermo Fisher Scientific*, en el que consistió simplemente en colocar un trozo de muestra de aproximadamente 2 mm en un tubo de 1.5 mL y se agregó 20 μ L del buffer dilution, luego con una punta de micropipeta se trituró el material vegetal para extraer el ADN.

3.2 Electroforesis

Para la evaluación cualitativa de ADN se realizó una electroforesis horizontal según el protocolo descrito por (Lee et al., 2012), para ello, se preparó un gel de agarosa para una cámara de electroforesis de 50 mL, con un gel de agarosa al 1%, para el cual se pesó 0.5 g de agarosa grado biología molecular de *Thermo Scientific* y se mezcló con 50 mL de tampón TBE 1X en un frasco boeco de 250 mL, posteriormente se calentó la mezcla en un horno microondas por alrededor de 1.3 minutos hasta que se disolvió la agarosa, se dejó enfriar hasta unos 60 °C y se añadió 0.25 µL del fluorocromo SafeView™ Classic; luego se colocó la solución en el molde con el peine que contiene 28 pocillos, finalmente se dejó reposar hasta que se gelifique y se retiró el peine cuidadosamente para colocarlo en la cámara de electroforesis, luego se cubrió el gel con TBE 1X.

En la preparación de muestras se tomó 1 µL de tampón de carga Blue Juice 2X con 4 µL de cada muestra y para el marcador genómico se colocó 2 µL de Ladder (O' GeneRuler Express DNA Ladder 100 a 5000 pb y 40-100 ng/0.5 µg de Thermo Fisher Scientific). Se corrió la electroforesis por 30 minutos a 100 V en la cámara de electroforesis *Labnet*, finalmente se reveló el gel en el fotodocumentador *Bio-imaging systems®* y se registraron los resultados (Rivas & Salazar, 2017).



3.3 Amplificación de ADN

Para la amplificación de las regiones cloroplásticas se usó la técnica de PCR (Reacción en cadena de polimerasa) convencional en un termociclador *ProFlex PCR System, Applied Biosystems-USA*, empleando el kit *Phire Plant Direct PCR Máster de Thermo Fisher Scientific* como se describe en la **Tabla 3**.

La región cloroplástica como es el gen *matK* se amplificó con los primers forward (5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3') y reverse (5'-

GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3') y para el gen *rpoC1* se utilizaron los primers forward (5' GTGGATACACTTCTTGATAATGG 3') y para el reverse (5' TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC 3') (Mongrovejo & Proaño, 2020; Montalvo & Vargas, 2019).

Tabla 3. Componentes de la reacción PCR con Phire Plant Direct PCR para región *rpoC1* y *matK*

Componente	Vol (µL) para 1 muestra
Phire Plant Direct PCR Master mix	12.5
Primer forward (10 uM)	1
Primer reverse (10 uM)	1
Agua de PCR	6.5
MgCl ₂	1
ADN	3
Volumen total mix	25
Volumen final de reacción	25

Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2018). Modificado por las autoras.

Para establecer las condiciones de amplificación para la región cloroplástica *matK* y *rpoC1* se realizó el cálculo de la T_m mediante el programa OligoAnalyzer™ Tool y posteriormente se calculó la temperatura de annealing, la cual sirvió de base para realizar las gradientes de temperaturas para cada marcador molecular en el termociclador Labnet multigene Gradiente y los cuales se detallan en la **Tabla 4** para *matK* y en la **Tabla 5** para *rpoC1*.

Tabla 4. Condiciones de la PCR para *matK*

		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		98 °C	5 minutos
40 ciclos	Desnaturalización	98 °C	10 segundos
	Annealing (gradientes de temperatura)	47.5	10 segundos
		50.7	
		52.1	
		53.5	
Extensión	72 °C	40 segundos	
Extensión final		72 °C	10 minutos
Mantenimiento		4 °C	∞

Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2018). Modificado por las autoras.

Tabla 5. Condiciones de la PCR para *rpoC1*

		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		98 °C	5 minutos
40	Desnaturalización	98 °C	10 segundos
	Annealing (gradientes)	47.4	10 segundos

ciclos	de temperatura)	48.7	
		50.7	
		52.1	
		53.5	
	Extensión	72 °C	40 segundos
Extensión final		72 °C	10 minutos
Mantenimiento		4 °C	∞

Fuente: (Thermo Fisher Scientific, 2018). Modificado por las autoras.

Los resultados de las amplificaciones de PCR se examinaron por medio de electroforesis horizontal, en cada pocillo se cargó 2 μ L de producto de PCR sin adicionar tampón de carga en geles de agarosa al 1% teñido con el fluoróforo (SafeView™ Classic) con las mismas condiciones descritas anteriormente.

4. Filogenia

Para los análisis bioinformáticos realizados primero se descargaron 16 secuencias de la base de datos GenBank de especies de *Restrepia* de las cuales existía información del gen *matK* y se seleccionó como grupo externo *Dracula alcithoe*, ver **Anexo 3**, posteriormente se realizó un alineamiento de las 17 secuencias en el programa Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y se usó un programa en línea GBlock para analizar los alineamientos y cortar las secuencias, manteniendo las regiones más conservadas, una vez procesadas las secuencias obtenidas, se obtuvieron 2 árboles filogenéticos aplicando dos métodos de reconstrucción filogenética: Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayeasiana.

Para el método de Máxima Verosimilitud (ML), se usó las secuencias previamente cortadas en Gblock, en el programa Mega considerando el modelo evolutivo T92 (Tamura 3-parameter) proporcionado por este mismo programa, luego se procedió a realizar los árboles filogenéticos con un Bootstrap de 500 para el marcador molecular *matK*.

Para el método con Inferencia Bayesiana se utilizó el programa Beauti para establecer el grupo externo y el grupo de estudio, se seleccionó el modelo de sustitución HKY, debido a que el modelo evolutivo T92 no estaba disponible en la aplicación. En las condiciones para el método de MCMC (Monte Carlo con Cadenas de Markov) se estableció un valor de 1000 para la cantidad de cadenas generadas y para la frecuencia de muestreo.

Para generar el árbol filogenético se subieron los datos anteriormente procesados al programa BEAST versión v1.10.4 y finalmente se observó el árbol consenso obtenido en el programa FigTree v1.4.4 con los valores correspondientes de probabilidad posterior.

Resultados y discusión

1. Colección de muestras

La colección de muestras de tejido foliar de las especies registradas en el Ecuador del género *Restrepia* se realizó en la colección privada de Alberto Guerrero, obteniendo 24 muestras para el estudio.

Tabla 6. Listado de plantas del género *Restrepia* colectadas para el estudio

Número de muestras	Nombre científico	Código de colección	Lugar de colección de muestras por Alberto Guerrero	Lugar de registro
1	<i>R. iris</i>	4437	Zamora Chinchipe	Zamora Chinchipe
2	<i>R. contorta</i>	4438	Jardín botánico	Azuay, Pichincha, Zamora Chinchipe
3	<i>R. guttulata</i>	4439	Perucho	Carchi, Imbabura, Pichincha.
4	<i>R. flosculata</i>	4440	Ecuagenera	Carchi, Imbabura
5	<i>R. brachypus</i>	4441	Ecuagenera	Carchi, Morona Santiago, Pichincha, Tungurahua
6	<i>R. teaguei</i>	4442	Magalli Portilla	Zamora Chinchipe
7	<i>R. condorensis</i>	4443	Mario Portilla	Zamora Chinchipe
8	<i>R. portillae</i>	4444	Ecuagenera	Morona Santiago
9	<i>R. mendozae</i>	4445	Ecuagenera	Zamora Chinchipe
10	<i>R. schizosepala</i>	4446	Checa-Juan Galarza	Sucumbíos
11	<i>R. lansbergii</i>	4447	Ecuagenera	Pastaza, Tungurahua.
12	<i>R. howei</i>	4448	Mario Portilla	Ecuador
13	<i>R. seketi</i>	4449	San Francisco Baños	Colombia
14	<i>R. mohrii</i>	4450	Ecuagenera	Ecuador

15	<i>R. piperitosa</i>	4451	Alex Hirtz	Pichincha, Quito
16	<i>R. antennifera</i>	4452	Ecuagenera	Azuay, Imbabura, Morona Santiago, Pichincha y Tungurahua
17	<i>R. cymbula</i>	4453	Valladolid Loja	Ecuador
18	<i>R. dodsonii</i>	4454 (R0997BL)	El Cisne Loja	Pichincha
19	<i>R. ephippium</i>	4455	Zamora	Imbabura
20	<i>R. muscifera</i>	4456	Harry Zelenco	Ecuador
21	<i>R. trichoglossa</i>	4457	Perucho	Carchi, El Oro, Manabí.
22	R942LO	4458	Loja	Pichincha
23	R1104ZA	4459	Zamora Chinchipe	Ecuador
24	R6525F (ma4449)	4460	San Francisco Baños	Colombia

Nota: La ubicación referencial de las muestras fueron proporcionadas por Alberto Guerrero, además de la información obtenida de la base de datos Trópicos.

Fuente: (Las Autoras, 2022).

