



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE SUBESPECIES DE ORQUÍDEAS PERTENECIENTES  
AL GRUPO DE *EPIDENDRUM NOCTURNUM* (ORCHIDACEAE), MEDIANTE  
LA TÉCNICA MOLECULAR DNA BARCODE.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

**INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:**

**Erick Sebastián Ocaña Manzano  
Sabrina Nicole Valencia Arboleda**

**TUTOR:**

**Marco Fernando Cerna Cevallos**

**Quito-Ecuador  
2023**

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

Nosotros, Erick Sebastián Ocaña Manzano con documento de identificación N° 171974537-2 y Sabrina Nicole Valencia Arboleda con documento de identificación N° 175109014-1; 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, 13 febrero del año 2023.

Atentamente,



-----  
Erick Sebastián Ocaña Manzano

C.I.:171974537-2



-----  
Sabrina Nicole Valencia Arboleda

C.I.: 175109014-1

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

Nosotros, Erick Sebastián Ocaña Manzano con documento de identificación No. 171974537-2 y Sabrina Nicole Valencia Arboleda con documento de identificación No. 175109014-1, 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: “IDENTIFICACIÓN DE SUBESPECIES DE ORQUÍDEAS PERTENECIENTES AL GRUPO DE *EPIDENDRUM NOCTURNUM* (ORCHIDACEAE), MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DNA BARCODE.”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniería 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, 13 febrero del año 2023.

Atentamente,



-----  
Erick Sebastián Ocaña Manzano

C.I.:171974537-2



-----  
Sabrina Nicole Valencia Arboleda

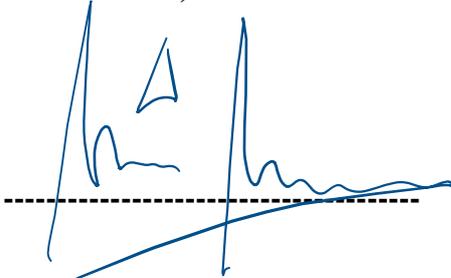
C.I.: 175109014-1

## **CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos con documento de identificación N° 0501872071, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “IDENTIFICACIÓN DE SUBESPECIES DE ORQUÍDEAS PERTENECIENTES AL GRUPO DE *EPIDENDRUM NOCTURNUM* (ORCHIDACEAE), MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR DNA BARCODE”, realizado por Erick Sebastián Ocaña Manzano con documento de identificación No. 171974537-2 y por Sabrina Nicole Valencia Arboleda con documento de identificación No. 175109014-1, 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, 13 febrero del año 2023.

**Atentamente,**



**Marco Fernando Cerna Cevallos, PhD.**

**0501872071**

## DEDICATORIA

A mis dos Ángeles en el cielo, Carmita y Pepito, por amarme como me amaron y acompañarme desde donde sea que estén en este gran paso en mi vida, sé lo mucho que anhelaron este momento.

A mis Padres, Verito y Lenin, quienes me brindaron su amor y apoyo incondicional e hicieron hasta lo imposible solo para verme cumplir uno de mis sueños.

A mis abuelitos, Janeth y Marcelo, por su cariño y enseñanzas que hoy por hoy pongo en práctica en mi desarrollo profesional y sobre todo personal.

A mis hermanos, Alex, Cindy y Camila, por ser mi inspiración y mi impulso para llegar a ser un ejemplo para ustedes.

A mi persona favorita en el mundo, Majo, por ser mi mejor amiga, confidente y uno de los pilares fundamentales en mi vida, que con su amor y palabras de aliento nunca dejó que me rindiera.

A Sebastián, mi compañero en esta larga travesía, por no soltar mi mano incluso en los momentos más difíciles, por ser una de mis mayores motivaciones, jamás me cansaré de agradecer al universo por haberte puesto en mi vida.

Sabrina.

A mi madre, Cecilia y mi hermano, Santiago, por todo el apoyo que me brindan en cada paso de mi vida, son parte fundamental para poder alcanzar esta meta.

A mis abuelitos, Hugo y Matiu, quienes, con su inmensa paciencia, incondicional amor y apoyo, hicieron que este largo camino sea más fácil de recorrer .

A mis tíos, Marce, Rober, Ale y Diego, y a mis primos Valentina y Huguito, por todos sus consejos y bromas, cada día me motivan a ser mejor en todo lo que hago.

A todas las personas que conocen mi potencial, no los defraudaré.

Sebastián

## AGRADECIMIENTO

Conjuntamente agradecemos a Marco Cerna Ph.D., quien desde el primer momento nos acogió en el grupo *Nunkui Wakan*, prestando todas las facilidades para que el proyecto se lleve a cabo. A Denisse Benitez MSc., quien sin responsabilidad alguna nos brindó de su tiempo y sabiduría en los semestres finales de la carrera; más que nuestros profesores, se convirtieron en nuestros amigos.

A la Ing. Elizabeth Yugsi e Ing. Erika Paredes por ser excelentes profesoras, quienes, desde los laboratorios nos transmitieron todo su conocimiento y apoyo para poder realizar el trabajo.

A nuestras familias, quienes incansablemente nos brindaron apoyo desde el inicio de la carrera hasta este día, sin duda alguna, sin ellos no podríamos conseguir nada.

A todos nuestros compañeros y especialmente amigos que formaron parte de esta gran aventura, ayudaron a que esta gran meta se pueda alcanzar.

Sebastián y Sabrina.

A Sabrina, por confiar plenamente en mi conocimiento desde el primer día de la carrera, por lograr haber establecido un tremendo equipo no solo para este trabajo, gracias por tanta paciencia, esfuerzo y amor, gracias por estar aquí.

Sebastián

## RESUMEN

El grupo de *Epidendrum nocturnum* es un tipo nomenclatural del género *Epidendrum*. Esta especie está distribuida en toda América tropical: La Florida, México, Colombia, Brasil, Venezuela, Perú, Ecuador y el Caribe. Se estima que aproximadamente existen 35 especies dentro de este grupo. *Epidendrum* es el segundo género más grande en el Ecuador, por lo que al ser tan amplio genera un problema de clasificación de las especies que lo componen.

DNA BARCODE es una técnica molecular que facilita la identificación a nivel molecular de especies, a partir de muestras de ADN secuenciadas, sin embargo, no se tiene la certeza de que el empleo de las regiones genéticas cloroplásticas *matK*, *ycf1* y *rpoCl* sirvan para poder realizar una diferenciación puntual a nivel de subespecies. Así, se obtuvieron muestras vegetales de distintas zonas del país: Santo Domingo de los Tsáchilas, Imbabura, Pichincha, Napo y Pastaza para identificarlas mediante la técnica molecular antes mencionada. Se extrajo ADN por el método de Doyle y Doyle, se procedió a realizar una PCR con dichos marcadores moleculares, para secuenciar las muestras. Seguidamente se procedió a limpiar las secuencias obtenidas y trabajar con las que tengan una calidad superior al 40%; con el programa MEGA v 11.0 se elaboraron los árboles filogenéticos, además de un mapa de georreferenciación con la plataforma *Google Earth*. Finalmente se pudo concluir que el empleo de estos marcadores moleculares sirve para diferenciar las subespecies de *E. nocturnum*, así mismo se evidencia el fenómeno de especiación ligado a la distribución de las diferentes muestras obtenidas y los cambios a nivel genético presentado.

**Palabras clave:** *Nocturnum*, *Orchidaceae*, *matK*, *rpoCl*, *ycf1*, filogenia.

## ABSTRACT

The *Epidendrum nocturnum* group is a nomenclatural type of the genus *Epidendrum*. This specie is distributed throughout tropical America: Florida, Mexico, Colombia, Brazil, Venezuela, Peru, Ecuador and the Caribbean. It is estimated that there are approximately 35 species within this group. *Epidendrum* is the second largest genus in Ecuador, hence being so large generates a problem of classification of the species that compose it.

DNA BARCODE is a molecular technique that facilitates the identification of species at the molecular level from sequenced DNA samples; however, it is not certain that the use of the chloroplastic genetic regions *matK*, *ycf1* and *rpoC1* can be used to make a specific differentiation at the subspecies level. Thus, plant samples were obtained from different areas of the country: Santo Domingo de los Tsáchilas, Imbabura, Pichincha, Napo and Pastaza to identify them by means of the aforementioned molecular technique. DNA was extracted by the Doyle and Doyle method, and a PCR was performed with these molecular markers to sequence the samples. The sequences obtained were then cleaned and those with a quality higher than 40% were used for the analyses; phylogenetic trees were prepared with the MEGA v 11.0 program, as well as a georeferencing map with the *Google Earth* platform. Finally, it was possible to conclude that the use of these molecular markers help to differentiate the subspecies of *E. nocturnum*, and observe a speciation phenomenon linked to the distribution of the different samples obtained due to changes at the genetic level.

**Keywords:** *Nocturnum*, Orchidaceae, *matK*, *rpoC1*, *ycf1*, phylogeny.

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>Contenido</b>                                      |    |
| <b>2</b> | <b>Introducción</b>                                   | 1  |
| <b>3</b> | <b>Marco conceptual</b>                               | 4  |
| 3.1      | Familia Orchidaceae                                   | 4  |
| 3.1.1    | Importancia de la familia Orchidaceae                 | 5  |
| 3.1.2    | Taxonomía   | 6  |
| 3.1.3    | Morfología floral                                     | 7  |
| 3.2      | Grupo <i>Nocturnum</i>                                | 8  |
| 3.2.1    | Descripción morfológica del grupo <i>Nocturnum</i>    | 9  |
| 3.3      | Técnicas moleculares                                  | 10 |
| 3.3.1    | Marcadores moleculares en orquídeas                   | 11 |
| 3.4      | Filogenia   | 14 |
| <b>4</b> | <b>Materiales y métodos</b>                           | 16 |
| 4.1      | Recolección de muestras                               | 16 |
| 4.2      | Análisis molecular                                    | 16 |
| 4.2.1    | Extracción de ADN                                     | 16 |
| 4.2.2    | Integridad de ADN                                     | 17 |
| 4.2.3    | Amplificación de regiones de ADN                      | 18 |
| 4.2.4    | Secuenciación   | 19 |
| 4.2.5    | Filogenia   | 19 |
| 4.3      | Georreferenciación                                    | 20 |
| <b>5</b> | <b>Resultados y discusión</b>                         | 21 |
| 5.1      | Recolección de muestras                               | 21 |
| 5.2      | Análisis molecular                                    | 23 |
| 5.2.1    | Extracción de ADN                                     | 23 |
| 5.2.2    | Amplificación de regiones de ADN por PCR convencional | 24 |
| 5.2.3    | Secuenciación   | 28 |
| 5.2.4    | Filogenia   | 31 |
| 5.3      | Georreferenciación                                    | 37 |
| <b>6</b> | <b>Conclusiones</b>                                   | 40 |
| <b>7</b> | <b>Recomendaciones</b>                                | 41 |
| <b>8</b> | <b>Referencias</b>                                    | 42 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Composición de la mezcla PCR en base al protocolo sugerido por <i>Thermo Scientific</i> .....   | 18 |
| Tabla 2. Listado de muestras obtenidas con sus respectivas coordenadas de colección y concentración..... | 21 |
| Tabla 3. Muestras amplificadas y su concentración para cada marcador molecular.....                      | 25 |
| Tabla 4. Listado de muestras secuenciadas con su porcentaje de calidad.....                              | 29 |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Morfología floral en orquídeas.....  | 8  |
| Figura 2. Morfología general de <i>Epidendrum nocturnum</i> .....  | 10 |
| Figura 3. Estructura de la región <i>matK</i> de angiospermas .....  | 13 |
| Figura 4. Región <i>ycf1</i> .....   | 13 |
| Figura 5. Región <i>rpoC1</i> .....  | 14 |
| Figura 6. ADN total obtenido por protocolo de Doyle & Doyle, 1987, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. .....  | 23 |
| Figura 7. ADN total obtenido por el kit comercial <i>Phire Plant Direct PCR Máster de Thermo Fisher Scientific.</i> , visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. ..... | 24 |
| Figura 8. Amplicones de la región <i>matK</i> del grupo <i>E. nocturnum</i> , obtenidos por PCR convencional y revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. .....                | 26 |
| Figura 9. Amplicones de la región <i>rpoC1</i> del grupo <i>E. nocturnum</i> obtenidos por PCR convencional y revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. .....                 | 27 |
| Figura 10. Amplicones de la región <i>ycf1</i> de <i>E. nocturnum</i> obtenidos por PCR convencional y revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1%. .....                        | 28 |
| Figura 11. Secuencia de 4499 con el marcador <i>matK</i> visualizado en Geneious .....   | 30 |
| Figura 12. Secuencia de 4517 con el marcador <i>rpoC1</i> visualizado en Geneious.....   | 30 |
| Figura 13. Secuencia de 4509-2 con el marcador <i>ycf1</i> visualizado en Geneious.....  | 31 |
| Figura 14. Árbol filogenético del grupo <i>E. nocturnum</i> con el marcador molecular <i>matK</i> . .....  | 32 |
| Figura 15. Árbol filogenético del grupo <i>E. nocturnum</i> con el marcador molecular <i>ycf1</i> . .....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 16. Árbol filogenético del grupo <i>E. nocturnum</i> con el marcador molecular <i>rpoC1</i> ..... | 35 |
| Figura 17. Árbol filogenético unificado con los tres marcadores moleculares. ....                        | 36 |
| Figura 18. Distribución de <i>E. nocturnum</i> en el Ecuador .....                                       | 38 |
| Figura 19. Distribución de <i>E. nocturnum</i> en América.....   | 39 |

## 2 Introducción

Ecuador es un país megadiverso, la variedad vegetal con la que cuenta, representa alrededor del 7% de plantas vasculares de todo el planeta, de las cuales 4300 especies son orquídeas (OTCA, 2021). El país en su pequeña extensión geográfica, 283.561 km<sup>2</sup> en comparación a otros países (Barragán, 2019), cuenta con una mega biodiversidad tanto a nivel animal como vegetal, es aquí en donde denotan las orquídeas, debido a que el país posee 4 de las 5 subfamilias de orquídeas que existen en todo el mundo (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2013; Montalvo y Vargas, 2019).

La familia de las orquídeas es una de las familias más diversas de todo el reino vegetal, se trata de una familia cosmopolita, sin embargo, tienen cierta preferencia a ubicarse en las zonas tropicales, estas representan alrededor de 30000 especies dispersas alrededor de todo el mundo, destacando por su belleza exótica. En el país, una de cada cinco especies de plantas es una orquídea, así representan alrededor de 1707 especies, por lo que su registro es de suma importancia (Tobar et al., 2018).

