



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Identificación molecular de especies del género *Restrepia* (*Orchidaceae*), colectadas en Centro y Sudamérica, mediante el sistema DNA BARCODE

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

Ingeniería en Biotecnología

AUTORES: Michelle Estefanía Ruiz Velástegui

Fausto Enrique Torres Vásquez

TUTORA: Andrea Denisse Benítez Quintana

Quito - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Michelle Estefanía Ruiz Velástegui con documento de identificación N° 1715437040 y Fausto Enrique Torres Vásquez con documento de identificación N° 1726342908; 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, 27 de febrero del año 2023.

Atentamente,



Michelle Estefanía Ruiz Velástegui

1715437040



Fausto Enrique Torres Vásquez

1726342908

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

Nosotros, Michelle Estefanía Ruiz Velástegui con documento de identificación N° 1715437040 y Fausto Enrique Torres Vásconez con documento de identificación N° 1726342908, 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 molecular de especies del género *Restrepia* (*Orchidaceae*), colectadas en Centro y Sudamérica, mediante el sistema 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, 27 de febrero del año 2023.

Atentamente,



Michelle Estefanía Ruiz Velástegui

1715437040



Fausto Enrique Torres Vásconez

1726342908

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Andrea Denisse Benítez Quintana con documento de identificación N° 1709194938, docente de la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Identificación molecular de especies del género *Restrepia* (*Orchidaceae*), colectadas en Centro y Sudamérica, mediante el sistema DNA BARCODE”, realizado por Michelle Estefania Ruiz Velástegui con documento de identificación N° 1715437040 y por Fausto Enrique Torres Vásquez con documento de identificación N° 1726342908, 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, 27 de febrero del año 2023.

Atentamente,



Andrea Denisse Benítez Quintana

1709194938

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis abuelitos Rosa y Sergio quienes han constituido un pilar muy importante en mi vida y han estado a mi lado constantemente.

A mi abuelita Elvita por haber sido y continuar siendo mi ángel de la guarda.

A mis padres por su inmenso amor, paciencia y apoyo.

A mi hermana Daniela por cuidarme y ser mi amiga incondicional.

A mi perrita Lily por su compañía incondicional en cada día de trabajo y estudio, por recibirme con todo su amor y alegrarme los días con su pequeña colita.

A todos ellos les dedico todo mi esfuerzo y dedicación durante todos estos años.

Michelle Ruiz V.

Dedico mi tesis a mis padres por brindarme todo el apoyo del mundo para que pueda estudiar la carrera que me gusta.

A mis mejores amigos por sacarme una sonrisa cada que me encontraba mal.

Fausto Torres V.

Agradecimiento

Agradezco a Dios por permitirme tener una profesión que me apasiona y que constituirá una herramienta para un mejor futuro de la humanidad.

A la Universidad Politécnica Salesiana por abrirme sus puertas y enseñarme que se puede educar y formar profesionales con amor.

A los profesores que a lo largo de mi carrera me transmitieron su conocimiento y experiencia, sobre todo a la Ingeniera Elizabeth Yugsi quien fue parte fundamental durante la etapa experimental de esta investigación y a nuestra tutora la M. Sc. Denisse Benítez por dedicar mucho de su tiempo en la elaboración de este trabajo.

A mi compañero de tesis, Fausto Torres, por su increíble paciencia, apoyo y comprensión para sacar adelante este proyecto.

A mis amigos Sebastián Ocaña y Sabrina Valencia por su amistad y toda su disposición para ayudar y compartir su conocimiento.

A Diego por su inmenso amor, interminable paciencia y presencia incondicional en cada momento.

Michelle Ruiz V.

Agradezco a mis mejores amigas Amanda Endara y Evelyn Pilatuña, por ser mis únicas amigas en la universidad y quienes me han brindado todo su apoyo a la hora de realizar mi tesis.

A mi mejor amigo Jonathan Naula, por estar ahí siempre conmigo desde el colegio y escucharme en los momentos difíciles.

A Jatari por su apoyo, comprensión y su gran amor que me lo demuestra siempre.

A mi tutora de tesis por guiarnos y darnos su apoyo en la elaboración de este trabajo de titulación.

Fausto Torres V.