2. Georreferenciación

La información proporcionada por la base de datos Trópicos (2022) permitió establecer las zonas de distribución del género *Restrepia* en Ecuador. En donde este género se encuentra ubicado mayormente en la zona central del Ecuador como se puede observar en la **Figura 6; Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Esto se debe a que en la parte central del Ecuador donde se observan la mayor distribución de especies del género *Restrepia*, pertenece mayormente a la sierra, la cual se encuentra en una altura alrededor de 1800 a 6268 m.s.n.m y también se encuentran en una parte de la Amazonía la cual su altura máxima suele encontrarse entre los 1000 m.s.n.m (Portilla, 2018). Y como lo

establece Mittermeier et al. (1999) este género de orquídeas se desarrolla en alturas de 1000 y 3000 m.s.n.m. en áreas del bosque lluvioso montano.

Distribución de las especies del género *Restrepia* en el Ecuador

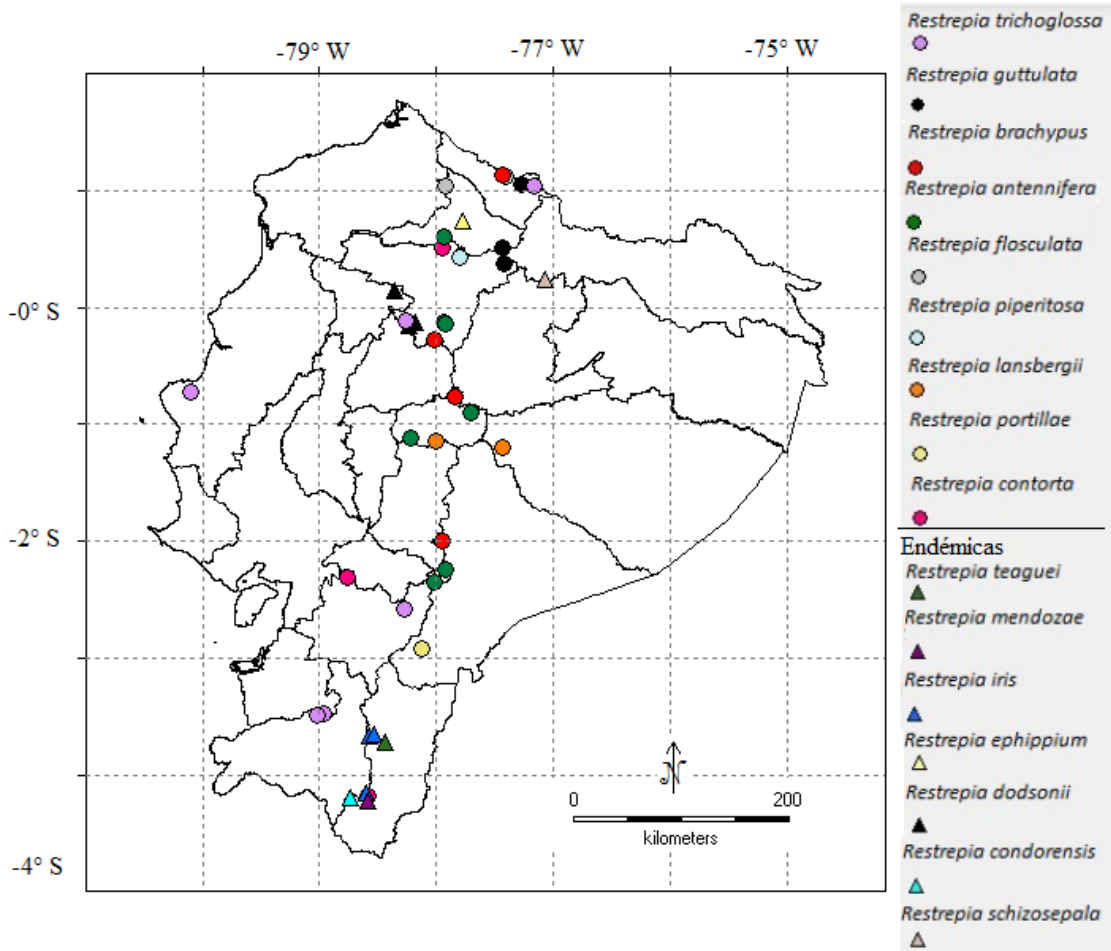


Figura 6. Distribución de las especies del género *Restrepia* en el Ecuador

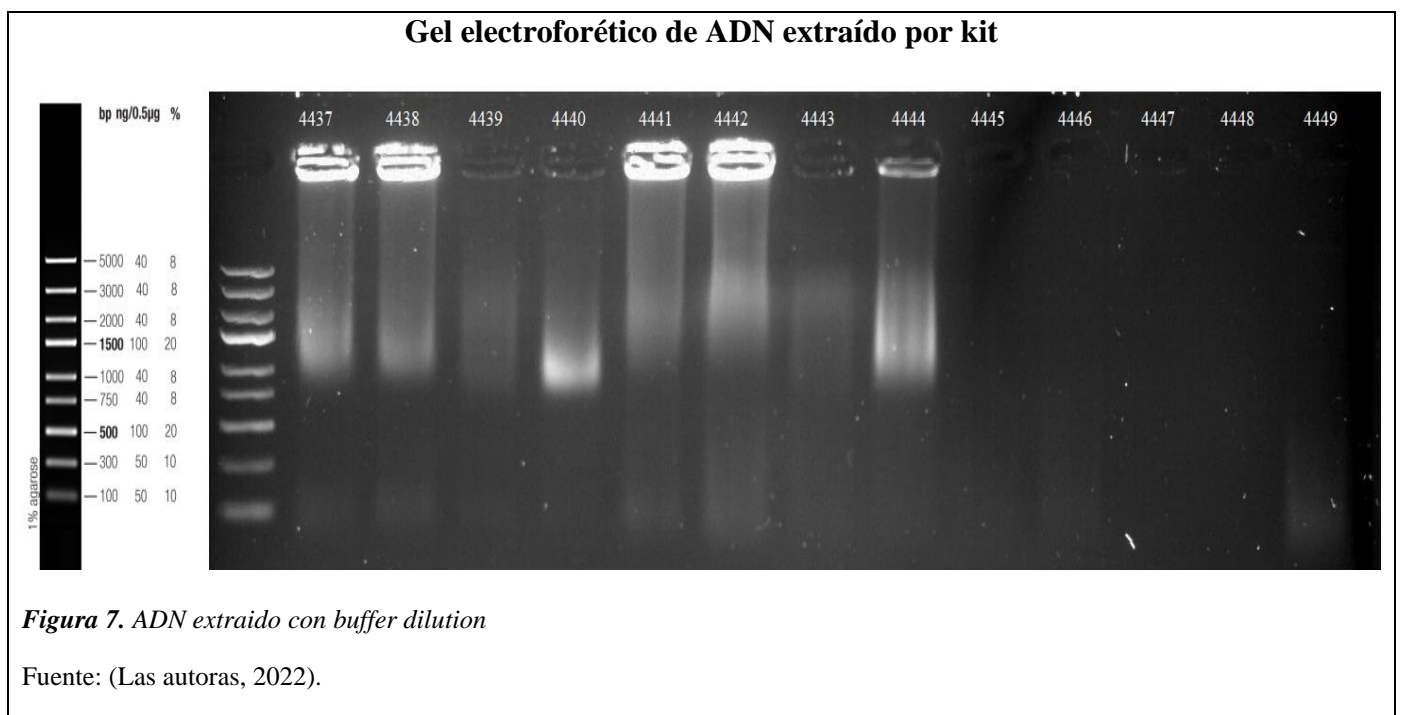
R. antennifera distribuida en las provincias de Azuay, Imbabura, Morona Santiago, Pichincha y Tungurahua; *R. brachypus* en Carchi, Morona Santiago, Pichincha, Tungurahua; *R. condorensis* en Zamora Chinchipe; *R. contorta* en Azuay, Pichincha, Zamora Chinchipe; *R. dodsonii* en Pichincha; *R. ephippium* en Imbabura; *R. flosculata* en Imbabura, Carchi; *R. guttulata* en Imbabura, Pichincha; *R. iris* en Zamora Chinchipe; *R. lansbergii* en Pastaza y Tungurahua; *R. mendozae* en Zamora Chinchipe; *R. piperitosa* en Pichincha; *R. portillae* en Morona Santiago; *R. schizosepala* en Sucumbíos; *R. teaguei* en Zamora Chinchipe; y *R. trichoglossa* en Pichincha, Carchi, El Oro y Manabí.

Fuente: (Las Autoras, 2022).