*Epidendrum* es el segundo género más grande en el Ecuador, hablando de orquídeas, agrupa 452 especies (Carrión, 2009; A. Sánchez y Rodríguez, 2018). *Epidendrum* al ser un género bastante amplio, genera un problema de clasificación de las especies que lo componen. Estas especies vegetales se encuentran en gran peligro debido a la destrucción de su hábitat o por el tráfico de especies que gira en torno a estas (Parveen et al., 2017; Rocha y Duque, 2017). La mayoría de las estas orquídeas se ubican en bosques que representan puntos críticos de deforestación y por ende presentan pérdida de su hábitat, lo que implica una disminución de su población, el Sistema Nacional de Áreas Protegidas calcula que alrededor del 85% de orquídeas propias de país se encuentran bajo amenaza,

casi el 2% se encuentran en un estado de peligro crítico y el 11% se ubica en peligro (Millner y Baldwin, 2016). Altamirano y Yáñez (2016) dicen que la conservación de especies no solamente de orquídeas es relevante para supervivencia propia y la de los organismos que conviven con estas, adicionalmente, al preservar la diversidad se contribuye a mantener la información que conlleva cada especie con los procesos biológicos que se han dado hasta ahora, es decir, su evolución morfológica codificada genéticamente.

Se debe resaltar que muchas clasificaciones realizadas a la familia Orchidaceae con anterioridad son mediante diferenciación morfológica, sin embargo, puede darse el caso de existir dos especies morfológicamente similares o que no se encuentren en etapa de floración para poder identificarlas con claridad, pero que genéticamente presenten diferencias; por lo antes mencionado, el empleo de marcadores moleculares ayudará a la identificación y correcta clasificación de dichas especies (Endara y Ocaña, 2022; Rivas y Salazar, 2017).

La identificación de estas especies ha sido facilitada debido a que las técnicas moleculares han ido mejorando y así en la actualidad estas proveen de gran cantidad de información que resulta sumamente útil para estudios de identificación de especies, evolución filogenética, entre otras (Pacheco et al., 2021). Es así que las técnicas de identificación molecular proveen de información certera debido a que el código genético es único para cada individuo (Heubl, 2010).

DNA BARCODE, es una técnica molecular que facilita la identificación a nivel molecular de especies, a partir de muestras de ADN secuenciadas. Esta técnica sugiere utilizar

condiciones de secuencia estandarizadas y aceptadas a nivel mundial, por lo que se puede emplear para la identificación y clasificación de especies vegetales de una forma rápida (Trang et al., 2017). Sin embargo, no se tiene la certeza de que el empleo de las regiones genéticas cloroplásticas tales como *matK*, *ycf1* y *rpoC1* sirvan para poder realizar una diferenciación puntual a nivel de subespecies.

Es así, que el presente trabajo de investigación tiene como finalidad obtener muestras vegetales de distintas zonas del país, Santo Domingo de los Tsáchilas, Imbabura, Pichincha, Napo y Pastaza para identificar mediante la técnica molecular DNA BARCODE, usando los marcadores moleculares *matK*, *ycf1* y *rpoC1*, las subespecies de orquídeas pertenecientes al grupo de *Epidendrum nocturnum*, con el fin de encontrar diferencias que permitan discriminar cada subespecie, ya que es importante conocer los procesos de especiación que se dieron entorno a *E. nocturnum* y otras orquídeas, con el fin de preservar y clasificar de buena manera cada una de estas.

### 3 Marco conceptual

#### 3.1 Familia Orchidaceae

La Familia Orchidaceae representa uno de los más grandes grupos dentro de las plantas vasculares, así en 2022, The Plant List, (2013) menciona que esta familia contiene alrededor de 27800 especies que se distribuyen alrededor de casi todo el mundo, exceptuando el Ártico, la Antártica y ciertos desiertos del mundo, sin embargo, en su gran mayoría se encuentran ubicadas en los trópicos, en Sudamérica y Centroamérica y alrededor del 10% de estas, se encuentran el Perú, Colombia y Ecuador (Dressler, 1982; Jacinto, 2019; Novoa et al., 2015; Rivero y Chirino, 2015).

Según Aguilar (2003), las orquídeas forman parte de las monocotiledóneas más adelantadas en cuanto a evolución, debido a esto han ido mejorando sus características para la toma de agua, almacenamiento, la polinización, además de que en varios casos presentan asociaciones con hongos para solventar necesidades nutricionales.

Chacón et al. (2018), hablan de que existen datos de las orquídeas desde épocas muy antiguas, en la obra denominada “La Historia de las plantas”, realizada por Teofrasto de Ereso (374-287 a.C.), las denominaba “Orchis” que significa testículo, debido a su forma semejante a los pseudo bulbos que se encuentran en la zona basal de estas plantas.

En la actualidad, las orquídeas son consideradas como la familia de especies vegetales con flores con más especies sobre la tierra, seguidas por la familia de las Asteráceas (Palacios, 2014), es así que, The Plant List (2013), muestra que se han registrado 899 géneros y alrededor de 27800 especies dentro de la familia Orchidaceae.

El Ecuador, al contener zonas subtropicales y tropicales posee gran cantidad de especies de orquídeas, el país se encuentra ubicado dentro de los 17 países con mayor biodiversidad a nivel mundial (Zambrano y Solano, 2011), así en el 2013, Vinicio Alvarado, el entonces Ministro de Turismo, declaró al Ecuador como “El país de las orquídeas”, refiriéndose a que el Ecuador posee 4 de las 5 subfamilias de orquídeas que existen en todo el mundo (Ministerio de Turismo del Ecuador, 2013; Rocha y Duque, 2017).

### 3.1.1 Importancia de la familia Orchidaceae

Londoño y Villanueva (2021), indican que las orquídeas son un elemento importante dentro del ecosistema debido a que estas plantas contribuyen al aumento de la masa vegetal lo que ayuda a la regulación hídrica, adicionalmente estas plantas generan asociaciones con gran cantidad de hongos micorrízicos, sirven también como alimento y refugio para otros organismos como abejas, hormigas, aves, murciélagos, mariposas, entre otros.

Una parte de las orquídeas son epífitas, mecanismo importante en los bosques debido a pueden atrapar nutrientes, principalmente el nitrógeno proveniente de varias fuentes como el aire o el agua; las orquídeas aprovechan la descomposición de hojarasca, árboles caídos, animales muertos, entre otros, ayudando a mantener el ciclo vital dentro de estos bosques (Palacios, 2014).

Debido a sus diferentes características morfológicas, colores y fragancias, han provocado que esta familia sea muy demandada a nivel global, generando grandes réditos

económicos (Li et al., 2021), es así que empresas tales como Ecuagenera han decidido colocar sus cimientos en el Ecuador.

En contraparte, muchas de estas especies endémicas del país se ven afectadas por los incendios forestales, deforestación de los bosques, crecimiento de la parte urbana, lo que impulsa a la creación de carreteras y sobre recolección de estas plantas para satisfacer el mercado (Parveen et al., 2017; Rocha y Duque, 2017). Por lo que es menester poder identificar las especies antes de que se encuentren extintas.

### 3.1.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de las orquídeas ha estado en constante investigación, habitualmente para la clasificación de organismos se los divide en 9 categorías básicas, sin embargo, las orquídeas incluyen 2 parámetros más, es decir, las tribus y las subtribus, esto debido a su gran diversidad (Aguilar, 2003). Así, la clasificación de las orquídeas según Chase et al. (2016) basados en APG IV:

**Reino:** Plantae

**Clado:** Angiospermas nucleares

**Subclado:** Monocotiledóneas

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae

En su contraparte, la clasificación presentada según Trópicos, (2022) las define de la siguiente manera:

**Reino:** Plantae

**Grupo:** Monocotiledóneas

**Clase:** Equisetopsida C.

**Subclase:** Magnoliidae

**Superorden:** Liliales

**Orden:** Asparagales

**Familia:** Orchidaceae

Cabe resaltar que existen 5 subfamilias de Orchidaceae, así se encuentran: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Epidendroideae y finalmente Orchidoideae (Pavone, 2022).

### 3.1.3 Morfología floral

Las flores de las orquídeas poseen simetría bilateral o denominadas zigomorfas, son hermafroditas, generalmente poseen androceo y gineceo fusionados, a esta fusión se la denomina columna (gimnostemio), está conformada por 3 lóbulos estigmáticos, uno de estos es conocido como rostelo debido a que secreta sustancias necesarias para el proceso de polinización; el polen suele estar reunido en unidades denominadas polinias, adicionalmente se debe mencionar que poseen una única antera fértil; los ovarios son triloculares y se encuentran debajo de las demás estructuras de la flor (Singer, 2009).

## Morfología de las orquídeas

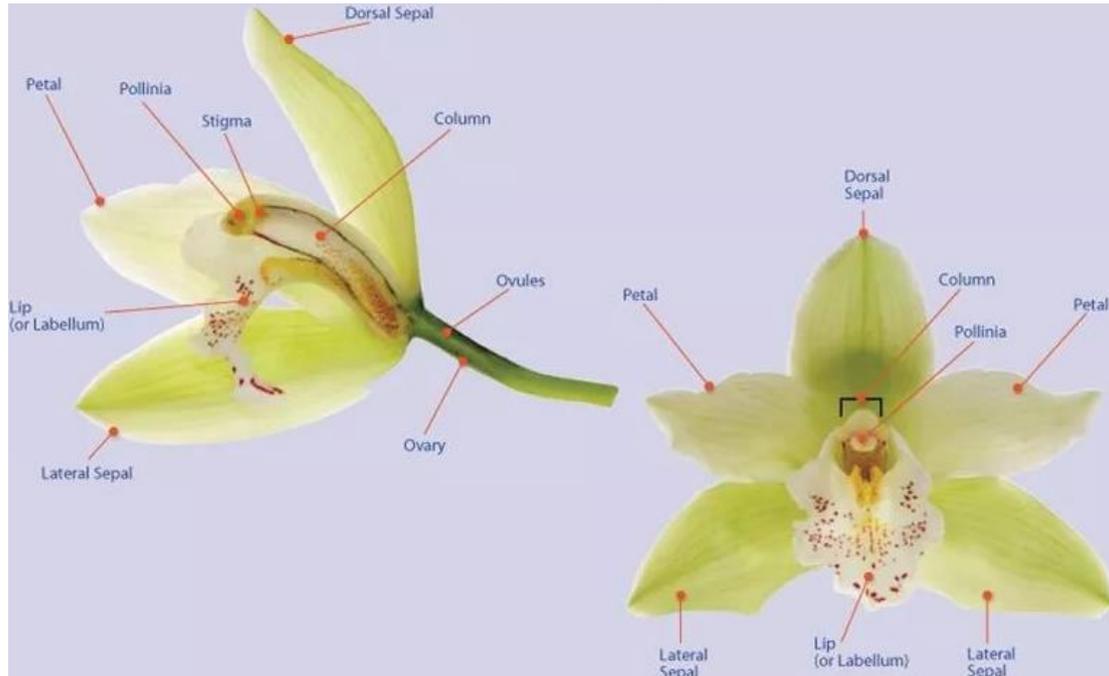


Figura 1. Morfología floral en orquídeas

Fuente: (Duarte, 2014)

La flor básicamente contiene 3 pétalos y 3 sépalos, 2 pétalos superiores poseen colores vivos, el pétalo restante es modificado y se lo conoce como labelo como se puede ver en la Figura 1, este actúa como apoyo para los insectos polinizadores; normalmente presentan inflorescencias en forma de espiga, panículas o racimos, aunque en otros casos las flores pueden ser solitarias protegidas por una bráctea (Duarte, 2014; Mosquera, 2012).

### 3.2 Grupo *Nocturnum*

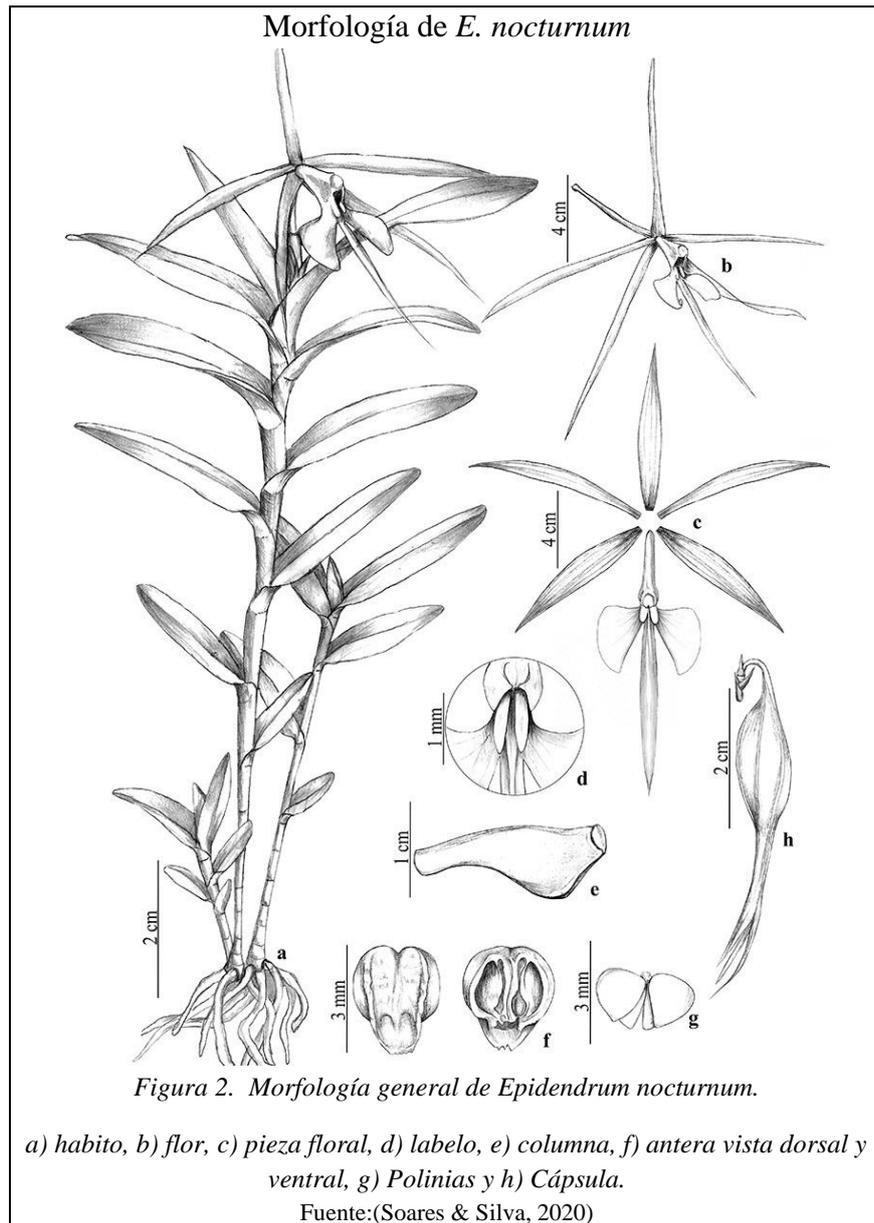
El grupo de *Epidendrum nocturnum* es un tipo nomenclatural del género *Epidendrum*. Esta especie mantiene una amplia distribución geográfica en toda América tropical (La Florida, México, Colombia, Brasil, Venezuela, Perú, Ecuador y el Caribe). Se estima que aproximadamente existen cerca de 35 especies dentro de este grupo, se caracterizan por ser plantas cespitosas, simpodales de inflorescencias pluriracemosas en forma de estrella

(Cordeiro et al., 2022). El grupo *Nocturnum* incluye especies como: *E. ciliare* L., *E. eburneum* Rchb. f., *E. parkinsonianum* Hooker, entre otras (Hágsater, 1984).