Resumen

El género *Restrepia*, se distingue de otros géneros de familia *Orchidaceae* por la atenuación del sépalo dorsal y la disposición de osmóforos, en su estructura. Se reconocen 61 especies de *Restrepia*, distribuidas en todo Centro y Sur América, que va desde Guatemala hasta Bolivia pasando por países como Venezuela, Colombia, Perú, y Ecuador.

La identificación de las especies de este género es muy complicada ya que presentan características morfológicas muy similares, y no se cuenta con una clasificación completa de todas las especies descritas hasta el momento.

En este trabajo se analizaron muestras vegetales del género *Restrepia*, colectadas previamente en zonas de Centro y Sur América. Se extrajo el ADN mediante el método Doyle & Doyle modificado y se obtuvieron los amplicones de las regiones *rpoC1* y *matK* mediante PCR convencional. Se empleó la metodología de Sanger para obtener las secuencias y se realizaron análisis filogenéticos con los métodos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, con los modelos evolutivos Jukes Cantor (JC) para *rpoC1* y Tamura-3-parameter (T92) para *matK*.

Además, se realizó una georreferenciación a las muestras de los países de Centro y Sur América demostrando una presencia significativa de especies del género *Restrepia* a lo largo de la región en especial en Colombia.

Después de la investigación realizada se determinó que el marcador *matK* no es adecuado para la identificación de especies del género *Restrepia*; debido a que es una región muy conservada, mientras que *rpoC1* no es lo suficientemente discriminativo, por lo cual no se pudo obtener suficiente información para realizar una identificación adecuada de especies de este género.

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

Abstract

The genus *Restrepia* is distinguished from other genera of the *Orchidaceae* family by the attenuation of the dorsal sepal and the arrangement of osmophores in its structure. There are 61 species of *Restrepia*, distributed throughout Central and South America, from Guatemala to Bolivia through countries such as Venezuela, Colombia, Peru, and Ecuador.

The identification of the species of this genus is very complicated because they have very similar morphological characteristics, and there is no complete classification of all the species described so far.

In this work, plant samples of the genus *Restrepia* collected previously on different locations in Central and South America, were processed by first obtaining their DNA using the modified Doyle & Doyle method. Afterwards they were amplified with the molecular markers *rpoC1* and *matK* by conventional PCR with the Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix kit, and phylogenetic trees were elaborated with the resulting sequences using the Bayesian Inference and Maximum Likelihood methods, with the evolutionary models (JC) and (T92) respectively.

In addition, a georeferencing of the samples from the countries of Central and South America was carried out, demonstrating a significant presence of species of the genus *Restrepia* throughout the region, especially in Colombia.

After the investigation carried out, it was determined that the *matK* marker is not suitable for the identification of species of the genus *Restrepia* because it is a highly conserved region, while *rpoC1* is not discriminative enough, for which reason it was not possible to obtain enough information to make an adequate identification of species of this genus.

Key words: *Restrepia*, *Orchidaceae*, *matK*, *rpoC1*, sequencing, phylogeny.

Índice

1	INTRODUCCION	1
2	FUNDAMENTACION TEORICA	4
2.1	Familia <i>Orchidaceae</i>	4
2.1.1	Morfología.....	4
2.1.2	Taxonomía.....	5
2.1.3	Importancia.....	5
2.2	Género <i>Restrepia</i>	6
2.2.1	Morfología del género <i>Restrepia</i>	6
2.2.2	Especies del género <i>Restrepia</i> colectadas fuera del Ecuador.....	8
2.3	ADN Barcode	9
2.4	Técnicas Moleculares	10
2.4.1	Extracción de ADN	10
2.4.2	PCR	11
2.4.3	Secuenciación.....	12
2.5	Marcadores moleculares en orquídeas.....	13
2.5.1	Gen <i>matk</i>	13
2.5.2	Gen <i>rpoCl</i>	13
2.6	Filogenia	14
3	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1	Recolección de muestras	16
3.2	Georreferenciación	16
3.3	Estudio Molecular.....	17
3.3.1	Extracción de ADN	17
3.3.2	Electroforesis.....	18
3.3.3	Amplificación de ADN	19
3.4	Filogenia	22
4	RESULTADOS Y DISCUSION	24
4.1	Colección de Muestras.....	24
4.2	Georreferenciación	28
4.3	Estudio Molecular.....	30
4.3.1	Extracción de ADN	30
4.3.2	Amplificación de ADN	32
4.3.3	Filogenia.....	35
5	CONCLUSIONES	46