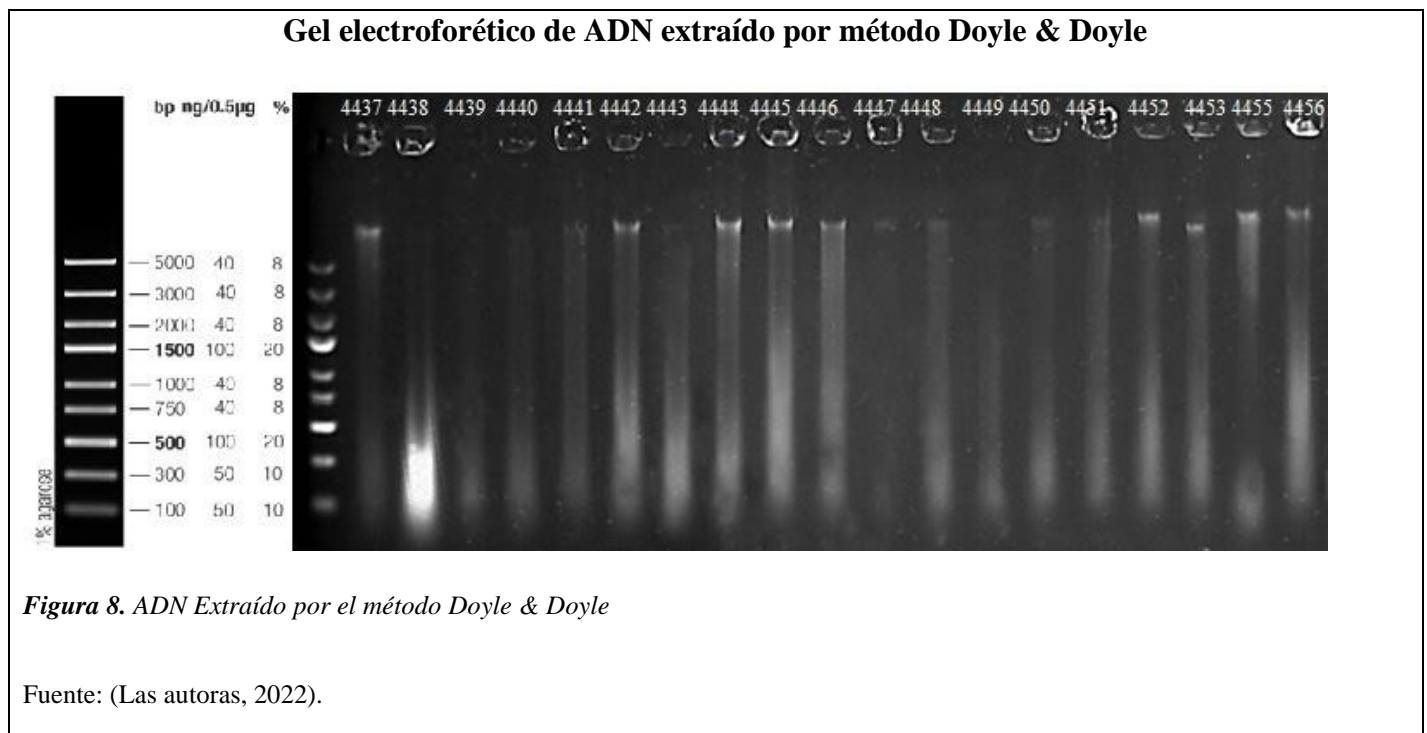
3. Estudio molecular

3.1. Extracción de ADN

Se usó los dos métodos para la extracción de ADN, sin embargo, solo se obtuvo ADN de las 24 muestras colectadas usando el protocolo de Doyle & Doyle (1987), ya que con el uso del buffer dilution de un solo paso se evidenció barridos sin presencia de bandas definidas de ADN como se puede observar en la **Figura 7**, Esto pudo deberse a que la efectividad de los kits depende del tipo de tejido con el que se trabaja y la capacidad de unión de la membrana como lo establece Alejos et al. (2018), en este caso el género *Restrepia* presenta hojas gruesas, por lo cual necesitan una extracción en la que se aplique una parte mecánica y una con varios solventes para poder obtener el ADN de manera adecuada, también se debe tener en cuenta la diferencia de los métodos en cuanto a la ruptura mecánica, se usó un taladro con un pistilo en el método convencional y una punta de micropipeta en el método por kit. Cabe destacar que el empleo de material fresco fue sumamente importante para el éxito de la extracción debido a que es fácil de romper (Iza, 2018).



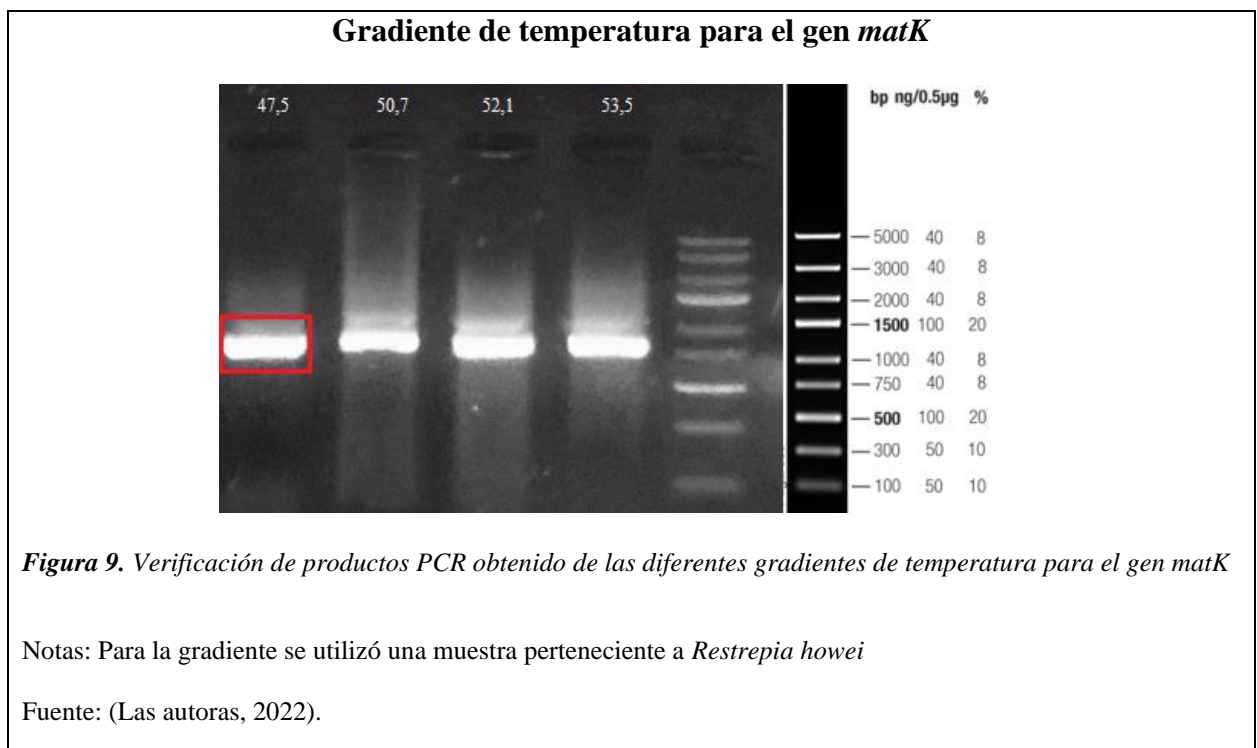
En las bandas obtenidas con el método Doyle & Doyle (1987) de la **Figura 8** se evidencian cadenas de ADN de más de 5000 pb y una concentración de 40-100 ng/μL aproximadamente, es importante resaltar que en la corrida electroforética se observaron barridos evidenciándose degradación del ADN y compuestos contaminantes, esto se debe a que el tipo de tejido que se usó para la extracción poseía material de reserva, ya que el género *Restrepia* utiliza sus hojas coriáceas para almacenar agua a diferencia de otros géneros de orquídeas que si poseen pseudobulbos que sirven para conservar la humedad (Freuler, 2003; Schneider, 1958); este tejido parenquimático de reserva mencionado puede almacenar varias sustancias entre ellas almidón, gránulos, cristales de proteína, gotas lipídicas y agua (Chuncho et al., 2019).