### 3.2.1 Descripción morfológica del grupo *Nocturnum*

Las especies pertenecientes al grupo de *Epidendrum nocturnum* son epífitas o litofitas, rara vez terrestre, de 15-70 cm de largo, raíces carnosas, basales y filiformes de 1,5-3 mm de diámetro (Soto et al., 2003); inflorescencias medianas pluri racemosas sin espata en forma de estrella de color amarillo verdoso y despoja un agradable aroma nocturno (Hágsater, 1984); pétalos lineares descendentes, posee un labelo tubulado en forma de “bucle”, posee un perianto de color blanco formado por tres lóbulos; tallo tubular en forma de caña, racemoso, erecto de 7 a 10 entrenudos; sus hojas son medianamente gruesas con ápice obtuso, son de color verde, con un nervio principal notable ligeramente invaginado por la región del nervio central, todo esto se puede verificar en la Figura 2

Figura 2. Morfología general de *Epidendrum nocturnum*. (Cordeiro et al., 2022).



### 3.3 Técnicas moleculares

Las técnicas de biología molecular ayudan en el análisis del material genético para la identificación y diferenciación de distintos genotipos de interés, para esto se procede a extraer el material genético, se amplifica la región de interés con ayuda de primers a través de una reacción en cadena de la polimerasa o PCR, para finalmente secuenciar por distintos métodos parte del genoma (Endara y Ocaña, 2022).

Iza (2018) dice que las células vegetales poseen 3 distintos genomas: genoma nuclear, genoma mitocondrial y genoma cloroplástico, estos dos últimos son de herencia materna en las angiospermas, es decir es uni parental, mientras que el genoma nuclear es biparental, es decir, proviene de los dos parentales; el desarrollo de marcadores moleculares está destinado en gran parte al genoma cloroplástico con marcadores tales como *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, *rpoL*, entre otros.

### 3.3.1 Marcadores moleculares en orquídeas

Azofeifa (2006) dice que en el pasado se empleaban los marcadores de tipo morfológicos para diferenciar especies, sin embargo, no son del todo correctos porque hay diferencias que no se pueden evidenciar a simple vista con el físico de la planta. Actualmente se emplean marcadores moleculares, los cuales muestran polimorfismos a nivel genético que se pueden evidenciar en todo el desarrollo de la planta.

En un marcador molecular o segmento de ADN, se pueden identificar alelos o variantes, a los segmentos que muestran diferencias se los denomina polimorfismos y se los puede detectar mediante la secuenciación de esta planta (Endara y Ocaña, 2022).

Existen 4 tipos de ADN en los que se pueden identificar dichos polimorfismos, el ADN nuclear, representa el 99% del contenido celular, el ADN ribosomal, su información solamente será transcrita mas no traducida; el ADN mitocondrial, en algunas plantas y hongos este tipo de ADN no codifica ya que se encuentra formado por intrones; finalmente el ADN cloroplástico, contiene tanto intrones como exones y es considerado como material genético muy conservado debido a que este codifica para las proteínas de la maquinaria fotosintética. Tanto el ADN mitocondrial como el cloroplástico, ayudan a

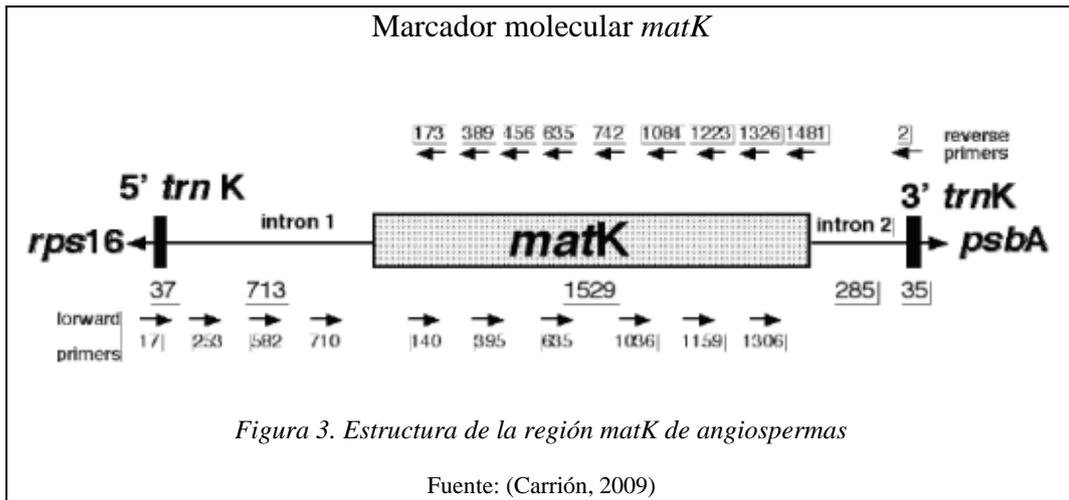
generar estructura poblacional relacionadas al linaje e historias filogenéticas, esto debido a la herencia uni parental de estos (Espinosa y Chávez, 2019; Méndez y González, 1997). Así, el empleo de marcadores moleculares resulta ser de vital importancia para la diferenciación filogenética de organismos.

En cuanto a las plantas, actualmente los marcadores moleculares más utilizados son a base de ADN cloroplástico debido a que han presentado bajo nivel de homoplasia, lo que ayuda a comparar entre taxones relacionados estrechamente, a nivel mundial los marcadores más utilizados en plantas son *ycf1*, *rpoC1*, *matK*, *rbcL*, *psab* y *ndhf*; para el género *Epidendrum* se sugiere el empleo de *ycf1*, *matK* y *rbcL* (Londoño & Villanueva, 2021). La región *matK* es sugerida como el código de barras universal para la identificación de plantas con flores (Trang et al., 2017).

#### 3.3.1.1 Región *matK*

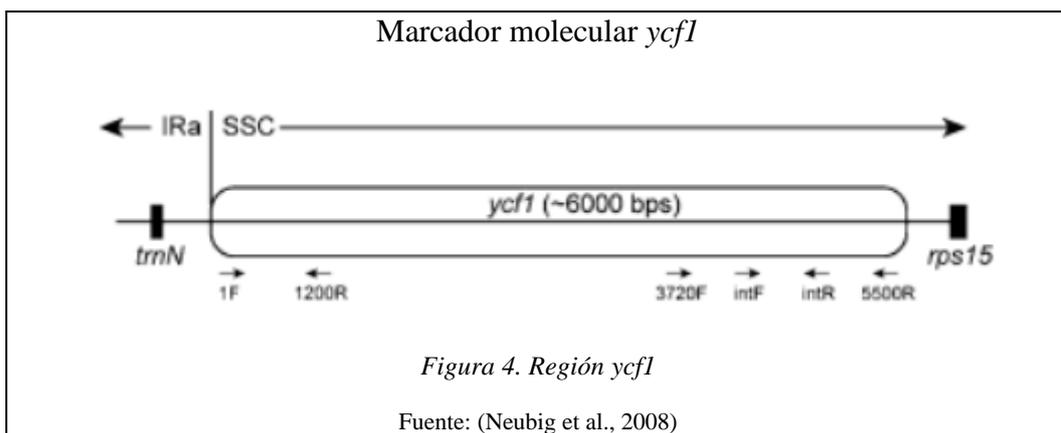
También conocido como gen *matK*, es un gen de tipo cloroplástico que va a codificar a la proteína maturasasa K, este posee entre 750 y 800 bp. La región 5' es menos conservada que la región 3', con esto se ofrecen caracteres para poder diferenciar a distintos niveles taxonómicos (Carrión, 2009; Hilu y Liang, 1997). Se puede verificar su estructura en la Figura 3.

Investigaciones demostraron que *matK* contribuye a características de tipo informativo y con significativamente más estructura genética que las que arroja el marcador molecular *rbcL*. Los indels son muy frecuentes en *matK*, aunque siempre se mantiene el marco de lectura, codificando para maturasas (Albán y Toapanta, 2019; Carrión, 2009).



### 3.3.1.2 Región *ycf1*

Se trata de ADN cloroplástico que contiene más de 1030 pb, se trata de una región muy variable, esta variación en la cantidad de pb radica en las zonas no codificantes que contiene esa parte del genoma. *Ycf1* abarca regiones de copia única pequeña (SSC) que posee gran variabilidad y también contiene regiones de repetición invertida (IR), son regiones muy conservadas como se puede ver en la Figura 4, todo esto lo hace muy útil para el empleo como marcador molecular (Dong et al., 2015).

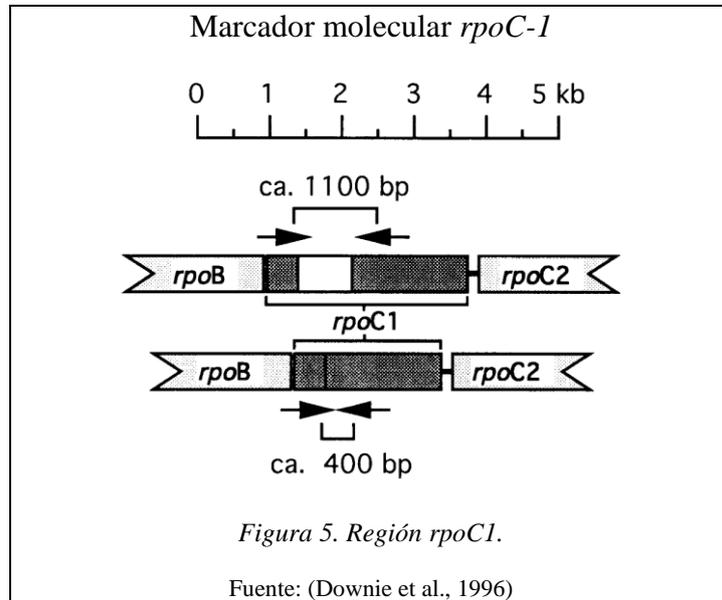


### 3.3.1.3 Región *rpoC1*

Denominado también como gen *rpoC*, codifica para la subunidad beta de la polimerasa de ARN, este gen se subdivide en *rpoC1* y *rpoC2* que se encuentra dentro de la gran

región *rpoC*; este gen es participe en la transcripción de genes del cloroplasto y se integra también a procesos de la fotosíntesis (Cruz et al., 2011).

El tamaño que posee esta región cloroplástica varía entre 500 y 750 pb y está delimitado por porciones de *rpoC2* y *rpoB*, tal y como se puede observar en la Figura 5.



### 3.4 Filogenia

Filogenia hace referencia al origen y desarrollo evolutivo de una especie u organismo a partir de un ancestro en común, además establece los vínculos evolutivos entre grupos de individuos mediante información de su ascendencia; de esta manera la secuencia de genes de un organismo permite comprender los patrones evolutivos de dicho individuo (Míño, 2018; Mogrovejo y Proaño, 2020).

Así, el análisis filogenético de secuencias ADN o ARN es un método molecular empleado para intuir patrones evolutivos cuyo proceso se encarga de realizar inferencias biológicas a partir material genético (Benitez, 2004).

Para esto se generan árboles filogenéticos, que pueden estar elaborados bajo diferentes criterios, en donde, se debe establecer un grupo interno que corresponden a las especies de estudio y en su contraparte, un grupo externo que son especies emparentadas al grupo

de estudio, pero lo suficientemente distintas para encontrarse fuera de dicho grupo (Endara y Ocaña, 2022).

Miño (2018) dice que utilizando herramientas informáticas se puede estimar tasas evolutivas, tiempos de divergencia, inferir secuencias ancestrales, entre otros.

## 4 Materiales y métodos

### 4.1 Recolección de muestras

El material vegetal recolectado para el análisis consistió en tejido foliar de especies del grupo *Nocturnum* previamente identificadas morfológicamente, las cuales fueron recolectadas en Santo Domingo, Imbabura, Pichincha, Napo y Pastaza; obteniendo un total de 15 muestras a las que se les asignó un código y registro en el libro de campo No. 11 de Marco Cerna.

Las muestras consistieron en tejido foliar joven sin daño mecánico y libres de enfermedades. Cada muestra fue almacenada en bolsas de papel Kraft etiquetadas con el código asignado y estas a su vez se las colocó en bolsas plásticas con cierre hermético. Se añadió silica gel para captar la humedad presente en las mismas para ser transportadas en un recipiente térmico frío para evitar la oxidación de estas como menciona Cerna y Miño (2018). Finalmente, las muestras fueron procesadas y almacenadas a -20 °C en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede el Girón.

### 4.2 Análisis molecular

#### 4.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el kit comercial *Thermo Scientific™ Phire Plant Direct PCR Master Mix de Thermo Fisher Scientific*, siguiendo las especificaciones del manual de uso, este método no es completamente eficiente por lo cual, se combinó este con el método descrito por Doyle y Doyle (1987), modificado por Mogrovejo y Proaño (2020) el fin de complementar la extracción de todas las muestras.

Así el protocolo tiene como primer paso la obtención de 50 mg de material vegetal, se añade 480 µL de Buffer de Lisis (100 mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl), seguidamente con la ayuda de un pistilo adaptado en un taladro Smart

BOSCH GSR 1000 se trituro el material vegetal hasta homogenizarlo, a continuacion, se anadio 75 µL de Dodecilsulfato sodico (SDS 10%) y se mezclo por inversion de 5 a 8 veces, posteriormente se coloco los microtubos de 1,5 mL en un termo bloque a 65 °C durante 10 minutos, a continuacion se anade 94 µL de acetato de potasio (5M), se mezclo por inversion de 5 a 8 veces y se coloco en hielo por 30 minutos, posteriormente se centrifugo a 12000 rpm por 5 minutos y se procedio a transferir el sobrenadante a un nuevo tubo, a continuacion se adiciona 600 µL de fenol: cloroformo (1:1) y se centrifugo por 5 minutos a 12000 rpm, se transfiere el sobrenadante de la fase intermedia en volúmenes aproximados de 200 µL a un nuevo microtubo, se agrego 360 µL de isopropanol frio y se procedio almacenar a -20°C por toda la noche; transcurrido el tiempo se centrifugo las muestras por 3 minutos a 12000 rpm, se observa la presencia de un pellet en la base del tubo y elimina el sobrenadante mediante inversion, se realizaron tres lavados anadiendo 200 µL de etanol (70%) centrifugando entre cada lavado a 12000 rpm por 3 minutos, finalmente empleando un termo bloque se evaporó el etanol, se resuspendió el pellet en 30 µL de TE 1X (TrisCl 10mM y EDTA 1 mM) y se almacenó a -20°C.