6	RECOMENDACIONES	47
7	BIBLIOGRAFIA	48
8	ANEXOS	54

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología del género <i>Restrepia</i>	7
Figura 2. Estructura de la región <i>matK</i> (maturase K).....	13
Figura 3. Organización estructural del gen <i>rpoC1</i> del cloroplasto y regiones flanqueantes	14
Figura 4. Marcador de peso molecular (100 - 5000 pb) que incluye la concentración aproximada en ng/0.5 µg.....	19
Figura 5. Distribución geográfica de las especies del género <i>Restrepia</i> en Centro y Sur América	29
Figura 6. ADN extraído por el método Doyle & Doyle modificado.....	31
Figura 7. ADN extraído por el método Doyle & Doyle modificado.....	31
Figura 8. ADN extraído por el método Doyle & Doyle modificado.....	31
Figura 9. Productos de PCR con el marcador <i>matK</i>	33
Figura 10. Productos de PCR con el marcador <i>matK</i>	33
Figura 11. Productos de PCR con el marcador <i>rpoC1</i>	34
Figura 12. Productos de PCR con el marcador <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> con el método de Máxima verosimilitud.....	38
Figura 15. Árbol consenso del género <i>Restrepia</i> usando la región <i>matK</i> con el método de Inferencia Bayesiana	40
Figura 16. Árbol consenso del género <i>Restrepia</i> usando la región <i>rpoC1</i> con el método de Inferencia Bayesiana	41
Figura 17. Modelo evolutivo proporcionado por el programa MEGA.....	42
Figura 18. Árbol consenso del género <i>Restrepia</i> usando la región <i>rpoC1</i> con el método de Máxima verosimilitud.....	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de la familia <i>Orchidaceae</i>	5
Tabla 2. Componentes de la reacción PCR con Phire Plant Direct PCR para las regiones <i>rpoC1</i> y <i>matK</i>	20
Tabla 3. Condiciones de la PCR para <i>matK</i>	21
Tabla 4. Condiciones de la PCR para <i>rpoC1</i>	21
Tabla 5. Listado de plantas del género <i>Restrepia</i> colectadas para el estudio	24

Índice de anexos

Anexo 1. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación del ADN.....	54
Anexo 2. Secuencias del Genbank del género <i>Restrepia</i> y el outgroup de la región <i>matK</i> y <i>rpoC1</i>	55
Anexo 3. Problemas de secuenciación de ADN en algunas de las muestras	55
Anexo 4. Ubicación geográfica de las especies del género <i>Restrepia</i>	56
Anexo 5. Blastn de <i>Restrepia sp.</i>	58

1 INTRODUCCIÓN

Una de las familias con la mayor diversidad entre las Magnoliophyta, que comúnmente son llamadas plantas florales, son las *Orchidaceae* con más de 30 mil especies, siendo una de las familias botánicas mejor representadas en las zonas tropicales, que destacan por su belleza con flores vistosas y su capacidad de adaptación ya que se pueden encontrar en casi cualquier otra parte del mundo (Endañú et al., 2017). El género más grande dentro de esta familia es *Restrepia* cuyas especies son en su mayoría autóctonas de América Central y del Sur, especialmente en países como Ecuador, Perú y Bolivia en sus bosques montanos (Millner & Baldwin, 2016).

Restrepia tiene su centro de distribución en los Andes Altos de Ecuador y Colombia, donde crece como epífita, y además se distribuyen desde Venezuela hasta Perú, con tres especies (*R. muscifera*, *R. trichoglossa* y *R. aberrans*) autóctonas de Centroamérica y una especie, *R. vasquezii*, originaria de Bolivia (Millner et al., 2015).

El Ecuador es reconocido a escala mundial por su riqueza flora, fauna y otros recursos, y a pesar de ser megadiverso es uno de los países que pierde la variedad genética de sus especies debido a la pérdida de hábitats, lo que ha amenazado de manera significativa a la conservación de las orquídeas (Mongrovejo & Proaño, 2020). Cabe destacar que en América se encuentran alrededor de 9000 especies de orquídeas, y casi el 33% de ellas se encuentran en peligro de extinción por la deforestación de los bosques (Tejeda et al., 2017).