3.2. Amplificación de ADN

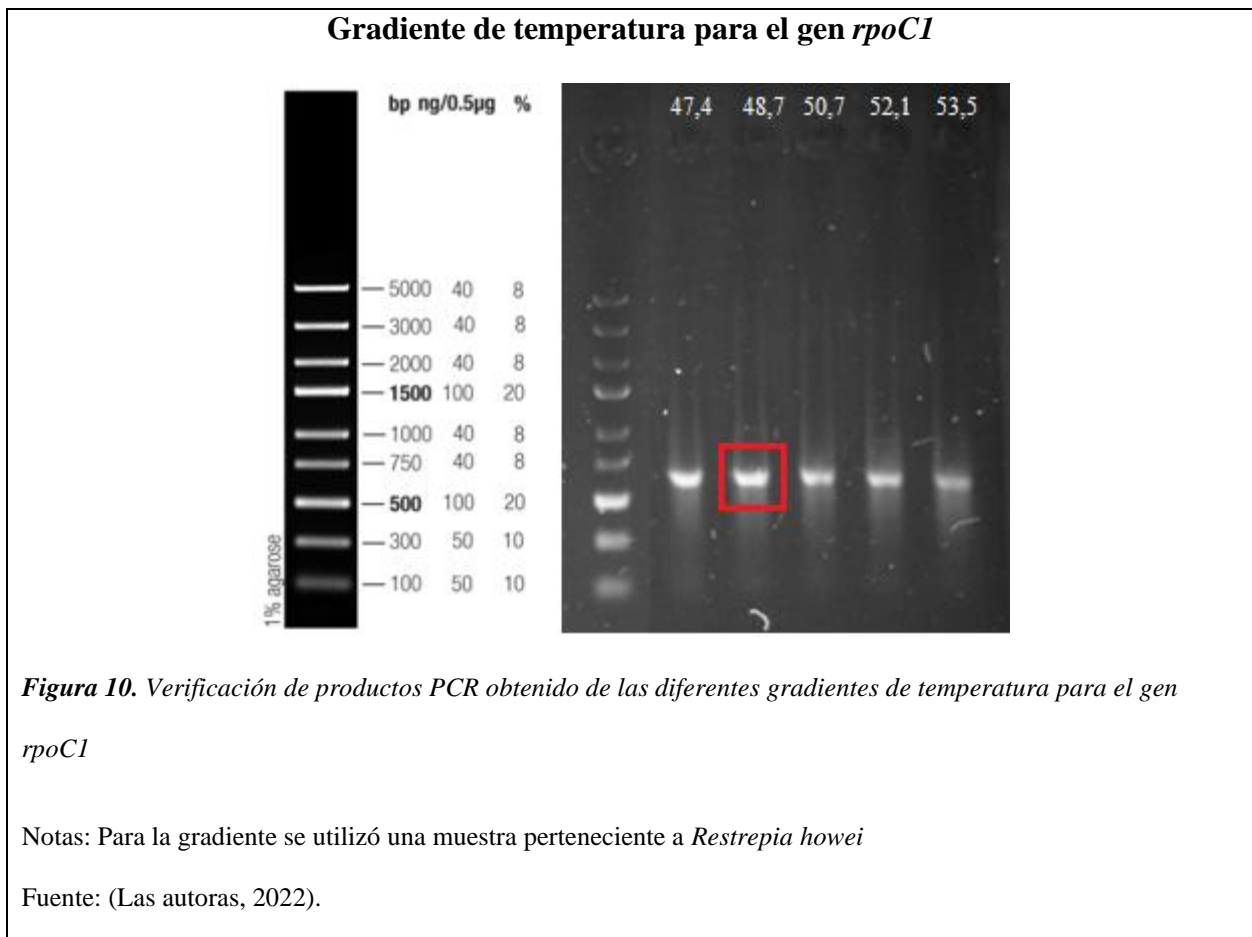
Debido a que en la extracción de ADN con el método de un solo paso no se observó presencia de bandas definidas, para la amplificación se usó solamente el método Doyle & Doyle. Para la gradiente de temperatura de *matK* se probaron cuatro temperaturas de las cuales todas se amplificaron, sin embargo, se seleccionó 47.5 °C como temperatura ideal debido a que fue la única que no presentó doble banda como se evidencia en la **Figura 9**.

La temperatura de annealing seleccionada es baja, esto se debe a los primers utilizados para la amplificación, ya que al calcular sus temperaturas de melting estas dan como resultado 53.9°C para el forward **Anexo 6** y 51.1°C para el reverse **Anexo 7** y al restar los 5°C para obtener la temperatura de aneling este valor decrece, esto se debe a la característica del porcentaje de guaninas y citocinas que debe estar entre un 50%-60%, y en este caso está en valores menores al 45%, característica no ideal de los primers al momento de diseñarlos (Hernández & Valdez, 2017). A pesar de esta baja temperatura, si se obtuvo bandas en la amplificación, esto concuerda con Checa (2018) y Bolívar et al. (2014) en el que manifiesta que se pueden usar temperaturas de annealing, que van entre los 45° a los 68 °C con una duración de entre 15 a 60 segundos, con el uso específico de programas para calcular su temperatura, explicando que los primers se pegaron correctamente.



Para la gradiente de temperatura para *rpoC1* se probaron cinco temperaturas de las cuales todas se amplificaron correctamente, sin embargo, se seleccionó 48.7 °C como temperatura ideal por su mayor concentración cualitativa que se observó en el gel (**Figura 10**).

La temperatura de annealing para el gen *rpoC1* se seleccionó de la misma manera que para la región *matK* usando el programa Oligo Analyzer, ver **Anexo 8** y **Anexo 9**.



Se amplificaron las 24 muestras con el marcador molecular *matK* y 23 muestras con el marcador *rpoC1* con la temperatura de hibridación de 47.5 °C y 48.7 °C respectivamente para cada marcador, estas temperaturas fueron seleccionadas después de una amplificación en gradiente para cada marcador.

El marcador *matK* se puede observar en las bandas obtenidas en la **Figura 11**, **Figura 12** las cuales demuestran cadenas entre 750 – 1000 pb y una concentración entre 50 a 100 ng/µL, de igual manera se puede observar las bandas obtenidas en la **Figura 12** con el marcador *rpoC1*, las cuales demuestran cadenas de entre 500 – 750 pb y una concentración de 50 a 100 ng/µL; el tamaño de los amplicones es correspondiente a los obtenidos por otros autores para los mismos genes *matK* y *rpoC1* (Mongrovejo & Proaño, 2020).

Gel electroforético de productos PCR del gen *matK*

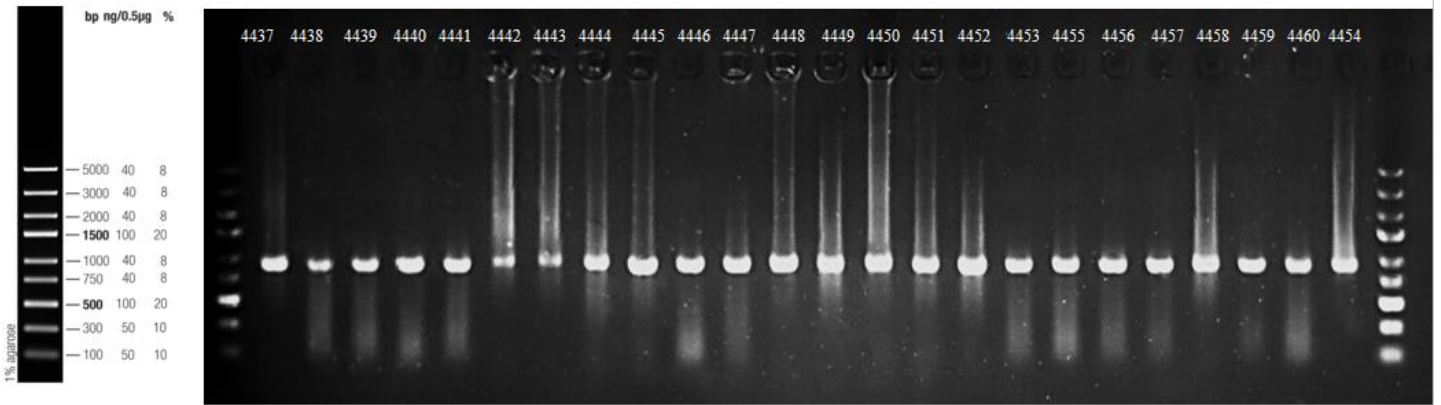


Figura 11. Productos amplificados con el marcador molecular *matK*

Nota: Se visualizan los carriles marcados del 4437 al 4460 y un marcador de peso molecular de 100 a 5000 pb en cada extremo.

Fuente: (Las Autoras, 2022).

Gel electroforético de productos PCR del gen *rpoC1*

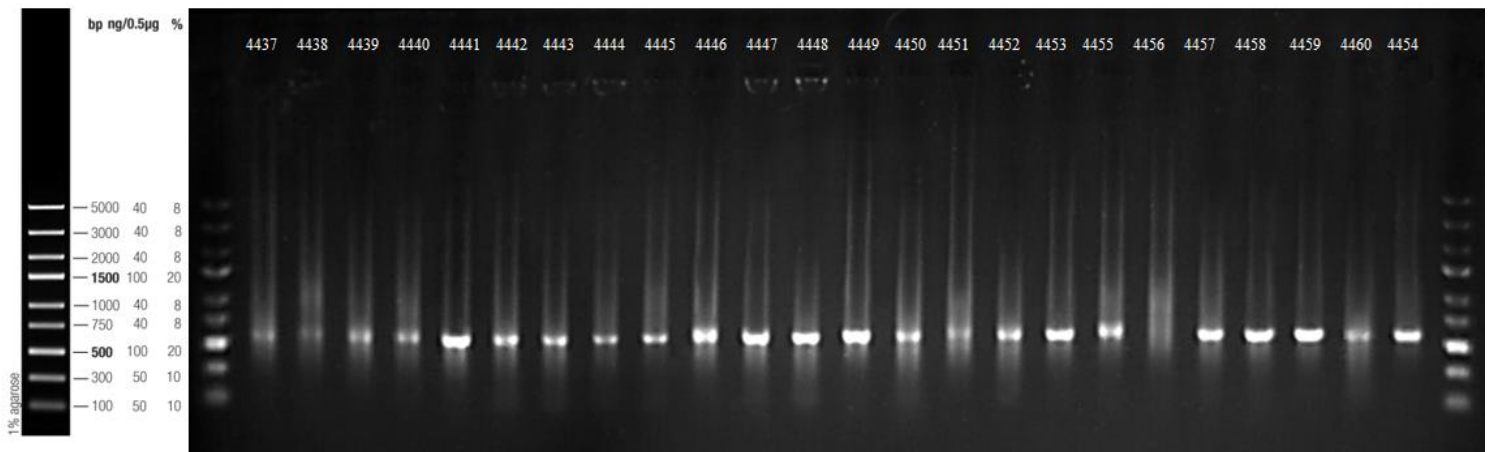


Figura 12. Productos amplificados con el marcador molecular *rpoC1*

Nota: Se visualizan los carriles marcados del 4437 al 4460 y un marcador de peso molecular de 100 a 5000 pb en cada extremo.

Fuente: (Las Autoras, 2022).