#### 4.2.2 Integridad de ADN

Se verificó la presencia o ausencia y calidad de ADN mediante una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, para ello se pesó 0,5 g de agarosa *Thermo Scientific* grado biología molecular y se anadio 50 mL de TBE 1X (27,5 g de ácido bórico; 2,93 g EDTA, 54 g Tris base pH 8), seguidamente, se agrego 0,20 µL del fluorocromo *SafeView™ Classic*; se coloco la solución en un molde con un peine de 14 pocillos y se deja gelificar, se retiró cuidadosamente el gel del molde y coloco el gel en la cámara de electroforesis horizontal *Labnet*; posteriormente se procedio a cubrir el gel con TBE 1X

y se añadió en cada pocillo 5  $\mu\text{L}$  de la solución (1  $\mu\text{L}$  de tampón de carga Blue Juice 2X, 4  $\mu\text{L}$  ADN extraído); finalmente se corrió la electroforesis por 30 minutos a 100 voltios como describe Mogrovejo y Proaño (2020); los resultados se revelaron en un foto documentador *Bio-imaging systems*® y se determinó el tamaño de la cadena comparándolas con las bandas de los marcadores moleculares de *Thermo Scientific* de 100 a 5000 bp.

#### 4.2.3 Amplificación de regiones de ADN.

De acuerdo con Montalvo y Vargas (2019), se utilizó la técnica molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional, para amplificar las regiones *matK*, *ycf1* y *rpoCl*; se usó un termociclador marca *ProFlex PCR System, Applied Biosystems-USA* y se empleó el kit *Phire Plant Direct PCR MásterMix de Thermo Fisher Scientific*. Finalmente se añadió la Master Mix cloruro de magnesio al 25Mm como se puede ver en Tabla 1 para optimizar la concentración de los iones de magnesio que potencializa la reacción de la polimerasa.

Tabla 1. Composición de la mezcla PCR en base al protocolo sugerido por *Thermo Scientific*

| <b>Reactivo</b>                          | <b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>) para 1 muestra</b> |
|--|--|
| <i>Phire Plant Direct PCR Master Mix</i> | 12.5   |
| <i>Primer forward</i>                    | 1  |
| <i>Primer reverse</i>                    | 1  |
| Agua de PCR                              | 4.5  |
| $\text{MgCl}_2$                          | 1  |
| ADN template                             | 5  |
| <b>Volumen final de la reacción</b>      | <b>25</b>  |

Elaborado por: Los Autores, 2022.

Las condiciones de amplificaciones para las regiones *matK* y *rpoCl* fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98°C por 5 minutos; seguidamente, 40 ciclos de 98 °C por 10 segundos para la desnaturalización, hibridación a 53,5 °C por 10 segundos, para la extensión 72 °C por 1 minuto y por último una temperatura de 72 °C por 10 minutos para la extensión final como sugiere Iza (2018). Mientras que, para la región *ycfI* se utilizó una temperatura de hibridación de 55°C. Los resultados de la amplificación se analizaron por medio de una electroforesis horizontal en gel de 1%, con 5 µL de producto de PCR en las condiciones descritas en la sección 4.2.2.

#### 4.2.4 Secuenciación

Los productos de PCR obtenidos fueron diluidos con agua libre de nucleasas hasta obtener una concentración de 20 ng/µL y se colocó 20 µL de muestra en microtubos *Eppendorf* de 1.5 mL, para posteriormente etiquetarlos y almacenarlos según los requerimientos de la empresa *Macrogen Inc.* (Seúl, Corea del sur) en donde las muestras fueron purificadas y secuenciadas mediante el método de Sanger automatizado.

#### 4.2.5 Filogenia

Como sugieren Montalvo y Vargas (2019) en su trabajo de investigación, se revisó y editó las secuencias recibidas mediante el software Geneious v 2.1; una vez obtenidas las secuencias limpias, en el programa MEGA v 11.0 se realizó un alineamiento múltiple con el sistema MUSCLE con los parámetros predeterminados. Para la construcción de los árboles filogenéticos para cada región, se empleó el software en línea Gblocks 0.91b para limpiar y mantener las regiones conservadas de las secuencias alineadas. A continuación, para la construcción de los árboles filogenéticos se aplicó los métodos de estimación de Máxima Verosimilitud con el modelo evolutivo Tamura 3-parameter con distribución

gamma (T92+G) con un Bootstrap de 500 en el programa MEGA v 11.0, a su vez se aplicó un segundo método de reconstrucción filogenética: Inferencia Bayesiana con el modelo de sustitución TN93. Las secuencias fueron cargadas en el programa BEAST v1.10.4 y por último se visualizó el árbol consenso con el programa FigTree v1.4.4 con los valores del soporte estadísticos de probabilidad posterior.

#### 4.3 Georreferenciación

Las coordenadas geográficas de las ubicaciones de cada especie fueron tomadas con aplicación móvil de GPS denominada UTM Geo Map, a continuación, los datos se georreferenciaron en la plataforma digital *Google Earth*. Finalmente, se analizó los registros para correlacionar los datos geográficos con los datos filogénicos obtenidos, analizando su elevación, distribución y ubicación para así establecer los puntos de diversificación (Sánchez, 2020).

## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Recolección de muestras

La recolección de muestras de tejido foliar de *E. nocturnum* se realizó en 5 provincias del Ecuador, en las cuales se obtuvieron 15 muestras vegetales para este estudio, como se puede ver en Tabla 2.

Tabla 2. Listado de muestras obtenidas con sus respectivas coordenadas de colección y concentración.

| No. de muestra | Código de colección | Lugar de muestreo, coordenadas  | Concentración de ADN aprox. (ng/0.5µg) |                      |
|----------------|---------------------|---|--|----------------------|
|                |                     |   | Método Doyle y Doyle, 1987             | Método Kit Comercial |
| 1              | (1) 4697            | Napo - Tena<br>-0.931665, -<br>77.820413  | 40                                     | >50                  |
| 2              | (2) 4698            | Pastaza-Puyo<br>-1.473996, -<br>77.997732   | 40                                     | >50                  |
| 3              | (3) 4699            | Vía<br>Chiriboga<br>-0.265005, -<br>78.724571                                     | 40                                     | >50                  |
| 4              | (4) 4700            | Vía a Intag<br>0.359486, -<br>78.402227   | 40                                     | >50                  |
| 5              | (5) 4701            | Vía a Intag<br>0.359486, -<br>78.402227   | 40                                     | >50                  |
| 6              | 4508                | Bellavista,<br>vía Sto.<br>Domingo de<br>los Tsáchilas<br>-0.45107, -<br>78.65725 | 100                                    | -                    |
| 7              | 4509                | Bellavista,<br>vía Sto.<br>Domingo de<br>los Tsáchilas<br>-0.45107, -<br>78.65725 | 100                                    | -                    |

|    |        |   |     |   |
|----|--------|---|-----|---|
| 8  | 4499   | Vía<br>Chiriboga<br>-0.2271102,<br>-78.7689679                                    | 100 | - |
| 9  | 4504   | Reserva del<br>Río Guajalito<br>-0.2127308, -<br>78.8112401                       | 100 | - |
| 10 | 4491   | Vía<br>Chiriboga<br>-0.265005, -<br>78.724571                                     | 100 | - |
| 11 | 4499-2 | Vía<br>Chiriboga<br>-0.265005, -<br>78.724571                                     | 50  | - |
| 12 | 4509-2 | Bellavista,<br>vía Sto.<br>Domingo de<br>los Tsáchilas<br>-0.45199, -<br>78.65780 | 50  | - |
| 13 | 4517   | Vía a Intag<br>0.359486, -<br>78.402227   | 100 | - |
| 14 | 4500   | Vía<br>Chiriboga<br>-0.265005, -<br>78.724571                                     | 100 | - |
| 15 | 4519   | Vía a Intag<br>0.359486, -<br>78.402227   | 40  | - |

Elaborado por: Los Autores, 2022.

De acuerdo con la base de datos de Trópicos (2022), la distribución de *E. nocturnum* en el Ecuador, se encuentra dada en Esmeraldas, Imbabura y Sucumbíos.

## 5.2 Análisis molecular

### 5.2.1 Extracción de ADN

Mediante el empleo de los protocolos descritos por Doyle y Doyle, 1987 y empleando el *kit Phire Plant Direct PCR Master Mix*, se logró obtener ADN de 15 muestras colectadas durante las salidas de campo, tal y como se puede evidenciar en la Tabla 2. Así mismo, Endara y Ocaña (2022) obtuvieron mejores resultados para la extracción de ADN empleando el método de Doyle & Doyle 1987, esto lo atribuyen a que en este protocolo se emplea un pistilo para realizar la ruptura mecánica, además de distintos solventes y no únicamente la punta de micropipeta como en el caso de extracción por kit comercial.

Las bandas de ADN de las 15 muestras obtenidas por el método de Doyle y Doyle (1987), no presentaron barrido o degradación alguna como se puede verificar en Figura 6, en contraparte, por método en el que se emplea el kit comercial, *Phire Plant Direct PCR Máster de Thermo Fisher Scientific*, se obtuvieron solamente bandas de 3 muestras muy débiles, con poca definición y con barrido como se evidencia en la Figura 7, por lo cual se optó por emplear el primer método para la obtención de ADN vegetal.

Electroforesis en gel de agarosa de ADN total por protocolo de Doyle y Doyle 1987.

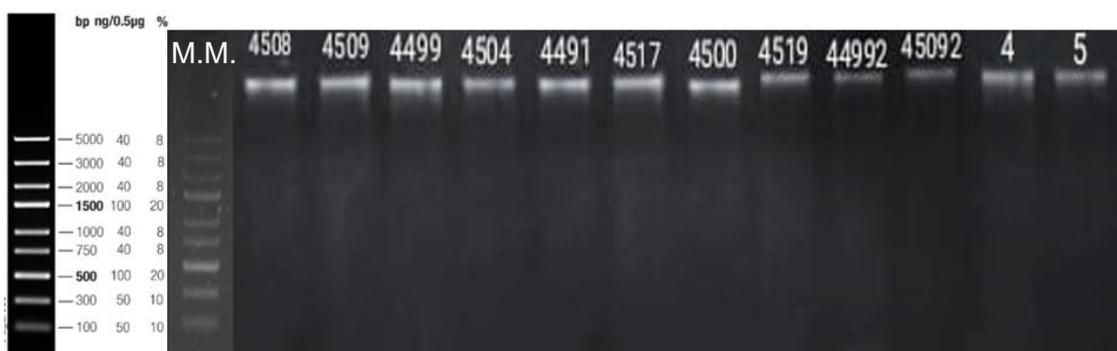
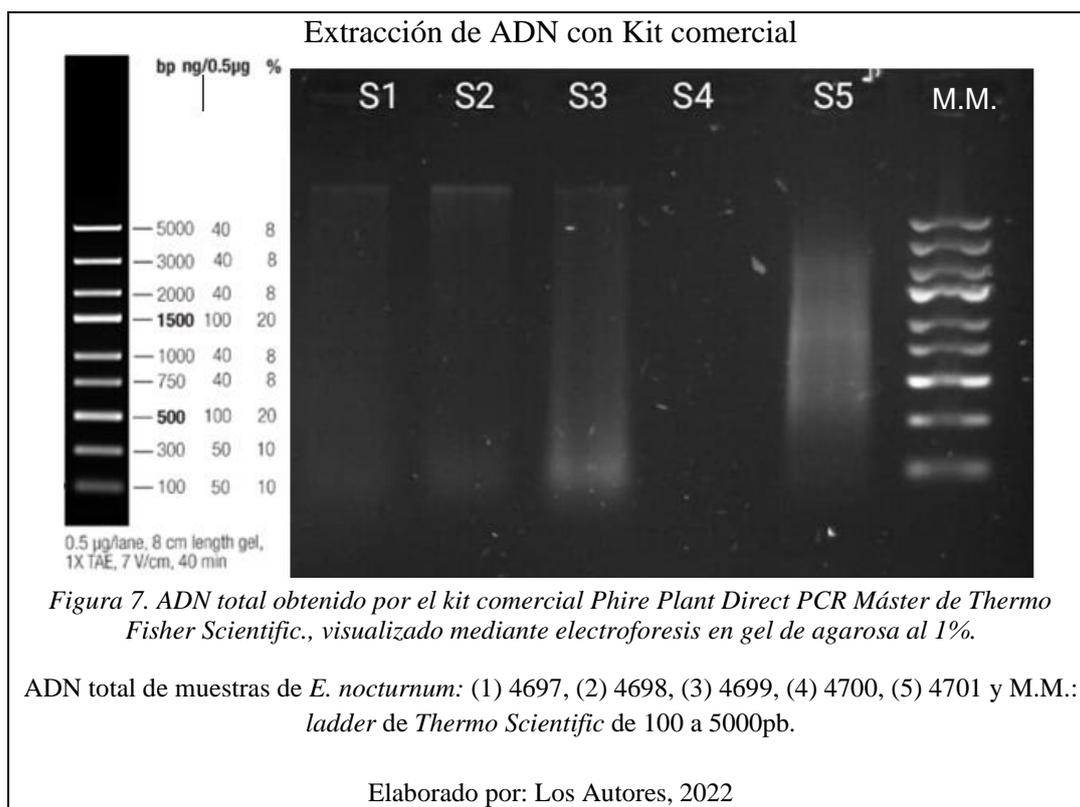


Figura 6. ADN total obtenido por protocolo de Doyle & Doyle, 1987, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

M.M.: ladder de Thermo Scientific de 100 a 5000pb, muestras de *E. nocturnum*: 4508, 4509, 4499, 4504, 4491, 4517, 4500, 4519, 44499-2, 4509-2, (4) 4700 y (5) 4701.

Elaborado por: Los Autores, 2022.



### 5.2.2 Amplificación de regiones de ADN por PCR convencional

A partir de los resultados obtenidos de la extracción de ADN, se amplificaron los genes *matK*, *ycf1* y *rpoC1* de las 15 muestras, ver Tabla 3.