Las orquídeas, que vienen a formar parte de las Angiospermas se encuentran bajo la división Magnoliophyta, las cuales, se destacan porque contribuyen a los ecosistemas en los que habitan actuando directamente a su regulación hídrica, como refugio y alimento para otros organismos, además de su gran importancia por su sistema de polinización (Bautista, 2011), es por ello, que es importante su registro y preservación para conservar la información genética de cada especie.

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 insuficiente (León et al., 2011 Endara & Ocaña, 2022).

A pesar de la importancia de conservación de este género solo una pequeña parte de estas especies ha sido registrada en el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) y el 85% de estas están amenazadas (Millner et al., 2020).

Las orquídeas del género *Restrepia* presentan características morfológicas muy similares, por lo cual es difícil identificarlas a nivel de especie y asociarlas correctamente con el país de origen al que pertenecen. Se ha usado la identificación tradicional que se basa en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos, los usos de estos marcadores morfológicos tienen muchas limitantes ya que su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos y solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando llega a su estado adulto (Delgado, 2006). Por otro lado, los marcadores moleculares superan en gran mayoría las limitaciones que presenta la identificación tradicional, los marcadores moleculares presentan mayor segregación o polimorfismos, pueden ser utilizados cuando la planta está en sus primeros años de desarrollo, permiten la identificación correcta de las especies y están libres de los efectos epistáticos (Phillips et al., 1995). Los marcadores moleculares de DNA se basan en el análisis de secuencias cortas y la identificación de diferencias que posee entre individuos, pueden ser de carácter dominante o codominante (Delgado, 2006).

Existen varios estudios sobre la diversidad genética de orquídeas, pero no en lo que respecta al género *Restrepia*. En trabajos anteriores se han realizado análisis filogenéticos de 22 especies de orquídeas, empleando el método DNA BARCODE y el uso del segmento cloroplástico *matK*, el cual presenta una considerable variabilidad, y permitió diferenciar especies de

orquídeas con mayor precisión (Albán & Toapanta, 2019). Además, muchas de las investigaciones mencionan que usar en conjunto el marcador *rpoC1* con el marcador *matK* provee mejor resolución para establecer relaciones filogenéticas dentro de las familias de plantas (Vindas et al., 2011).

Al presentar una distribución geográfica muy amplia en ciertos países, estas orquídeas son muy fácilmente confundidas entre sí la comercialización que existe de estas orquídeas hace difícil el poder identificar a donde pertenecen, por lo cual se presentan problemas a la hora de identificarlas y de saber si son extranjeras o nacionales.

El realizar técnicas moleculares de identificación (DNA BARCODE) usando los marcadores *matK* y *rpoC1* ayudará a diferenciar con mayor precisión especies del género *Restrepia*.

Este trabajo se delimitó con distintas especies del género *Restrepia* de Ecuador, Colombia, Costa Rica y otras regiones del América Central y del Sur, las cuales fueron recolectadas en Pichincha de la colección privada de Alberto Guerrero, estas especies fueron analizadas en el laboratorio. La georreferenciación se realizó mediante el programa DIVA GIS v7 para generar una base de datos.

Se obtendrán las secuencias en el laboratorio de los marcadores *matK* y *rpoC1* de estas especies del género *Restrepia* y así poder aportar a la biblioteca de referencias de DNA BARCODE, después para finalizar se va a realizar el análisis filogenético, para establecer su relación evolutiva mediante Máxima Verosimilitud y Inferencia Bayesiana.

El análisis filogenético se realizó de las secuencias obtenidas y de los trabajos anteriores de este género junto con las del GenBank y esto nos ayudara a realizar los árboles filogenéticos para establecer una clasificación más detallada.

2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Familia *Orchidaceae*

La familia *Orchidaceae* es una de las más grandes de angiospermas, incluye cinco subfamilias con aproximadamente 27 000 especies en 750 géneros (Chase et al., 2015; Lu et al., 2019; Swarts & Dixon, 2009).