Como se observa en el árbol filogenético el uso de la región *matK* de las 16 secuencias del género *Restrepia* es eficaz para realizar una diferenciación entre especies, como se evidencia en la agrupación correcta de las especies de *R.elegans* y *R.muscifera* de forma clara, sin embargo, específicamente entre las especies *R. brachypus* y *R. trichoglossa* no se obtiene una agrupación coherente, por lo que se requiere en este caso el uso de un marcador molecular diferente o un marcador adicional que permita diferenciar entre ambas especies.

Además, es muy probable que la secuencia con código MF349936.1 *Restrepia* sp. sea de la especie *R. citrina*, debido a que se emparejaron en un mismo clado, sin embargo, se necesitan más análisis bioinformáticos para poder clasificarla.

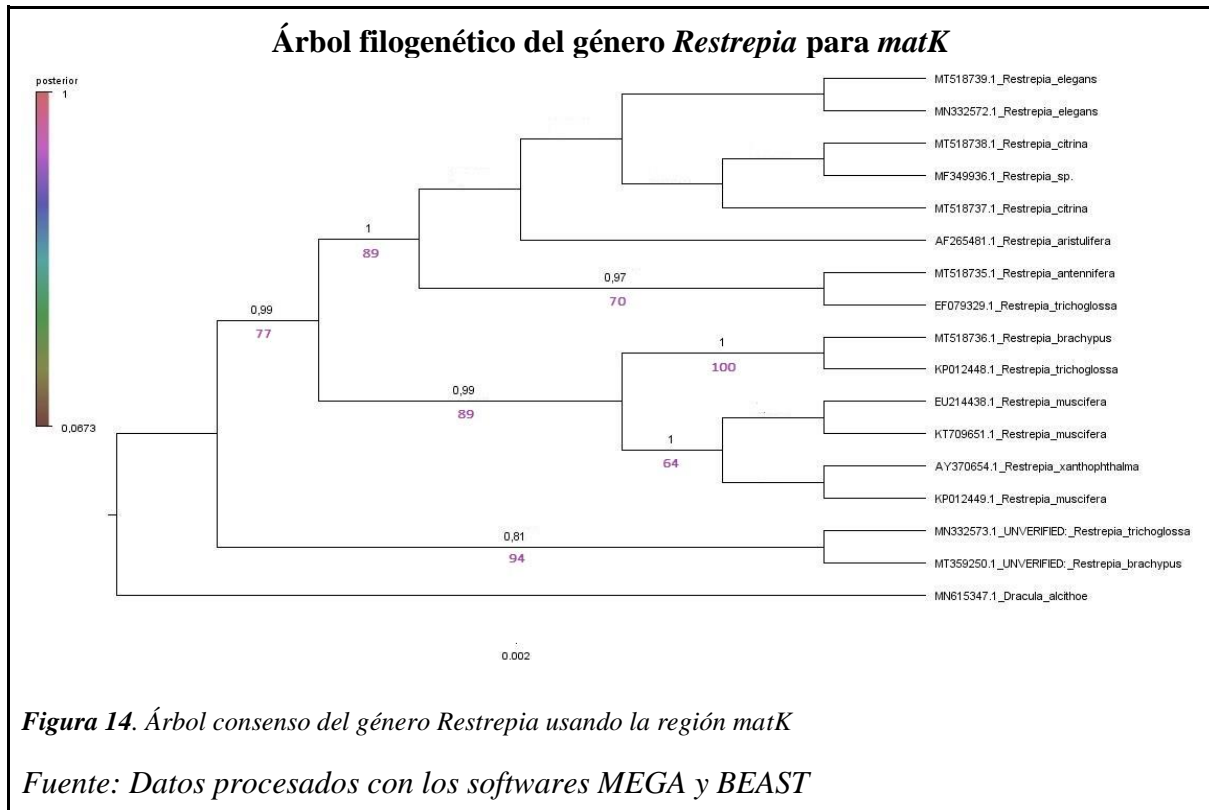
Se observa que *R.elegans*, *R.citrina*, *R. aristulifera*, *R. antennifera* y *R. trichoglossa* son clados hermanos con un puntaje de 1 de probabilidad posterior.

En comparación con el soporte estadístico, estos cuentan con valores muy parecidos a los obtenidos por la probabilidad posterior, como el caso de *R.trichoglossa* y *R.brachypus* con valores de 100 y 94, además, de igual manera se tiene un ancestro en común con una probabilidad de 89 entre los clados hermanos en los que se encuentran *R.xanthophthalma*, *R.muscifera*, *R. trichoglossa* y *R. brachypus*.

El grupo externo *Dracula alcithoe*, sirvió para enraizar el árbol filogenético este fue seleccionado ya que esta especie es perteneciente a la familia *Orchidaceae* a la subtribu *Pleurothallidinae*, sin embargo, pertenece a otro género, es decir se encuentra dentro de la familia, pero presenta diferencias para poder distinguirlas del género *Restrepia* (ABO, 2022).

El que solo existan 16 secuencias disponibles en GenBank demuestra que hace falta estudios en este género, tomando en cuenta que de ese número solo 8 son de especies distintas y solo 4 de ellas están registradas en el Ecuador que son *R.antennifera*, *R.Brachypus*, *R.muscifera*, *R.trichoglossa*, en donde con la amplificación de *matK* realizada en este estudio es posible posteriormente secuenciar dichos resultados para un análisis mucho más completo, además del

marcador *rpoC1*, en el que no fue posible analizar mediante árboles filogenéticos al no encontrar ninguna secuencia disponible ya sea del mundo o especies registradas en el Ecuador pertenecientes al género *Restrepia*.



Conclusiones

Se recolectaron 24 muestras de tejido vegetal de una colección privada, pertenecientes a las 20 especies del género *Restrepia* registradas en el Ecuador, las cuales corresponden a un 100% de especies de este género registradas en The Plant List (2022); además, el análisis de georreferenciación realizado con los datos proporcionados por la base de datos Trópicos Missouri Botanical Garden permitieron determinar los puntos de distribución de las especies del género *Restrepia* con mayor afluencia en la zona central del Ecuador, se encuentran repartidas en la región Sierra y una parte en la Amazonía, en bosques montanos.

La comparación de los dos métodos de extracción de ADN de las muestras de tejido de especies del género *Restrepia*, destacó con excelentes resultados el protocolo Doyle y Doyle (1987) por la obtención de bandas definidas a diferencia del uso del kit en un solo paso, ya que al trabajar con muestras que poseen tejido parenquimático (reserva) en sus hojas se tiene muchos compuestos como almidón, gránulos, cristales de proteína, gotas lipídicas que influyen en la degradación del ADN y su conservación.

Fue importante realizar gradientes de temperatura para su estandarización en cada uno de los marcadores moleculares ya que esto permitió establecer las temperaturas de annealing ideales para la amplificación, de 47.5 °C para *matK* sin la presencia de dobles bandas y de 48.7 °C para *rpoCl*, sin embargo, la amplificación para esta región se dio en el rango de temperaturas de 47.4°C a 53.5°C.

El marcador molecular *matK* en base a las secuencias disponibles en GenBank del género *Restrepia* es adecuado porque si presenta variaciones en los fragmentos utilizados que permiten establecer una clasificación, sin embargo, es necesario el uso de un marcador molecular adicional.

Recomendaciones

Se recomienda la continuación del trabajo experimental de identificación molecular del género *Restrepia*, ya que la información que existe es muy escasa y se necesita generar una biblioteca de genes de estas especies y que, junto con el apoyo a la taxonomía tradicional de manera complementaria, se logre una clasificación y descripción del género *Restrepia* mucho más amplia y concreta.

Para la recolección de muestras de tejido vegetal del género *Restrepia* se recomienda el uso de recipientes térmicos para su transporte al laboratorio para mantener frescas las muestras, además que una vez llegado al laboratorio es imprescindible su congelación a -20 °C para su conservación a largo plazo.

El diseño y uso de más marcadores moleculares con regiones suficientemente variables sería más adecuado para permitir una clasificación más precisa del género *Restrepia*, en específico se recomienda el marcador molecular *ycf1*.

Aplicar herramientas bioinformáticas en todos los procesos para que estas sirvan de apoyo a lo largo de la experimentación desde la evaluación de los primers y el cálculo de sus temperaturas de melting, hasta la creación de árboles filogenéticos y la definición de parámetros adecuados.