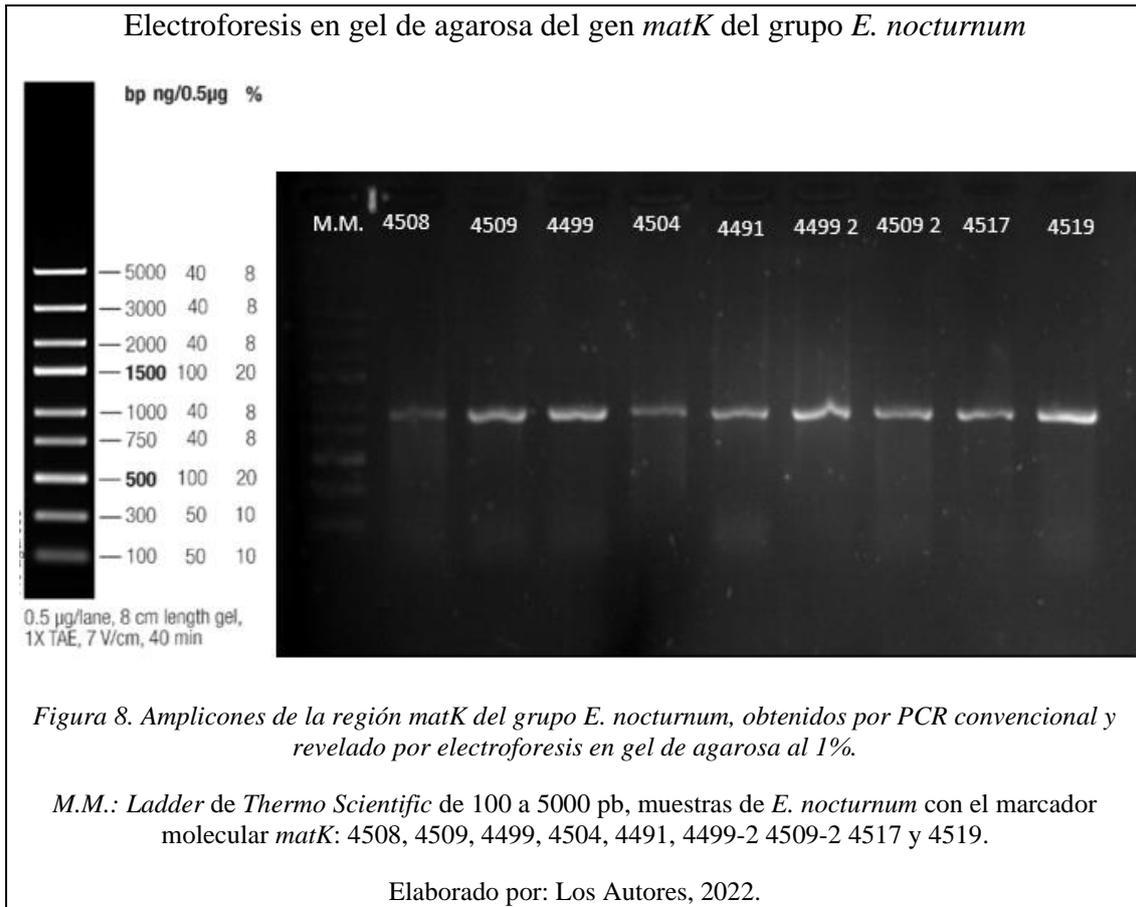
Tabla 3. Muestras amplificadas y su concentración para cada marcador molecular.

| Código   | Concentración aprox.<br>(ng/0.5µg) |             |              |
|----------|------------------------------------|-------------|--------------|
|          | <i>matK</i>                        | <i>ycf1</i> | <i>rpoC1</i> |
| (1) 4697 | 50                                 | > 40        | 50           |
| (2) 4698 | 50                                 | 50          | 50           |
| (3) 4699 | 50                                 | > 40        | 50           |
| (4) 4700 | 50                                 | 50          | 50           |
| (5) 4701 | 50                                 | 50          | > 40         |
| 4508     | > 40                               | > 40        | 40           |
| 4509     | 50                                 | 40          | 50           |
| 4499     | 100                                | 40          | 100          |
| 4504     | 40                                 | > 40        | 40           |
| 4491     | 100                                | 40          | > 40         |
| 4499-2   | 100                                | 50          | 100          |
| 4509-2   | 100                                | > 40        | 50           |
| 4517     | 100                                | > 40        | 90           |
| 4500     | > 40                               | > 40        | > 40         |
| 4519     | 100                                | 40          | 90           |

Elaborado por: Los Autores, 2022

#### 5.2.2.1 Amplificación de la región *matK*

Para la región cloroplástica *matK*, se amplificaron 15 muestras empleando el cebador forward: 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3' y el cebador reverse: 5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3', el tamaño del amplicón obtenido tuvo una longitud de 800pb como se puede ver en la Figura 8, dichos resultados coinciden a los obtenidos por Endara y Ocaña (2022) con el género *Restrepia*; Iza (2018) con el género *Drácula* y Miño (2018) con el género *Passiflora*.



### 5.2.2.2 Amplificación de la región *rpoC1*

En cuanto al marcador *rpoC1* se logró amplificar 15 muestras empleando el cebador forward: 5'-GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3' y el cebador reverse: 5'-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC-3', obteniendo una longitud del amplicón de 500 pb como se aprecia en Figura 9, resultados similares a los obtenidos por Iza (2018), dicho autor empleó muestras del género *Dracula*, además Endara y Ocaña (2022) con *Restrepia*, obtuvieron cadenas entre los 500 y 750 pb.

### Electroforesis en gel de agarosa del gen *rpoC1* del grupo *E. nocturnum*

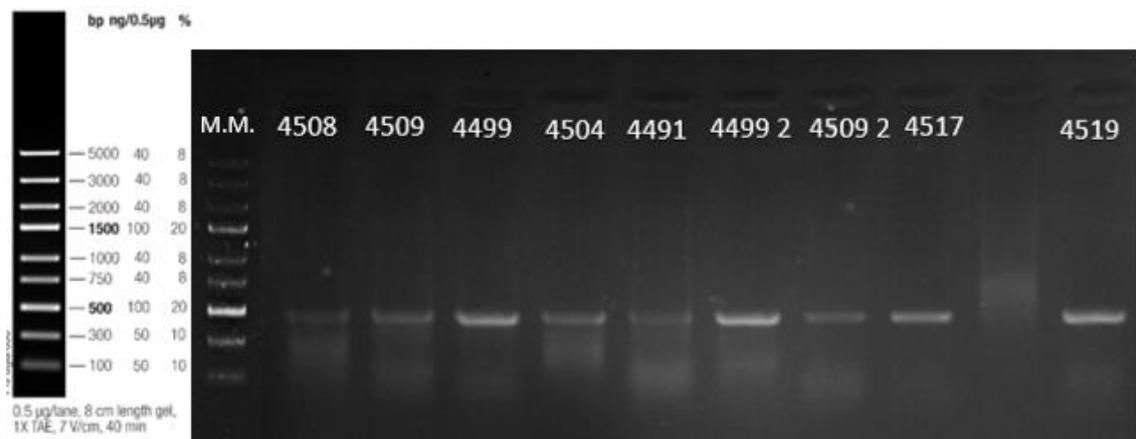


Figura 9. Amplicones de la región *rpoC1* del grupo *E. nocturnum* obtenidos por PCR convencional y revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

M.M.: ladder de Thermo Scientific de 100 a 5000 pb, muestras de *E. nocturnum* con el marcador molecular *rpoC1*: 4508, 4509, 4499, 4504, 4491, 4499-2, 4509-2, 4517 y 4519.

Elaborado por: Los Autores, 2022.

#### 5.2.2.3 Amplificación de la región *ycf1*

Finalmente, con la región *ycf1* se amplificó exitosamente 15 muestras con el cebador forward: 5'-TGAACGAATGGAAAACTGGTT-3' y el cebador reverse: 5'-AACCAGTTTTTCCATTCGTTC-3'; el amplicón obtenido presentó alrededor de 1500 pb como se puede visualizar en la Figura 10, similar a los datos obtenidos por Dong et al. (2015) en su trabajo de investigación en donde evalúa los marcadores moleculares cloroplásticos, entre ellos *ycf1*.

### Electroforesis en gel de agarosa del gen *ycf1* del grupo *E. nocturnum*

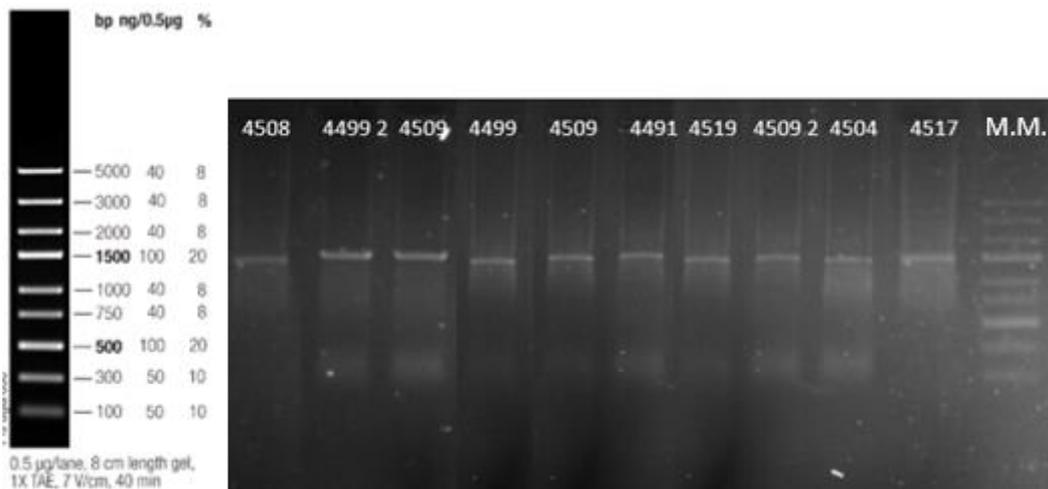


Figura 10. Amplicones de la región *ycf1* de *E. nocturnum* obtenidos por PCR convencional y revelado por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Muestras de *E. nocturnum* con el marcador molecular *ycf1*: 4508, 4499-2, 4509, 4499, 4509, 4491, 4519, 4509-2, 4504, 4517 y M.M.: ladder de Thermo Scientific de 100 a 5000 pb.

Elaborado por: Los Autores, 2022.

### 5.2.3 Secuenciación

La calidad de las muestras secuenciadas fue verificada en el programa informático Geneious v 2.1, se obtuvieron 13 de 15 muestras secuenciadas para *matK*, ver Figura 11, 10 de 15 muestras secuenciadas para *ycf1*, ver Figura 12 y 14 de 15 muestras secuenciadas para el marcador *rpoC1*, ver Figura 13, dichas secuencias poseían una calidad superior al 40%, como se puede verificar en la Tabla 4.

Tabla 4. Listado de muestras secuenciadas con su porcentaje de calidad.

| #  | MUESTRAS     | MARCADOR MOLECULAR | %HQ   |
|----|--------------|--------------------|-------|
| 1  | MOV (1) 4697 | <i>matK</i>        | 57,60 |
| 2  | MOV (2) 4698 | <i>matK</i>        | 49,00 |
| 3  | MOV (3) 4699 | <i>matK</i>        | 56,00 |
| 4  | MOV (4) 4700 | <i>matK</i>        | 60,00 |
| 5  | MOV (5) 4701 | <i>matK</i>        | 45,00 |
| 6  | MOV4508      | <i>matK</i>        | 60,60 |
| 7  | MOV4509      | <i>matK</i>        | 66,30 |
| 8  | MOV4499      | <i>matK</i>        | 80,60 |
| 9  | MOV4504      | <i>matK</i>        | 29,10 |
| 10 | MOV4491      | <i>matK</i>        | 54,60 |
| 11 | MOV4499-2    | <i>matK</i>        | 58,50 |
| 12 | MOV4509-2    | <i>matK</i>        | 72,60 |
| 13 | MOV4517      | <i>matK</i>        | 61,10 |
| 14 | MOV4500      | <i>matK</i>        | 10,70 |
| 15 | MOV4519      | <i>matK</i>        | 62,60 |
| 16 | ROV (1) 4697 | <i>rpoC1</i>       | 55,30 |
| 17 | ROV (2) 4698 | <i>rpoC1</i>       | 57,60 |
| 18 | ROV (4) 4700 | <i>rpoC1</i>       | 60,00 |
| 19 | ROV (5) 4701 | <i>rpoC1</i>       | 53,00 |
| 20 | ROV4508      | <i>rpoC1</i>       | 59,70 |
| 21 | ROV4509      | <i>rpoC1</i>       | 61,30 |
| 22 | ROV4499      | <i>rpoC1</i>       | 75,50 |
| 23 | ROV4504      | <i>rpoC1</i>       | 59,10 |
| 24 | ROV4491      | <i>rpoC1</i>       | 51,20 |
| 25 | ROV4499-2    | <i>rpoC1</i>       | 85,40 |
| 26 | ROV4509-2    | <i>rpoC1</i>       | 90,00 |
| 27 | ROV4517      | <i>rpoC1</i>       | 90,60 |
| 28 | ROV4500      | <i>rpoC1</i>       | 39,90 |
| 29 | ROV4519      | <i>rpoC1</i>       | 88,50 |
| 30 | ROV (3) 4699 | <i>rpoC1</i>       | 37,00 |
| 31 | YOV (1) 4697 | <i>ycf1</i>        | 0,00  |
| 32 | YOV (2) 4698 | <i>ycf1</i>        | 46,60 |
| 33 | YOV (4) 4700 | <i>ycf1</i>        | 45,00 |
| 34 | YOV (5) 4701 | <i>ycf1</i>        | 48,00 |
| 35 | YOV4508      | <i>ycf1</i>        | 57,80 |
| 36 | YOV4509      | <i>ycf1</i>        | 60,30 |
| 37 | YOV4499      | <i>ycf1</i>        | 64,30 |
| 38 | YOV4504      | <i>ycf1</i>        | 0,00  |
| 39 | YOV4491      | <i>ycf1</i>        | 0,00  |
| 40 | YOV4499-2    | <i>ycf1</i>        | 68,60 |
| 41 | YOV4509-2    | <i>ycf1</i>        | 74,30 |
| 42 | YOV4517      | <i>ycf1</i>        | 36,10 |
| 43 | YOV4500      | <i>ycf1</i>        | 14,40 |
| 44 | YOV4519      | <i>ycf1</i>        | 38,80 |
| 45 | YOV(3) 4699  | <i>ycf1</i>        | 14,30 |

Elaborado por: Los Autores, 2022.

Muestra 4499 con el marcador molecular *matK* visualizada en Geneious v 2.1

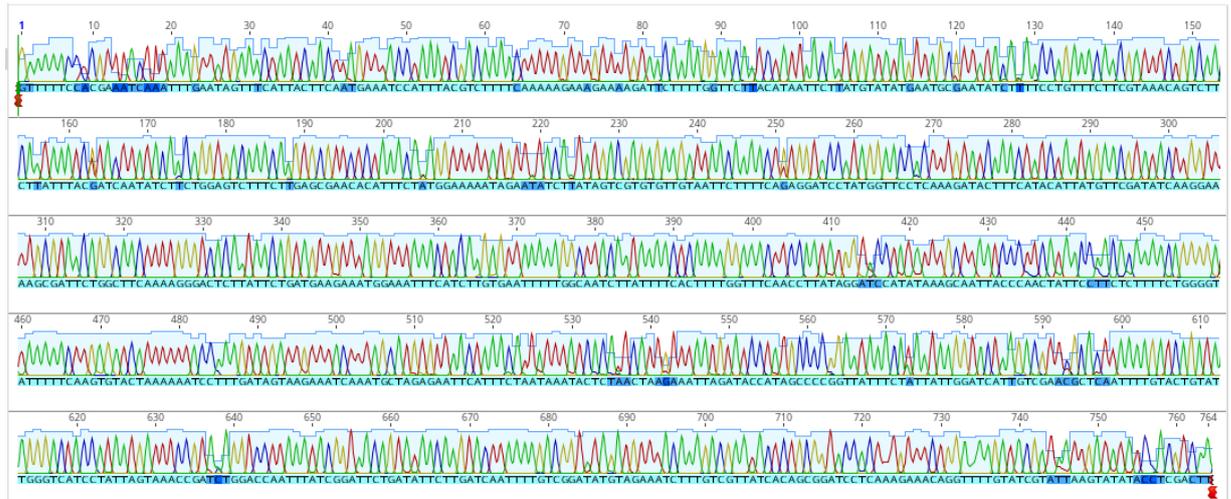


Figura 11. Secuencia de 4499 con el marcador *matK* visualizado en Geneious

Elaborado por: Los Autores, 2022.