Las subfamilias están conformadas por: Apostasioideae (2 géneros y 16 especies), Vanilloideae (15 géneros y 180 especies), Cyripedioideae (5 géneros y 130 especies), Epidendroideae (más de 500 géneros y 20 000 especies) y *Orchidoideae* (208 géneros y 3 630 especies) (Lu et al., 2019).

2.1.1 Morfología

Las características distintivas de la familia *Orchidaceae* son sus estambres en el lado abaxial de la flor; gran número de pequeñas semillas por ovario; un labelo o labio opuesto a los estambres fértiles; flores (a menudo invertidas); y polen generalmente contenido en masas (polinia). No obstante, es la fusión del androceo y el gineceo, para formar la columna o gynostemium, la que define a la familia de las orquídeas (a excepción de algunos miembros de Hypoxidaceae y Stylidiaceae) (Roberts & Dixon, 2008).

Las flores son 3-meras, con tres sépalos en su verticilo externo (cáliz) y tres pétalos en el interno (corola). El labelo o pétalo mediano mayor, suele ser colorido u ornamentado. La mayoría de las orquídeas presenta una única antera fértil y raramente dos o tres. El gineceo consiste en tres lóbulos estigmáticos, siendo que parte del lóbulo estigmático mediano se torna no-receptiva (rostelo) (Singer, 2010). Sus inflorescencias suelen agruparse sobre un tallo o raquis, según el cual la flor puede ser basal, axilar o apical. El rizoma (tallo subterráneo o aéreo) genera pseudobulbos (órganos que reservan nutrientes y agua), cuyos juveniles portan las hojas y

yemas auxiliares que originan raíces e incluso flores. Las formas varían entre cilíndricos, fulsiformes, elípticos y ovalados. Por su parte, las hojas poseen nervaduras (reserva de agua y transporte de nutrientes), que corren paralelas entre sí y al eje longitudinal. Mientras que, la raíz presenta un voluptuoso grosor al emerger del rizoma, pseudobulbo o tallo. Las raíces son ramificadas cuando son extensas y suelen estar cubiertas por un tejido poroso (velamen) (Freuler, 2008).

2.1.2 Taxonomía

Se han usado varios métodos de reconstrucción evolutiva, además de información que se ha podido obtener con las relaciones filogenéticas de las especies para poder obtener la clasificación de las *Orchidaceae* (Téllez, 2011).

Tabla 1. Taxonomía de la familia *Orchidaceae*

Reino	Plantae
Phylum	Angiospermas
Clase	Liliopsida
Subclase	Lilidae
Orden	Orchidales
Familia	<i>Orchidaceae</i>

Obtenido de: (Cronquist, 1981)

2.1.3 Importancia

Las orquídeas tienen el valor más alto en la producción hortícola comercial, especialmente en la industria de las flores ornamentales. Sin embargo, en algunos estudios se menciona su amplio espectro de aplicaciones farmacológicas (Musharof Hossain, 2011).

Asimismo, como resultado de sus complejas interacciones ecológicas con polinizadores, hongos micorrícicos y otras plantas y animales, las orquídeas suelen ser los primeros

indicadores biológicos del deterioro de los ecosistemas. En este sentido, debido a la dependencia de las orquídeas de insectos polinizadores y micorrizas es posible que se necesiten muchos años para devolver un nivel de estabilidad ecológica conducente a su persistencia (Roberts & Dixon, 2008).

2.2 Género *Restrepia*

Restrepia es un género de orquídeas que comprende alrededor de 61 especies que pertenecen a los Pleurothallidinae, la mayor sub-tribu de las Orquídeas, presentan una distribución geográfica muy amplia, se encuentran en toda América Central y Sur desde Venezuela pasando por Colombia, Ecuador, Perú hasta Bolivia, creciendo en elevaciones entre 1000 – 3000 msnm, en áreas de bosque húmedo montano, la pérdida de hábitat y la disminución de la población de orquídeas en estas regiones ha sido continua por lo cual es razonable suponer que algunas especies epífitas, incluida *Restrepia*, se encuentran amenazadas significativamente (Millner et al., 2020).