Bibliografía

- ABO. (2022). *Dracula alcithoe* Luer & R.Escobar 1991. <http://asoabo.com/index.php/enciclopedia/item/735-dracula-alcithoe#.Ytq3tHZBy3A>
- Aguilar, S., Pilz, G., Rosas, J., Linares, J., & Aranda, L. (2003). *Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas*. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/1960>
- Albán, J., & Toapanta, C. (2019). *Identificación molecular del género Caucaea (Orchidaceae) mediante el sistema barcode y análisis químico de los aromas florales*.
- Alejos, P., Aragón, M., & Cornejo, A. (2018). *Extracción y purificación de ADN*. www.eoearth.org/view/article/158858.
- Altamirano, M., & Yáñez, P. (2016). El código de barras de ADN (barcoding): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en Ecuador. *La Granja*, 23(1). <https://doi.org/10.17163/LGR.N23.2016.01>
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomy Mesoamerican*, 17(2), 221–242. <https://doi.org/10.15517/AM.V17I2.5163>
- Bolívar, A., Rojas, A., & García, P. (2014). *PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol)*. 3(1), 25–33.
- Carrión, M. (2009). *Identificación de Orquídeas Epifitas del Ecuador mediante DNA Barcoding*. [UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA]. <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificac%C3%B3n%20de%20Orqu%C3%ADdeas%20Epifitas%20del%20Ecuador%20mediante%20DNA.pdf>
- Carvajal, L., & Salas, R. (2021). *Vista de Estrategias comerciales para el desarrollo turístico de los jardines de orquídeas en la provincia del Carchi*. <https://revistasdigitales.upec.edu.ec/index.php/tierrainfinita/article/view/1088/2597>
- Chacón, M. R., Contreras, O. M., & Cáceres, H. E. (2018). *Repositorio Universidad de Santander: Contribución a la conservación de Orchidiaceas de Santander mediante cultivo in vitro de semillas*. 1 Dic 2018. <https://repositorio.udes.edu.co/handle/001/4691>
- Checa, A. (2018). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa – Conogasi*. <https://conogasi.org/articulos/pcr-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa/>
- Chuncho, G., Chuncho, C., & Aguirre, Z. (2019). *Anatomía y morfología vegetal*. EDILOJA. <https://unl.edu.ec/sites/default/files/archivo/2019-12/ANATOMI%CC%81A%20Y%20MORFOLOGI%CC%81A%20VEGETAL.pdf>
- Cortés, N., Ordóñez, P., & Domínguez, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants (Libro, 1981)* [WorldCat.org]. New York: Columbia University Press.
- De La Torre Llorente, D. (2018). Conservation Status of the Family *Orchidaceae* in Spain Based on European, National, and Regional Catalogues of Protected Species. *Scientific World Journal*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7958689>

- Díaz, M. (2013). *Manual de cultivo de Orquídeas* (1ª).
- Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Revista Para Profesionales de La Salud, III*, 88–111.
- Downie, S., & Katz, D. (1996). Phylogenetic analysis of Apiaceae subfamily Apioideae using nucleotide sequences from the chloroplast rpoC1 intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(1), 1–18. <https://doi.org/10.1006/MPEV.1996.0053>
- Doyle, & Doyle. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. <https://worldveg.tind.io/record/33886/>
- Esperbent, C. (2018). Detectives del código genético: En la era del big data, un equipo de investigadores del INTA aplica herramientas de la bioinformática para ordenar, secuenciar y analizar grandes volúmenes de datos. Descifrar el ADN de un organismo vivo permite entender cómo funciona y cuáles son los mecanismos que se activan frente a una enfermedad o cambios en el ambiente. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 44(3).
- Espinosa, L., & Chávez, E. (2019). *El otro genoma de las plantas: los cloroplastos y su ADN*. https://www.researchgate.net/publication/343141166_El_otro_genoma_de_las_plantas_los_cloroplastos_y_su_ADN
- Freuler, M. (2003). *100 orquídeas argentinas*. Albatros. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=IOiVpaB-Fm4C&oi=fnd&pg=PA4&dq=hojas+carnosas+restrepia&ots=jsKX6hWNBs&sig=N2qc4jlOI0HIGqpDAmJI0VGMdZg#v=onepage&q=pseudobulbos&f=false>
- Hernández, C., & Valdez, R. (2017). *Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea*. https://www.utm.mx/edi_anteriores/temas64/T64_E01_Analisis.pdf
- Hilu, K. W., & Liang, H. (1997). The matK gene sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*, 84(6), 830–839. <https://doi.org/10.2307/2445819>
- IOSPE. (2022). *Internet Orchid Species Photo Encyclopedia*. <http://www.orchidspecies.com/>
- Iza, M. L. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula, mediante el sistema BARCODE*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15043>
- Jacinto, S. (2019). *Diversidad de la familia Orchidaceae en la zona de amortiguamiento - Reserva Comunal Chayu Nain, Aramango-Amazonas*. Universidad Nacional De Cajamarca.
- Jiménez, M. (2014). *Orquídeas del Ecuador-Número de especies, endemismo, especies amenazadas y su manejo adecuado*.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 62, e3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Leopardi, C., & Escobedo, G. (2021). *Filogenias: conceptos y generalidades*. 4(11).
- Li, H., Xiao, W., Tong, T., Li, Y., Zhang, M., Lin, X., Zou, X., Wu, Q., & Guo, X. (2021). The specific DNA barcodes based on chloroplast genes for species identification of *Orchidaceae* plants. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81087-w>
- Londoño, P. A. (2021). *Evaluación de marcadores moleculares de cloroplasto y nucleares, para su uso en identificación molecular de germoplasmas de orquídeas*.

- Martín, A. E. (2020). *Caracterización de especies: Familias Orchidaceae y Bromeliaceae presentes en las zonas verdes de la UPTC sede Tunja para implementar una colección viva en el Jardín Botánico Boyacá.*
- Méndez, J., & González, A. (1997). *Los Genomas Eucariotas: Aspectos generales.*
- Meneses, C. A., Rozo, V., & Soto, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technical* , 49.
- Millner, H. J., Bachman, S. P., & Baldwin, T. C. (2020). *An assessment of the conservation status of Restrepia (Orchidaceae) reveals the threatened status of the genus.* <https://doi.org/10.1080/17550874.2020.1735553>
- Millner, H. J., & Baldwin, T. C. (2016). Floral micromorphology of the genus *Restrepia* (Orchidaceae) and the potential consequences for pollination. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 225, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.09.007>
- Millner, H. J., Obeng, A., Mccrea, A. R., & Baldwin, T. C. (2008). *Axenic Seed Germination and in Vitro Seedling Development of Restrepia brachypus (Orchidaceae).* 135(4), 497–505.
- Miño, J. (2018). *Identificación molecular del género Passiflora (Passifloraceae), de la región norte del Ecuador por medio del método DNA barcodin.* <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16148/1/UPS-QT13326.pdf>
- Mittermeier, R., Mittermeier, C., & Myers, N. (1999). *Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions | Thomas Brooks - Academia.edu.* https://www.academia.edu/1438756/Hotspots_revisited_Earths_biologically_richest_and_most_endangered_terrestrial_ecoregions
- Mongrovejo, H., & Proaño, Y. (2020). *Filogenia molecular del género Gongora Orchidaceae, de las especies registradas en el Ecuador.* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18438/1/UPS-QT14377.pdf>
- Montalvo, M., & Vargas, L. (2019). *Revisión de las especies latinoamericanas de orquídeas del género dracula mediante la técnica molecular Barcode.* <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16978/1/UPS-QT13818.pdf>
- Mordoh, A. (2019). Secuenciación masiva de ADN: la próxima generación. *Dermatología Argentina, XXV.*
- Mosquera, H. R. (2012). *Análisis palinológico y anatómico del pistilo en la familia Orchidaceae* [Universidad de León]. <https://doi.org/10.18002/10612/2220>
- OrchidRoots. (2022). *Raíces de orquídeas.* <https://www.orchidroots.com/>
- Orozco, M. M., Mendoza, D. V., Hernández, F., Martínez, O., Villarreal, J. Á., & Reyes, M. H. (2019). Nuevos iniciadores *matK* para código de barras de la vida en especies del género *Dasyllirion*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(6), 1313–1324. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V10I6.1684>
- Oyhenart, J. (2013). *Secuenciado del genoma.* <http://www.unlpam.edu.ar/images/extension/edunlpam/QuedateEnCasa/secuenciado-del-genoma.pdf>
- Palacios, H. L. (2014). *Inventario taxonómico de especies de la familia Orchidaceae en un Área de Bosque Andino del Predio la Sierra, Santuario de Fauna y Flora Guanentá Alto Rio Fonce.*

- <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2539/7229166.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Pantaleón Bautista, X. (2011). *Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas Prosthechea varicosa y Prosthechea karwinskii para la identificación de compuestos volátiles*. Instituto Politécnico Nacional Centro Interdisciplinario De Investigación Para El Desarrollo Integral Regional.
- Portilla, F. (2018). Capítulo I-Introducción. *Quito: Editorial Abya-Yala*, 17–40. <https://doi.org/10.7476/9789978104927.0001>
- Pridgeon, A. M., & Stern, W. L. (1983). Ultrastructure of Osmophores in *Restrepia (Orchidaceae)*. *American Journal of Botany*, 70(8), 1233–1243. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1983.tb12472.x>
- Rivas, P., & Salazar, P. (2017). *Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el ishpingo (O. quixos) provenientes de 5 provincias de la amazonía ecuatoriana*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Rocha, O., & Duque, J. (2017). Unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre con enfoque en orquídeas (*Orchidaceae*). *Agro Productividad*, 10(6), 62–65.
- Schneider, M. (1958). *Algunas especies colombianas de Pleurothallis* (37th ed., Vol. 8). Caldasia. <https://www.jstor.org/stable/44240776>
- Singer, R. B. (2009). Morfología Floral y Polinización de Orquídeas: El segundo Libro De Charles Darwin. *Acta Biol. Colomb*, 14, 337–350.
- Śliwiński, T., Kowalczyk, T., Sitarek, P., & Kolanowska, M. (2022). Orchidaceae-Derived Anticancer Agents: A Review. *Cancers 2022, Vol. 14, Page 754, 14(3)*, 754. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14030754>
- Solís, L., & Andrade, A. (2005). ¿Qué son los marcadores moleculares? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de La Universidad de Veracruzana, XVIII*.
- Sosa, V. (2009). *El árbol de la vida*.
- Suárez, A. (2015). *Utilización de herramientas genómicas en el estudio de la arquitectura molecular de caracteres de importancia económica en el ganado ovino = Using genomic tools for the study of the molecular architecture of economically important traits in sheep* [Universidad de León]. <https://doi.org/10.18002/10612/6003>
- Tamura, K. (1992). *Tamura 3-parameter (Gamma)*. https://www.megasoftware.net/mega4/WebHelp/part_iv___evolutionary_analysis/computing_evolutionary_distances/distance_models/nucleotide_substitution_models/gamma_distances/hc_tamura_3_parameter_gamma.htm
- Téllez, M. de los Á. (2011). Diagnóstico de la familia *Orchidaceae* en México. *Universidad Autónoma Chapingo*.
- Tobar, F., Garzón, C., Yáñez, M., Mena, J., & González, D. (2018). *Orquídeas y Bromelias de la Provincia de El Oro: Una guía de identificación para los principales géneros y especies del páramo al manglar* (9th ed.). Publicación Miscelánea.
- Valderrama, J., Ortigosa, F., & Cañas, R. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros En La Biología, XIII*. http://www.encuentros.uma.es/assets/journals/13/173singles/173.7_secuenciacion.pdf