Muestra 4517 con el marcador molecular *rpoC1* visualizada en Geneious v 2.1

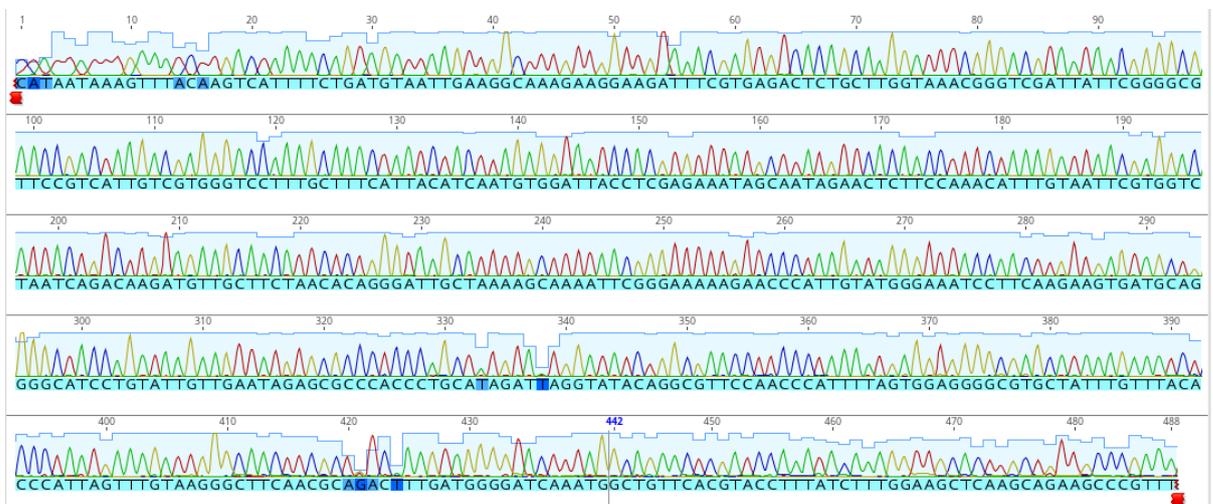


Figura 12. Secuencia de 4517 con el marcador *rpoC1* visualizado en Geneious

Elaborado por: Los Autores, 2022.

### Muestra 4509-2 con el marcador molecular *ycf1* visualizada en Geneious v 2.1

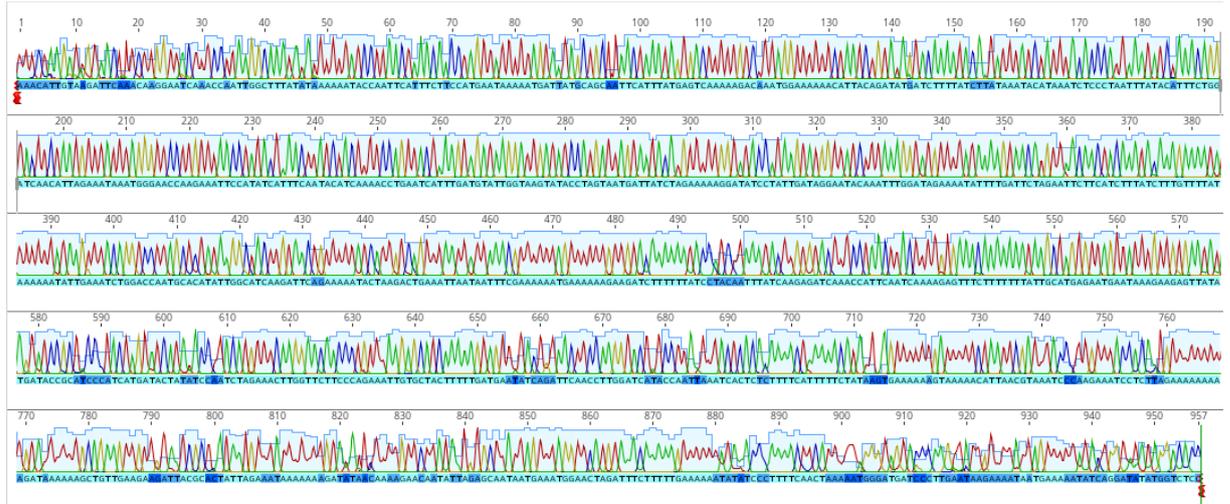


Figura 13. Secuencia de 4509-2 con el marcador *ycf1* visualizado en Geneious

Elaborado por: Los Autores, 2022.

## 5.2.4 Filogenia

### 5.2.4.1 Región *matK*

Para el marcador molecular *matK*, se emplearon 13 secuencias, se añadió un grupo externo tomado de GeneBank conformado por cuatro individuos: *Goodyera schlechtendaliana* LC686067.1, *Orchidaceae sp.* JQ589743.1 y *Platanthera chorisiana* KF262016.1, respectivamente, debido a que forman parte de la familia Orchidaceae, estas sirvieron para enraizar el árbol filogenético. Además, se insertó la secuencia de *Epidendrum nocturnum* voucher, KY607228.1, para confirmar las secuencias del grupo. Haciendo referencia a la filogenia obtenida, Figura 14, se puede identificar un gran grupo conformado por los miembros de los clados B y C, estos dos subclados poseen un soporte estadístico elevado, de 86; al tener como referencia en el grupo a la secuencia *Epidendrum nocturnum* voucher, KY607228.1, se puede decir que este gran grupo pertenece a esta especie.

El grupo A conformado por 4491, (2) 4698 y 4499-2, poseen características morfológicas similares a *E. nocturnum*, pero genéticamente se puede evidenciar que están lejos de ser un miembro del gran grupo antes mencionado.

Los individuos 4499 y 4508 definitivamente no pertenecen a *Epidendrum nocturnum*, pues se encuentran en clados lejanos al gran grupo conformado por B y C.

No se evidenció ninguna politomía dentro del árbol consenso para este marcador molecular.

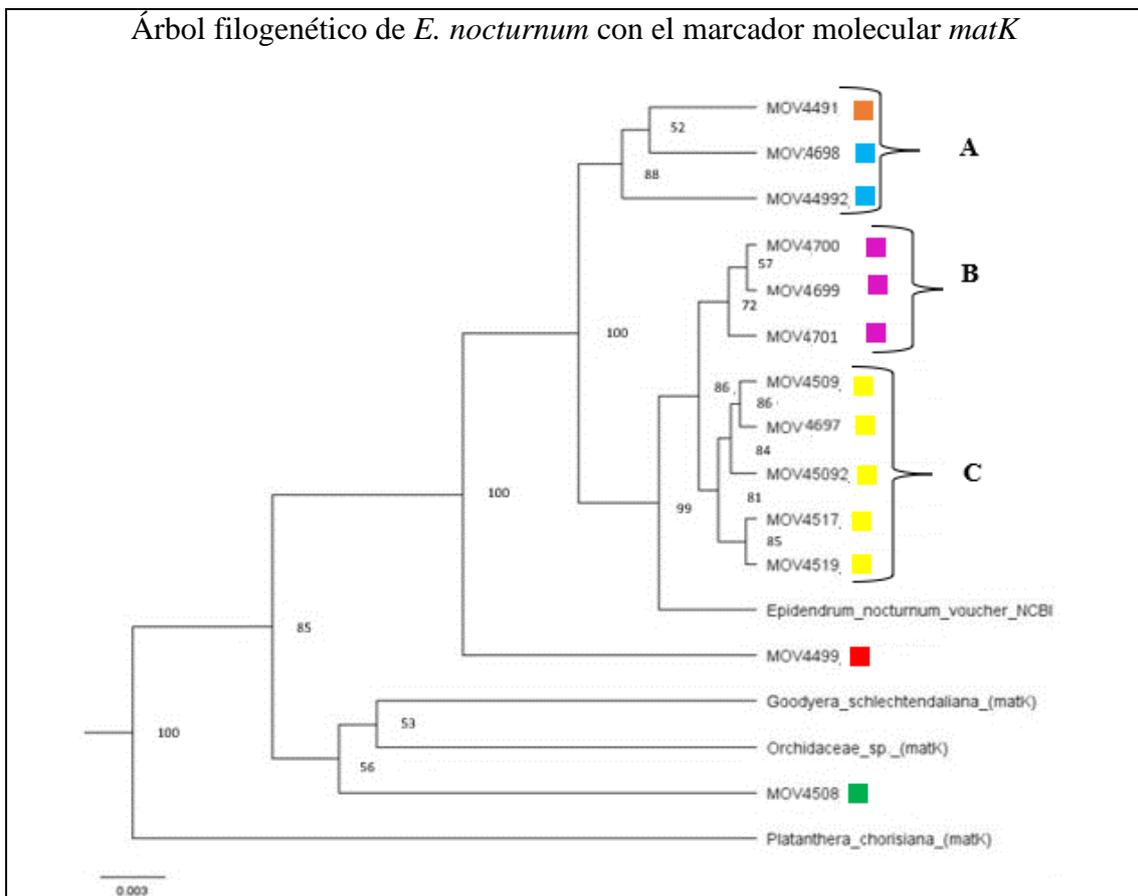


Figura 14. Árbol filogenético del grupo *E. nocturnum* con el marcador molecular *matK*.

Muestras del grupo *E. nocturnum*: 4491 ■, (2) 4698 ■, 4499-2 ■, (4) 4700 ■, (3) 4699 ■, (5) 4701 ■, 4509 ■, (1) 4697 ■, 4509-2 ■, 4517 ■, 4519 ■, 4499 ■, 4508 ■ y *Epidendrum nocturnum* voucher, además del grupo externo: *Goodyera schlechtendaliana*, *Orchidaceae sp.* y *Platanthera chorisiana*.

Elaborado por: Los Autores, 2022.

#### 5.2.4.2 Región *ycf1*

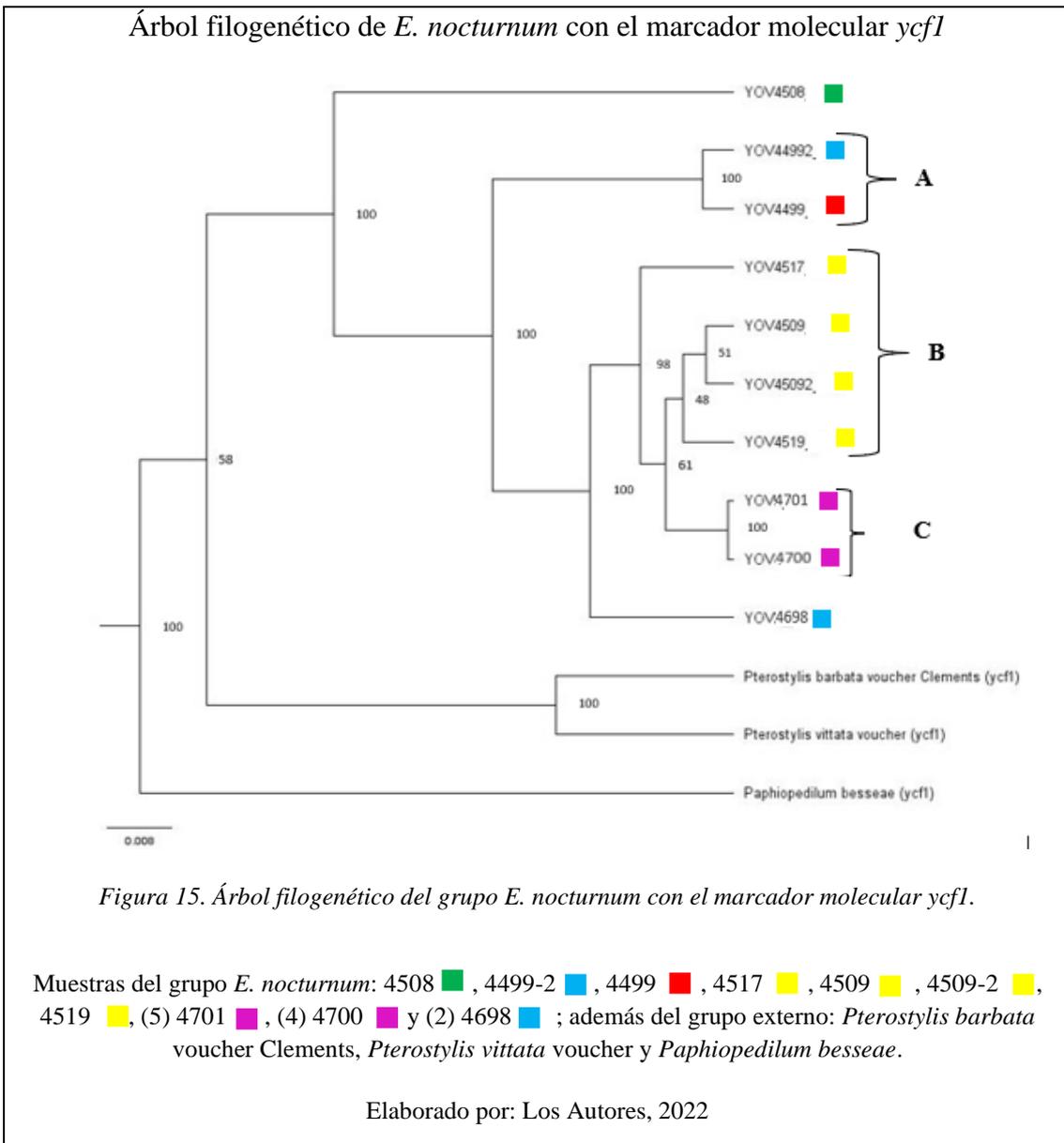
Para el marcador molecular *ycf1*, se utilizaron 10 muestras y se añadió un grupo externo formado por tres muestras que son: *Pterostylis vittata* voucher MG695293.1, *Pterostylis barbata* MG695291.1 y *Paphiopedilum besseae* JQ929562.1, fueron tomadas como grupo externo debido a que pertenecen a Orchidaceae, estos 3 individuos sirvieron para enraizar el árbol filogenético como se observa en la Figura 15.

Al igual que con el marcador *matK*, se genera un gran grupo conformado por los individuos de clado B y C, estos poseen una gran similitud con *Epidendrum nocturnum*. Según la Figura 15, el individuo (2) 4698 puede tratarse de una subespecie del grupo de estudio, al tener cierta cercanía a este, sin embargo, al realizar una búsqueda con BLAST, la similitud más alta alcanzada es del 96,03% con *Laelia speciosa*, KR908948.1, que pertenece a la familia de las orquídeas.

Se debe resaltar que los individuos 4499-2 y 4499 poseen un gran parentesco debido a que están en la misma rama del árbol filogenético, esto se puede deber a que las muestras fueron obtenidas de sectores cercanos, es decir, vía Intag, el mismo caso ocurre con los individuos (4) 4700 y (5) 4701, poseen un soporte estadístico de 100 y se encuentran juntos en la misma rama, ambos fueron colectados en sectores aledaños vía Intag.