Anexos

Anexo 1. Ubicación geográfica de las especies del género *Restrepia*

Especie	N.	Latitud	Longitud	Lugar
<i>Restrepia antennifera</i> Kunth	1	0.295	-78.482	Imbabura
	2	-1.21	-78.25	Tungurahua
	3	-0.433333	-78.483	Pichincha
	4	-0.45	-78.466	Pichincha
	5	-1.427	-78.767	Tungurahua
	6	-2.6673131	-78.56513	Azuay
	7	-2.5493325	-78.46625	Morona Santiago
<i>Restrepia brachypus</i> Rchb.f.	8	-0.5833863	-78.56579	Pichincha
	9	0.81825139	-77.97049	Carchi
	10	-2.3085798	-78.4943	Morona Santiago
	11	-1.0766886	-78.38372	Tungurahua
<i>Restrepia condorensis</i> Luer & R.Escobar	12	-4.502	-79.281	Zamora Chinchipe
<i>Restrepia contorta</i> (Ruiz & Pav.) Luer	13	-4.49	-79.134	Zamora Chinchipe
	14	0.19521819	-78.48927	Pichincha
	15	-2.6133299	-79.30461	Azuay
<i>Restrepia cymbula</i> Luer & R. Escobar	16	-	-	Ecuador
<i>Restrepia dodsonii</i> Luer	17	-0.164	-78.9	Pichincha

	18	-0.437	-78.727	Pichincha
	19	-0.466	-78.783	Pichincha
<i>Restrepia ephippium</i> Luer & Hirtz	20	0.43210718	-78.30936	Imbabura
<i>Restrepia flosculata</i> Luer	21	0.72322976	-78.46592	Imbabura
	22	0.80082972	-77.94407	Carchi
<i>Restrepia guttulata</i> Lindl.	23	0.74560168	-77.81791	Carchi
	24	0.20277126	-77.97703	Imbabura
	25	0.06544257	-77.96879	Pichincha
<i>Restrepia howei</i> Luer	26	-	-	Ecuador
<i>Restrepia iris</i> Luer	27	-4.466	-79.1486	Zamora Chinchipe
	28	-4.03333	-78.98333	Zamora Chinchipe
	29	-3.975	-79.119	Zamora Chinchipe
	30	-3.9666	-79.07	Zamora Chinchipe
<i>Restrepia lansbergii</i> Rchb.f. & H. Wagener	31	-1.513062646	-77.97954686	Pastaza
	32	-1.45156834	-78.54920026	Tungurahua
<i>Restrepia mendozae</i> Luer	33	-4.536151	-79.124054	Zamora Chinchipe
<i>Restrepia mohrii</i> Braem	34	-	-	Ecuador
<i>Restrepia muscifera</i> (Lindl.) Rchb.f. ex Lindl.	35	-	-	Ecuador
<i>Restrepia piperotosa</i> Luer	36	0.11592153	-78.33666219	Pichincha
<i>Restrepia portillae</i> Luer	37	-3.233333	-78.6666	Morona Santiago

<i>Restrepia schizosepala</i> Luer & Hirtz	38	-0.071784359	-77.61075538	Sucumbíos
<i>Restrepia teaguei</i> Luer	39	-4.03333	-78.98333	Zamora Chinchipe
<i>Restrepia trichoglossa</i> F.Lehm. ex Sander	40	-1.04	-80.65	Manabí
	41	-3.78858494	-79.51474093	El Oro
	42	-3.801911672	-79.56025382	El Oro
	43	0.725	-77.7	Carchi
	44	-0.419440043	-78.80705206	Pichincha

Anexo 2. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación del ADN

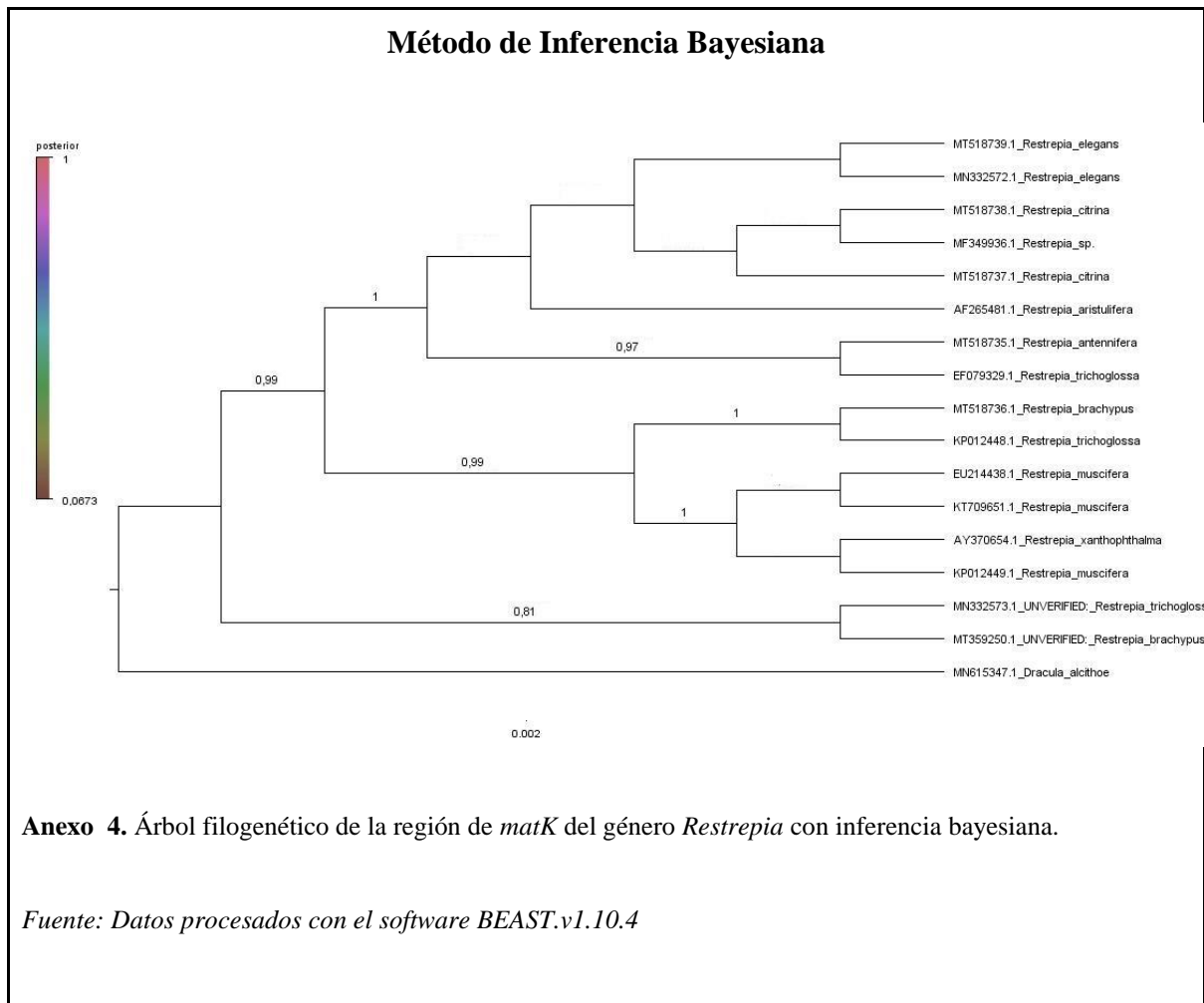
Número de muestras	Nombre científico	Código de colección	Extracción de ADN	Amplificación	
				<i>matk</i>	<i>rpoC1</i>
1	<i>R. iris</i>	4437	Si	Si	Si
2	<i>R. contorta</i>	4438	Si	Si	Si
3	<i>R. guttulata</i>	4439	Si	Si	Si
4	<i>R. flosculata</i>	4440	Si	Si	Si
5	<i>R. brachypus</i>	4441	Si	Si	Si
6	<i>R. teaguei</i>	4442	Si	Si	Si
7	<i>R. condorensis</i>	4443	Si	Si	Si
8	<i>R. portillae</i>	4444	Si	Si	Si
9	<i>R. mendozae</i>	4445	Si	Si	Si
10	<i>R. schizosepala</i>	4446	Si	Si	Si
11	<i>R. lansbergii</i>	4447	Si	Si	Si