Con este marcador molecular, se puede aseverar que los individuos 4499-2 y 4499 son una especie diferente a *E. nocturnum* debido a la lejanía que presentan en el árbol, ver Figura 15. Se puede afirmar que 4508 no pertenece al grupo de estudio, debido a la lejanía genética que presenta con los otros individuos.

Cabe mencionar que no se evidenció ninguna politomía dentro del árbol consenso para este marcador molecular.



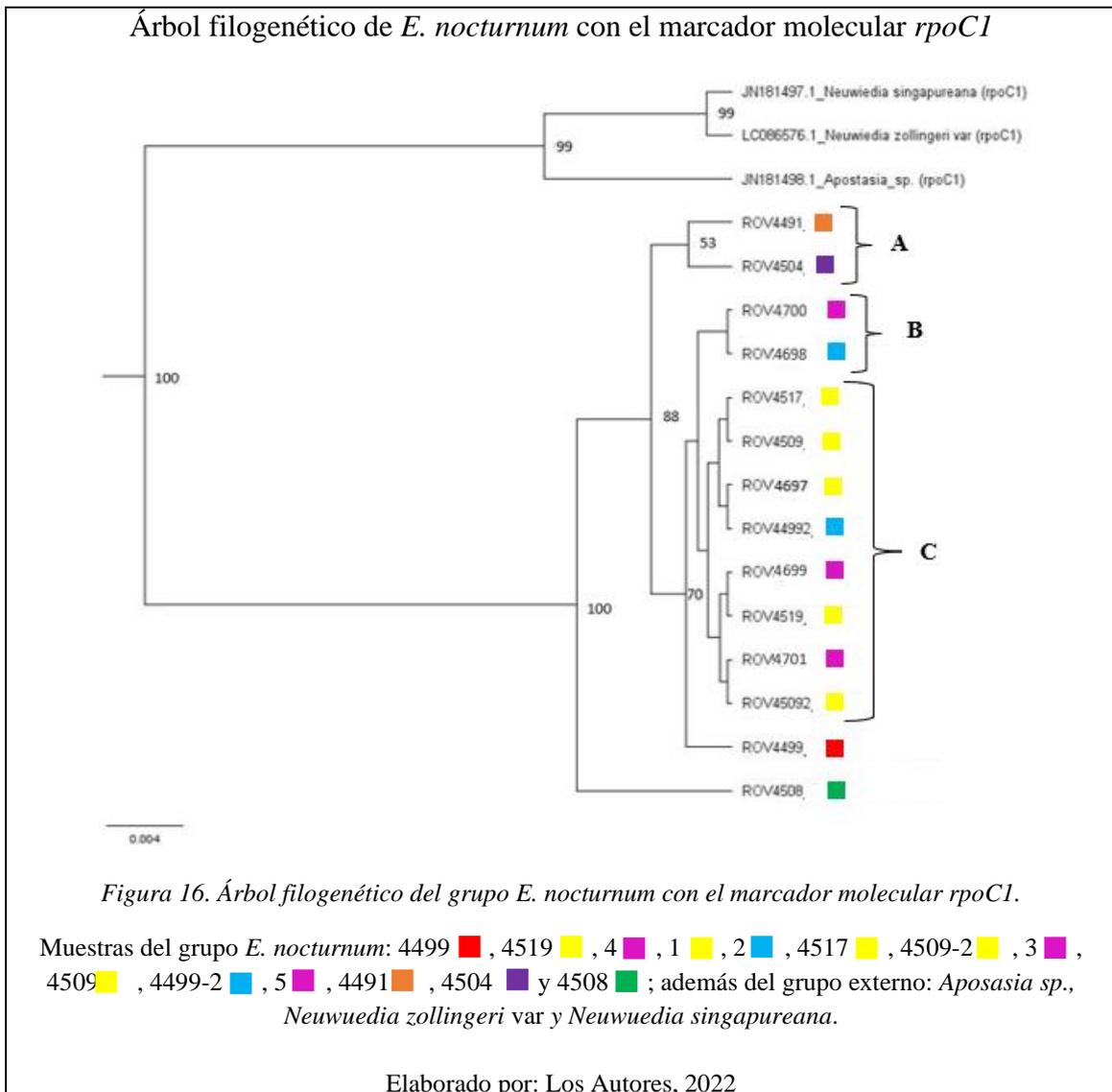
#### 5.2.4.3 Región *rpoC1*

Finalmente, para el marcador molecular *rpoC1*, se utilizaron 14 muestras secuenciadas, se añadió un grupo externo formado por 3 individuos denominados: *Neuwuedia singaporeana* LC086576.1, *Neuwuedia zollingeri* var JN181497.1 y *Apostasia* sp. JN181498.1, estos fueron elegidos como grupo externo ya que pertenecen al mismo orden que las muestras tratadas, es decir, Asparagales, estos individuos fueron empleados para enraizar el árbol filogenético como se ve en la Figura 16.

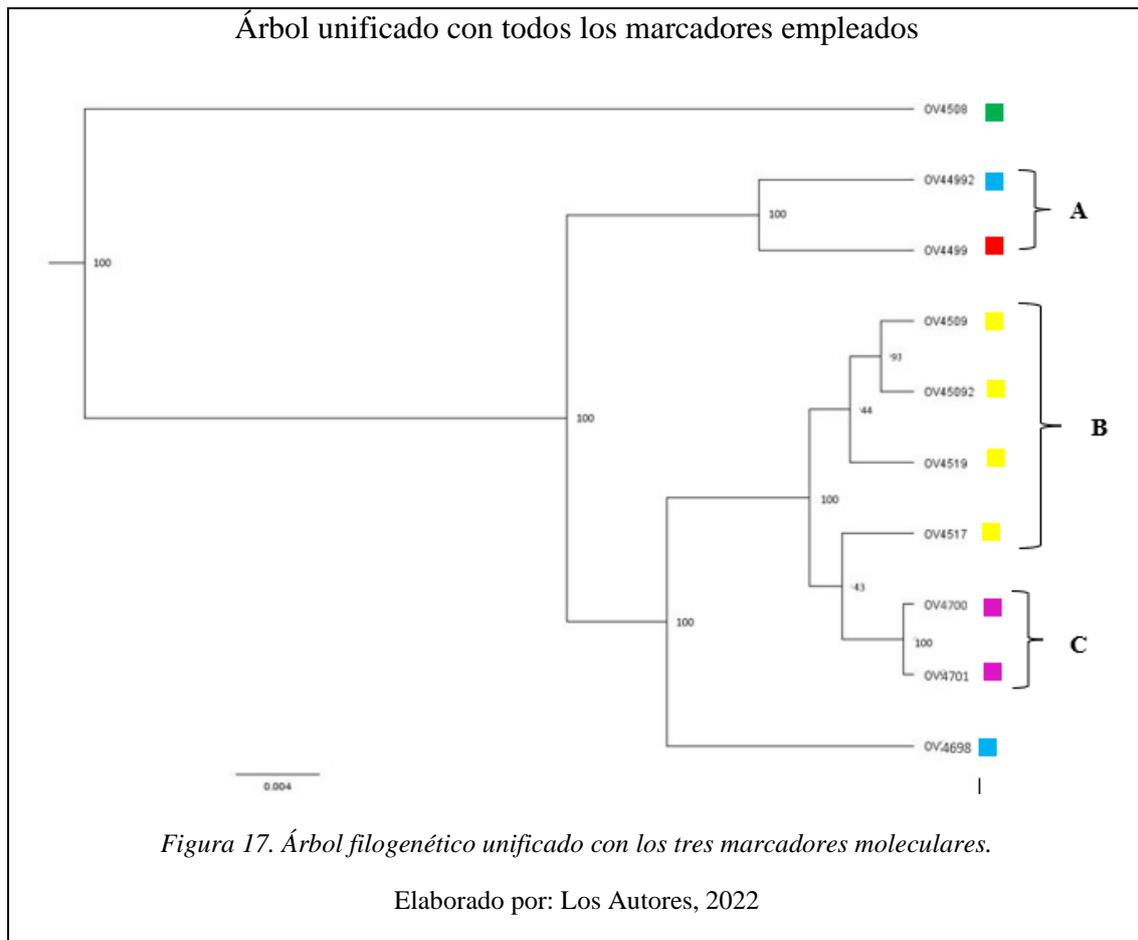
Al igual que con los anteriores árboles filogenéticos, se puede evidenciar un gran grupo conformado por C y B. Además, con este marcador molecular se corrobora que los miembros 4491 y 4504, no son *E. nocturnum* debido a la lejanía que presentan con referencia al grupo identificado propiamente como *Epidendrum*.

Así mismo, se puede afirmar que los individuos 4499 y 4508 no pertenecen a nuestro grupo de interés, según la referencia filogenética que nos deja la Figura 16. pueden tratarse de otra especie.

Adicionalmente, no se evidenció ninguna politomía dentro del árbol consenso para este marcador molecular.



#### 5.2.4.4 Filogenia unificada de *matK*, *rpoC1* y *ycf1*



Al realizar un análisis conjunto y tomando en cuenta la Figura 17, se puede afirmar que se ha generado un gran grupo conformado por el clado B, compuesto por 4509, 1, 4509-2, 4517 y 4519, además del clado B formado por los individuos (4) 4700, (3) 4699 y (5) 4701, se tiene la certeza de que todo este gran grupo se trata de *E. nocturnum*.

Los individuos (2) 4698 y 4499-2, al tener cierta cercanía con el gran grupo de interés antes mencionado, puede tratarse una subespecie de *Epidendrum nocturnum*.

En los 3 árboles filogenéticos obtenidos, 4508 queda totalmente alejado del grupo de interés, al analizar con el software BLAST la secuencia de esta muestra, se obtuvo una similitud del 99,44% con *Maxilaria exaltata*, DQ210819.1; así mismo, la especie 4491 obtuvo una similitud del 97% con *Epidendrum campestre*, AF263781.1; el mismo caso

ocurre con 4499, este posee una similitud de 99.58% con *Anahceilium hartwegii*, MW498972.1, con esta información se puede aseverar que estos 3 individuos no pertenecen al grupo de estudio, ya que son distantes al grupo de *E. nocturnum*.

De los 3 marcadores moleculares cloroplásticos empleados, *matK* es el más eficiente debido a que el soporte estadístico que arroja es mucho más fuerte que el de los otros 2 marcadores, haciendo que el análisis sea más robusto. Así, con el árbol filogenético unificado, ver Figura 17, se confirma la información arrojada por el árbol filogenético de *matK*, ver Figura 14.

### 5.3 Georreferenciación

Se georreferenciaron 15 puntos en donde se colectaron las distintas muestras, como se puede verificar en la Tabla 2, además se insertaron 3 georreferencias obtenidas de Trópicos, (2022), lo que permitió generar zonas de distribución adicionales de *E. nocturnum* en el país como se puede evidenciar en la Figura 18.

Se puede visualizar que la distribución de nuestra especie de estudio, se encuentra en los flancos de la cordillera occidental y oriental, con alturas ente los 240 y 2100 m.s.n.m., sin embargo, Trópicos (2022); indica que *Epidendrum nocturnum* se puede encontrar también en alturas de 100 m.s.n.m.; la muestra que se encuentra en Sucumbíos, si bien es parte de la Amazonía, se encuentra alejada de las muestras recolectadas en este estudio.

Así mismo, se ha podido generar un polígono, ver Figura 18, en el que se evidencia la posible zona de distribución de esta especie, así se puede identificar en Esmeraldas, Imbabura, Carchi, Pichincha, parte de Sto. Domingo, Sucumbíos, Morona Santiago y Pastaza.

## Distribución de muestras de *E. nocturnum* en el Ecuador

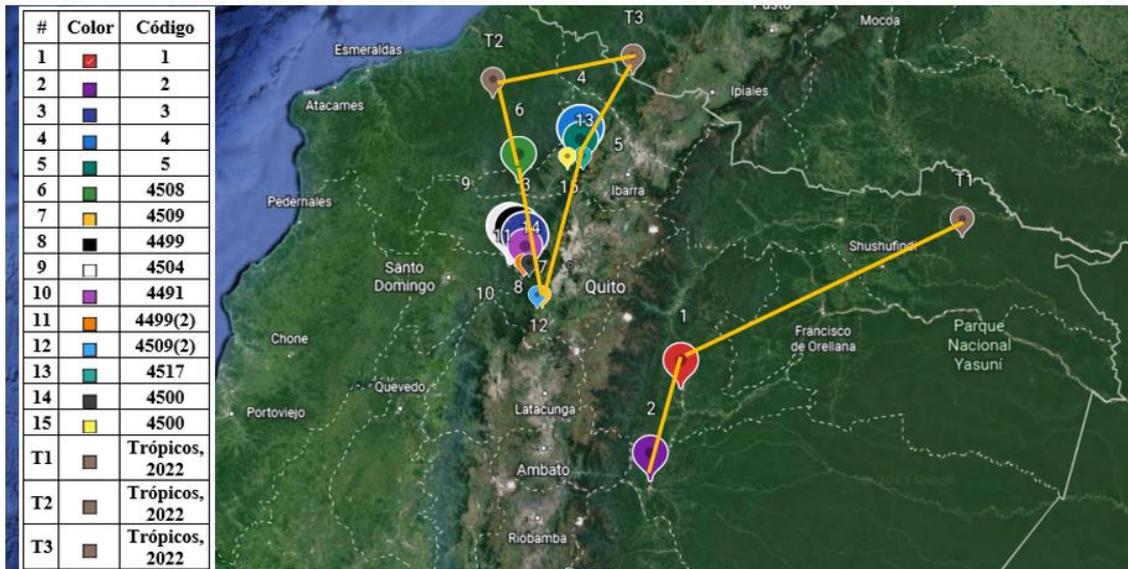


Figura 18. Distribución de *E. nocturnum* en el Ecuador

Elaborado por: Los Autores, 2022

Como se puede observar en la Figura 19, *E. nocturnum* puede encontrarse no solo en Ecuador sino también en: México, centro América, Venezuela, Colombia, Brasil y Bolivia.

Perdomo et al. (2020), dice que las especies del género *Epidendrum* pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta los 4200 m de altura, en matorrales, dunas, páramos andinos y bosques tropicales. Así se puede decir que existe un fenómeno de especiación debido a que muchos animales pudieron haber transportado de manera involuntaria semillas de esta especie consigo y luego fueron regadas en otros sitios, en donde, con el pasar del tiempo, fueron obteniendo cambios a nivel genético lo que implicó cambios a nivel fenotípico también, lo que les proporcionó la capacidad para adaptarse a este nuevo sitio, por esto se pueden encontrar *E. nocturnum* en diferentes partes de América.

## Distribución de la especie *Epidendrum nocturnum* en América



Figura 19. Distribución de *E. nocturnum* en América

Elaborado por: Los Autores, 2022

## 6 Conclusiones

- Gracias a sus rasgos morfológicos, se pudo colectar 15 muestras frescas de hojas de orquídeas pertenecientes al grupo de *Epidendrum nocturnum* en 5 provincias del Ecuador tales como: Santo Domingo, Imbabura, Pichincha, Napo y Pastaza, Esmeraldas y Sucumbíos con lo que se dispuso de suficiente material vegetal para realizar el análisis molecular.
- Con el empleo de los marcadores moleculares cloroplásticos *matK*, *ycf1* y *rpoC1*, se determinó que 8 de las muestras analizadas pertenecen al grupo *Nocturnum*, 4 de estas pueden tratarse de una subespecie del grupo de estudio y finalmente 3 de las muestras morfológicamente presentaban una similitud con el grupo de estudio, sin embargo, genéticamente no pertenecían a este. El marcador molecular más eficiente fue *matK* debido a contiene un soporte estadístico más fuerte en comparación a los otros.
- Mediante georreferenciación se verificó la distribución de *Epidendrum nocturnum* en el Ecuador, encontrado está especie en las provincias de: Pichincha, Imbabura, Santo Domingo de los Tsáchilas, Napo y Pastaza, con una altitud que va entre los 240 hasta los 2100 m.s.n.m.

## 7 Recomendaciones

- Se recomienda coleccionar y analizar muestras vegetales de *E. nocturnum* en la parte sur oriente y occidente de Ecuador con la finalidad de recabar más de información de este grupo de orquídeas.
- Para *Epidendrum nocturnum*, se recomienda que, para la extracción de ADN, se emplee material vegetal fresco sin evidencia de fenolización para facilitar la ruptura celular, asimismo, a partir del método de extracción de Doyle y Doyle 1987, aconseja dejar en congelación el material en isopropanol solamente por 24 horas, para obtener mejores resultados en cuanto a calidad del ADN.
- Se sugiere que, al momento de realizar la PCR, los reactivos se encuentren descongelados a temperatura ambiente, así mismo se debe colarlos en el vortex por 30 segundos antes de ser empleados.
- Se recomienda tomar en cuenta los rangos altitudinales para establecer las áreas de distribución de las especies a fin de lograr una mejor colecta de muestras vegetales.

## 8 Referencias

- Aguilar, S. (2003). *Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas*.  
<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/87defd63-22b9-40c1-944f-f6ce18c2cfa0/content>
- Albán, J., & Toapanta, C. (2019). *Identificación molecular del género *Caucaea* (Orchidaceae) mediante el sistema BARCODE y análisis químico de los aromas florales* [UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA].  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16979/1/UPS-QT13816.pdf>
- Altamirano, M., & Yáñez, P. (2016). El código de barras de ADN (barcoding): Una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en el Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 23(1), 5–13.  
<https://doi.org/10.17163/lgr.n23.2016.01>
- Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242.  
[http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v17n02\\_221.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221.pdf)
- Barragán, M. E. (2019). *Análisis de la biodiversidad en Ecuador*.  
<https://www.udla.edu.ec/2019/11/analisis-de-la-biodiversidad-en-ecuador/>
- Benitez, O. (2004). *Contribución al estudio de la filogenia molecular de los peces de la familia Gerreidae en México* [INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL].  
<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/14374/1/benitesc1.pdf>
- Carrión, M. del C. (2009). *Identificación de Orquídeas Epífitas del Ecuador mediante DNA Barcoding* [UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA].  
[https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificación de Orquídeas Epífitas del Ecuador mediante DNA.pdf](https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1851/3/Identificación%20de%20Orquídeas%20Epífitas%20del%20Ecuador%20mediante%20DNA.pdf)
- Chacón, M., Contreras, O., & Cáceres, H. (2018). *Contribución a la conservación de Orchidiaceas de Santander mediante cultivo in vitro de semillas* [Universidad de Santander]. <https://repositorio.udes.edu.co/entities/publication/b52552c2-6822-437f-aff2-54bce1990d92>
- Chase, M. W., Christenhusz, M. J. M., Fay, M. F., Byng, J. W., Judd, W. S., Soltis, D. E., Mabberley, D. J., Sennikov, A. N., Soltis, P. S., Stevens, P. F., Briggs, B., Brockington, S., Chautems, A., Clark, J. C., Conran, J., Haston, E., Möller, M., Moore, M., Olmstead, R., ... Weber, A. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.  
<https://doi.org/10.1111/BOJ.12385>
- Cordeiro, J., Hágsater, E., Chase, M., Costa, L., Mendoca, E., Souza, G., Nollet, F., &

- Leonardo, F. (2022). Chromosome number, heterochromatin, and genome size support recent polyploid origin of the *Epidendrum nocturnum* group and reveal a new species (Laeliinae, Orchidaceae). *Botany*, 100(5), 409–421.  
<https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0113>
- Cruz, M., Barrientos, A., Rodríguez, J., & Reyes, J. (2011). Análisis filogenético de los subgéneros *Persea* y *Eridaphne* (*Persea*; Lauraceae) mediante secuencias de ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto. *Proceedings VII World Avocado Congress 2011*. [http://www.avocadosource.com/wac7/Section\\_13/CruzMayaME2011.pdf](http://www.avocadosource.com/wac7/Section_13/CruzMayaME2011.pdf)
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., Cheng, T., Guo, J., & Zhou, S. (2015). *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports*, 5, 8348. <https://doi.org/10.1038/SREP08348>
- Downie, S., Katz, D., & Cho, K. (1996). Phylogenetic Analysis of Apiaceae Subfamily Apioideae Using Nucleotide Sequences from the Chloroplast *rbcL* Intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6(1), 1–18.  
<https://doi.org/10.1006/MPEV.1996.0053>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue* (1st ed., Vol. 19).  
[https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Dressler, R. L. (1982). *The Orchids: Natural History and Classification*.  
[https://www.academia.edu/31105535/The\\_Orchids\\_Natural\\_History\\_and\\_Classification](https://www.academia.edu/31105535/The_Orchids_Natural_History_and_Classification)
- Duarte, I. (2014). *Germinación in vitro de <i>Barkeria uniflora</i> Lex. Dressler & Halbinger, una orquídea endémica de México*. [UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO]. [https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis\\_duarte\\_salinas.pdf](https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_duarte_salinas.pdf)
- Endara, A., & Ocaña, M. (2022). Análisis molecular de las especies del Ecuador del género *Restrepia* (Orchidaceae) y análisis filogenético de secuencias obtenidas en *GenBank*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/23077/1/TTQ837.pdf>
- Espinosa, L., & Chávez, E. (2019). El otro genoma de las plantas: los cloroplastos y su ADN. *CONACYT*, 201–206.  
[https://www.researchgate.net/publication/343141166\\_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)
- Hágsater, E. (1984). *Towards an undertaning of the Genus Epidendrum* (pp. 195–201).  
[https://www.researchgate.net/profile/Eric-Hagsater-2/publication/338489039\\_Towards\\_an\\_undertaning\\_of\\_the\\_Genus\\_Epidendrum/links/5e175d42a6fdcc283763a2cf/Towards-an-undertaning-of-the-Genus-Epidendrum.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Eric-Hagsater-2/publication/338489039_Towards_an_undertaning_of_the_Genus_Epidendrum/links/5e175d42a6fdcc283763a2cf/Towards-an-undertaning-of-the-Genus-Epidendrum.pdf)

- Heubl, G. (2010). New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Medica*, 76(17), 1963–1974. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1250519>
- Hilu, K., & 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>
- Iza, M. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula, mediante el sistema BARCODE* [UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15043/1/UPS-QT10784.pdf>
- Jacinto, S. (2019). *Diversidad de la familia Orchidaceae e la zona de amortiguamiento-Reserva Comunal Chayu Nain, Arango-Amazonas* [UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA]. [https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/3559/T016\\_43780621\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/3559/T016_43780621_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- 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., & Villanueva, D. (2021). *Evaluación de marcadores moleculares de cloroplastos y nucleares, para su uso en identificación molecular de germoplasmas de orquídeas*. [https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/30002/PabloAndrés\\_LondoñoOpera\\_2021.pdf?sequence=7&isAllowed=y](https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/30002/PabloAndrés_LondoñoOpera_2021.pdf?sequence=7&isAllowed=y)
- Méndez, J., & González, A. (1997). *Los genomas eucariotas: aspectos generales* (pp. 13–31). [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9859/CC\\_30\\_art\\_1.pdf](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9859/CC_30_art_1.pdf)
- Millner, H., & Baldwin, T. (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>
- Ministerio de Turismo del Ecuador. (2013). *Ecuador, el primer “País de las Orquídeas” del mundo – Ministerio de Turismo*. <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-el-primer-pais-de-las-orquideas-del-mundo/>
- Miño, J. (2018). *Identificación molecular del género Passiflora (Passifloraceae), de la región norte del Ecuador por medio del método DNA BARCODING* [UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16148/1/UPS-QT13326.pdf>
- Mogrovejo, A., & 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* [UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA].  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16978/1/UPS-QT13818.pdf>
- Mosquera, H. (2012). *Análisis palinológico y anatómico del pistilo en la familia Orchidaceae* [Universidad de León]. <https://doi.org/10.18002/10612/2220>
- Neubig, K., Mark, W., Carlsward, B., Blanco, M., & Endara, L. (2008). *Phylogenetic utility of ycf1 in orchids: a plastid gene more variable than matK Recommended Citation*. <https://core.ac.uk/download/pdf/154515896.pdf>
- Novoa, P., Espejo, J., Alarcón, D., Cisternas, M., & Domínguez, E. (2015). Guía de campo de las orquídeas chilenas. *CORMA*, 239.  
[https://www.researchgate.net/publication/284180342\\_Guia\\_de\\_Campo\\_de\\_las\\_Orquideas\\_Chilenas\\_Segunda\\_Edicion\\_Ampliada\\_Chilean\\_Orchids\\_Field\\_Guide\\_Second\\_Edition](https://www.researchgate.net/publication/284180342_Guia_de_Campo_de_las_Orquideas_Chilenas_Segunda_Edicion_Ampliada_Chilean_Orchids_Field_Guide_Second_Edition)
- OTCA. (2021, December 19). *Manual para Identificación de Orquídeas apoyará a autoridades ecuatorianas en el control de las actividades ilícitas en contra la flora silvestre - OTCA*. <http://otca.org/manual-para-identificacion-de-orquideas-apoyara-a-autoridades-ecuatorianas-en-el-control-de-las-actividades-ilicitas-en-contra-la-flora-silvestre/>
- Pacheco, F., Wei, L., & Perez, M. (2021). Análisis filogenético de especies de *Quercus L.* utilizando tres códigos de barras de ADN. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(2), 1–17. <https://doi.org/10.19136/era.a8n2.2831>
- Palacios, H. (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&i>
- Parveen, I., Singh, H. K., Malik, S., Raghuvanshi, S., & Babbar, S. B. (2017). Evaluating five different loci (rbcL, rpoB, rpoC1, matK, and ITS) for DNA barcoding of Indian orchids. *Genome*, 60(8), 665–671.  
<https://doi.org/10.1139/GEN-2016-0215>
- Pavone, P. (2022). *Orchidaceae*. Monaco Natura Encyclopedia.  
<https://www.monaconatureencyclopedia.com/orchidaceae/?lang=es>
- Perdomo, O., Coca, L. F., Trujillo Trujillo, E., Perdomo, O., Coca, L. F., & Trujillo Trujillo, E. (2020). Nuevos registros de Epidendrum (Orchidaceae) para Colombia:

- Epidendrum porphyreonocturnum Hágsater & R. Jiménez y Epidendrum whittenii Hágsater & Dodson. *Revista Peruana de Biología*, 27(3), 411–416. <https://doi.org/10.15381/RPB.V27I3.17901>
- 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 Amazonia ecuatoriana*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO.
- Rivero, A., & Chirino, E. (2015). Evaluación del estado actual de la familia Orchidaceae en el mogote Jesús González, localidad Canalete, valle San Andrés. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 3(2), 206–219. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5223142>
- Rocha, O., & Duque, J. (2017). Unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre con enfoque en orquídeas (Orchidaceae). *Agroproductividad*, 10, 1–4. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/1040/889>
- Sánchez, A., & Rodríguez, K. (2018). Las orquídeas y su importancia en el desarrollo turístico de la provincia de Manabí, Ecuador. *ECOVIDA*, 8(1). <https://revistaecovida.upr.edu.cu/index.php/ecovida/rt/prinFRIENDLY/127/html>
- Sánchez, V. (2020). *Estudio fitoquímico e identificación molecular de las especies del género Bomarea del norte de los Andes del Ecuador, mediante el sistema BARCODE*. [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18442/1/UPS-QT14379.pdf>
- Singer, R. (2009). Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 337–348. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-548X2009000400021](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2009000400021)
- Soares, I., & Silva, M. (2020). *Epidendrum L. (Orchidaceae, Epidendroideae) no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Estado de Goiás, Brasil VL* (Vol. 47). [https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Epidendrum-nocturnum-Jacq-a-Habito-b-Flor-c-Pecas-florais-d-Detalhe-do\\_fig4\\_345745155](https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Epidendrum-nocturnum-Jacq-a-Habito-b-Flor-c-Pecas-florais-d-Detalhe-do_fig4_345745155)
- Soto, M., Solano, R., Salazar, G., Jiménez, R., Hágsater, E., Sosa, V., Cervantes, L., García, J., & Sánchez, L. (2003). *Icones Orchidacearum*. [https://www.researchgate.net/profile/Eric-Hagsater-2/publication/336778571\\_Icones\\_Orchidacearum\\_Fascicle\\_5\\_6\\_Orchids\\_of\\_Mexico\\_Parts\\_2-3/links/5db21c49a6fdccc99d942269/Icones-Orchidacearum-Fascicle-5-6-Orchids-of-Mexico-Parts-2-3.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Eric-Hagsater-2/publication/336778571_Icones_Orchidacearum_Fascicle_5_6_Orchids_of_Mexico_Parts_2-3/links/5db21c49a6fdccc99d942269/Icones-Orchidacearum-Fascicle-5-6-Orchids-of-Mexico-Parts-2-3.pdf)
- The Plant List. (2013). *The Plant List*. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=epidendrum+nocturnum>

- Tobar, F., arzón, C., Yáñez, M., Mena, J., & González, D. (2018). *Orquídeas y Bromelias de la provincia de El Oro* (9th ed.).  
[http://inabio.biodiversidad.gob.ec/wp-content/uploads/2019/02/Orquideas\\_y\\_bromelias\\_de\\_el\\_Oro.pdf](http://inabio.biodiversidad.gob.ec/wp-content/uploads/2019/02/Orquideas_y_bromelias_de_el_Oro.pdf)
- Trang, T., Le, T., Nguyen, T., Tran, D., & Tran, H. (2017). Review on molecular markers for identification of Orchids. *Vietnam Journal of Science*, 59(2), 62–75.  
<https://vietnamsience.vjst.vn/index.php/VJSTE/article/view/45/47>
- Trópicos. (2022, November 15). *Orchidaceae*.  
<https://www.tropicos.org/name/42000388>
- Zambrano, B., & Solano, R. (2011). Un nuevo híbrido natural de *Dracula* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) del suroccidente de Ecuador. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(3).  
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-34532011000300003](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532011000300003)