12	<i>R. howei</i>	4448	Si	Si	Si
13	<i>R. seketi</i>	4449	Si	Si	Si
14	<i>R. mohrii</i>	4450	Si	Si	Si
15	<i>R. piperitosa</i>	4451	Si	Si	Si
16	<i>R. antennifera</i>	4452	Si	Si	Si
17	<i>R. cymbula</i>	4453	Si	Si	Si
18	<i>R. dodsonii</i> R0997BL	4454	Si	Si	Si
19	<i>R. ephippium</i>	4455	Si	Si	Si
20	<i>R. muscifera</i>	4456	Si	Si	No
21	<i>R. trichoglossa</i>	4457	Si	Si	Si
22	R942LO	4458	Si	Si	Si
23	R1104ZA	4459	Si	Si	Si
24	R6525F	4460	Si	Si	Si

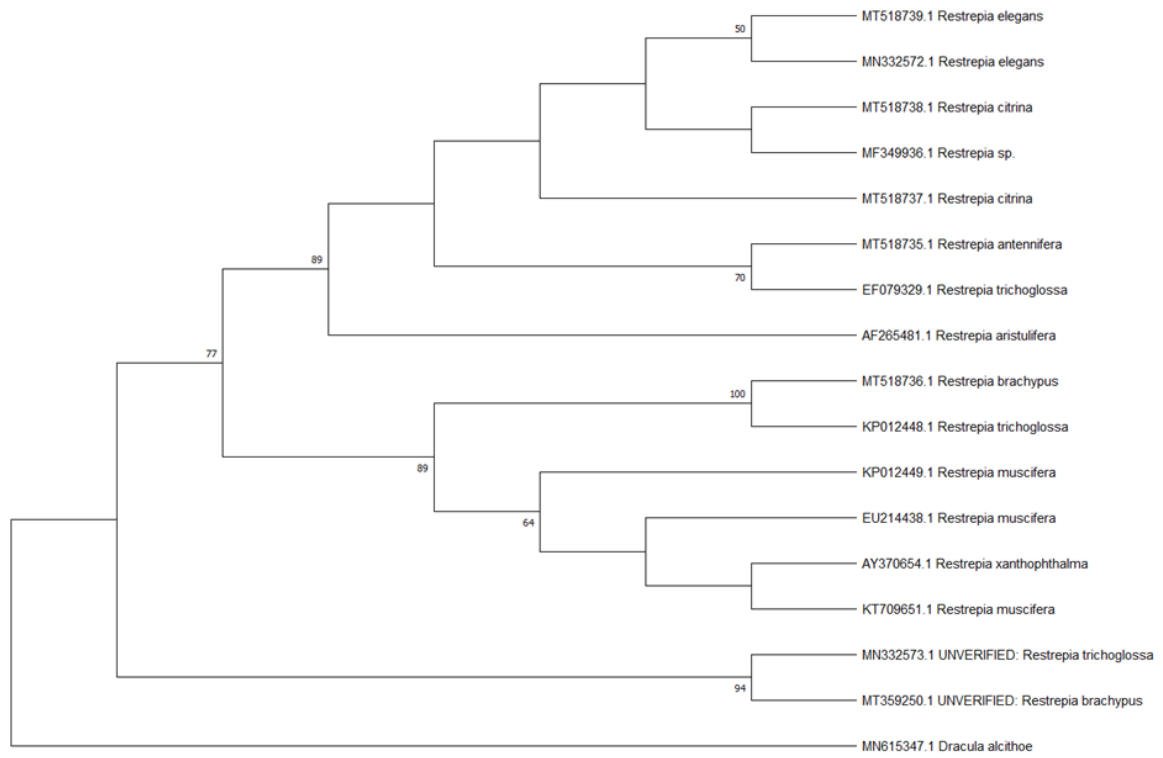
Anexo 3. Secuencias del Genbank del género *Restrepia* y el outgroup de la región *matK*

	Especie	Código de accesión
1	<i>Restrepia xanthophthalma</i> <i>MatK</i> gene complete cds chloroplast	AY370654.1
2	<i>Restrepia elegans</i> voucher ORDNA00179 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	MT518739.1
3	<i>Restrepia citrina</i> voucher ORDNA00789 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	MT518738.1
4	<i>Restrepia citrina</i> voucher ORDNA00759 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	MT518737.1
5	<i>Restrepia brachypus</i> voucher ORDNA00292 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	MT518736.1
6	<i>Restrepia antennifera</i> voucher ORDNA00803 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	MT518735.1
7	<i>Restrepia muscifera</i> voucher FP 3921 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	EU214438.1
8	UNVERIFIED: <i>Restrepia trichoglossa</i> voucher M.L. Klingelfus 117 (UPCB)	MN332573.1
9	<i>Restrepia elegans</i> voucher M.L. Klingelfus 165 (UPCB) tRNA- Lys (trnK)	MN332572.1
10	<i>Restrepia</i> sp. Vo21 isolate AD7LJ60 maturase K (<i>matK</i>) gene partial cds	MF349936.1
11	<i>Restrepia muscifera</i> voucher Rodrigues 512 (SP) tRNA-Lys (trnK) gene	KT709651.1
12	<i>Restrepia muscifera</i> isolate DB9208 maturase K (<i>matK</i>) gene partial cds	KP012449.1
13	<i>Restrepia trichoglossa</i> isolate JBL-02309 maturase K (<i>matK</i>) gene partial	KP012448.1
14	<i>Restrepia trichoglossa</i> maturase K (<i>matK</i>) pseudogene and tRNA-Lys	EF079329.1
15	<i>Restrepia aristulifera</i> trnK gene intron and maturase (<i>matK</i>) gene complete	AF265481.1

16	UNVERIFIED: <i>Restrepia brachypus</i> voucher MO:6857079 maturase K-like	MT359250.1
17	<i>Dracula alcithoe</i> voucher 4055 maturase K (<i>matK</i>) gene partial cds chloroplast	MN615347.1



Método de Máxima Verosimilitud



Anexo 5. Árbol filogenético de la región de *matK* del género *Restrepia* con método de Máxima Verosimilitud

Fuente: Datos procesados con el software Mega

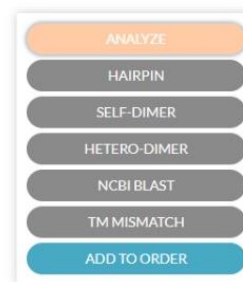
Temperatura de Melting calculada del primer *matK* forward

Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G -3'
COMPLEMENT	5'- CTC GTA AAC ACA AAA GTA CTG TAC G -3'
LENGTH	25
GC CONTENT	40 %
MELT TEMP	53.9 °C
MOLECULAR WEIGHT	7678 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	239700 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.17
µg/OD ₂₆₀	32.03



Anexo 6. Temperatura de Annealing calculada para el primer *matK* forward

Fuente: Información obtenida en el software Oligo Analyzer

Temperatura de Melting calculada del primer *matK* reverse

Results

RESUSPENSION

DILUTION

SEQUENCE	5'- GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG -3'
COMPLEMENT	5'- CGA CTT TCT TGT GCT AGA AC -3'
LENGTH	20
GC CONTENT	45 %
MELT TEMP	51.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	6150.1 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	202700 L/(mole-cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.93
µg/OD ₂₆₀	30.34



Anexo 7. Temperatura de Annealing calculada para el primer *matK* reverse

Fuente: Información obtenida en el software Oligo Analyzer

Temperatura de Melting calculada del primer *rpoC1* forward

Results

[RESUSPENSION](#)[DILUTION](#)

SEQUENCE	5'-GTG GAT ACA CTT CTT GAT AAT GG-3'
COMPLEMENT	5'-CCA TTA TCA AGA AGT GTA TCC AC-3'
LENGTH	23
GC CONTENT	39.1%
MELT TEMP	51.1 °C
MOLECULAR WEIGHT	7093.7 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	226800 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.41
µg/OD ₂₆₀	31.28

[ANALYZE](#)

[HAIRPIN](#)

[SELF-DIMER](#)

[HETERO-DIMER](#)

[NCBI BLAST](#)

[TM MISMATCH](#)

[ADD TO ORDER](#)

Anexo 8. Temperatura de Annealing calculada para el primer rpoC1 forward

Fuente: Información obtenida en el software Oligo Analyzer

Temperatura de Melting calculada del primer *rpoC1* reverse

Results

[RESUSPENSION](#)[DILUTION](#)

SEQUENCE	5'-TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC-3'
COMPLEMENT	5'-GCC CGT TTA CTT ATG TTT TCT CA-3'
LENGTH	23
GC CONTENT	39.1%
MELT TEMP	53.4 °C
MOLECULAR WEIGHT	7138.7 g/mole
EXTINCTION COEFFICIENT	245200 L/(mole·cm)
nmole/OD ₂₆₀	4.08
µg/OD ₂₆₀	29.11

[ANALYZE](#)

[HAIRPIN](#)

[SELF-DIMER](#)

[HETERO-DIMER](#)

[NCBI BLAST](#)

[TM MISMATCH](#)

[ADD TO ORDER](#)

Anexo 9. Temperatura de Annealing calculada para el primer rpoC1 reverse

Fuente: Información obtenida en el software Oligo Analyzer