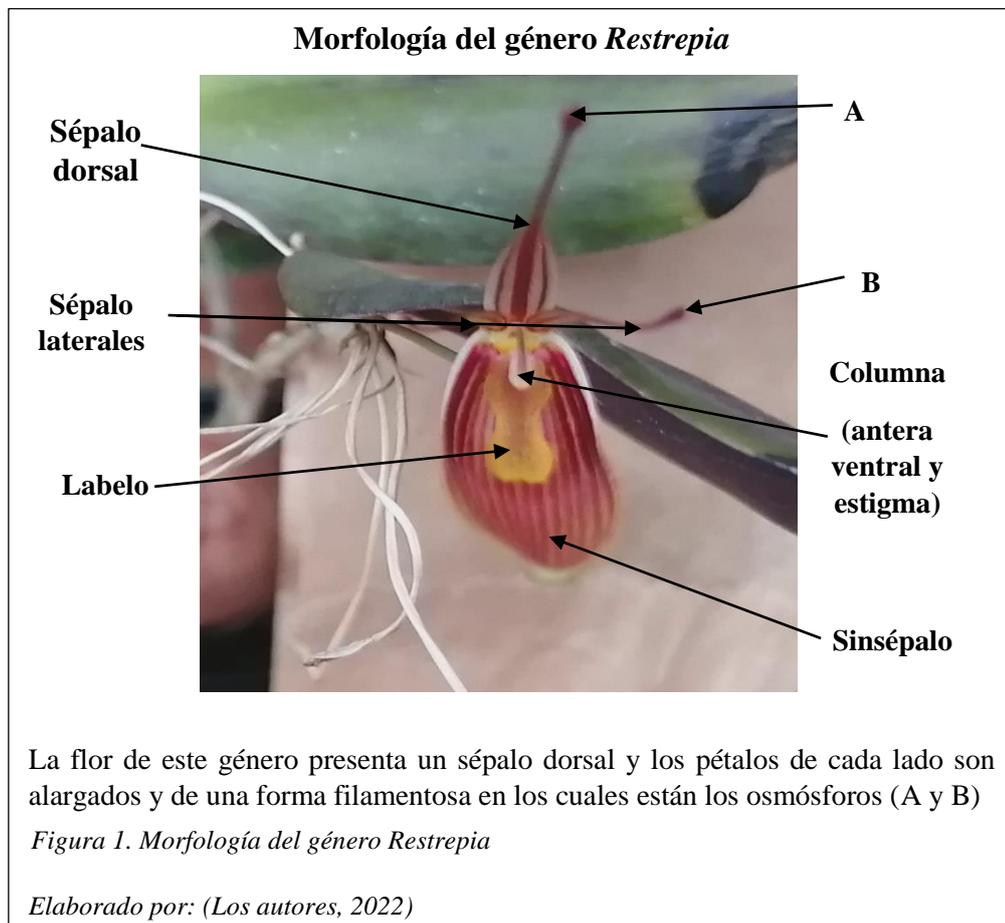
2.2.1 Morfología del género *Restrepia*

El género *Restrepia* fue documentado por primera vez por Humboldt en 1816 y posteriormente descrito con más detalle por Luer en 1996. En el género *Restrepia* se debe saber que todas las especies son muy parecidas a lo que respecta con su estructura floral, uno de los ejemplares más comunes de este género es el *R. brachypus* (Millner & Baldwin, 2016).

La morfología de *Restrepia* se caracteriza vegetativamente por tener un crecimiento simpodial (Pridgeon & Stern, 1983), son epífitas pequeñas, de hasta 15 cm de alto, erectas, glabras (C. A. Luer & Restrepo, 1996), con un tallo tipo ramicaule (Pridgeon & Stern, 1983) de hasta 10 cm de largo, delgados, completamente revestidos de brácteas, apiculadas, dorsalmente carinadas, rayadas, 1-foliados, las hojas son elíptico-ovadas, 6 cm de largo y 2 cm de ancho, 3-denticuladas en el ápice, verdes, teñidas de purpúreo en el envés, coriáceas; pecíolo de 4 mm de largo (C. A.

Luer & Restrepo, 1996), 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).

Las flores son solitarias cuentan con los pétalos y el sépalo dorsal delgado y largo, los sépalos de las partes laterales están fusionados para formar un colorido sinsépalo, que es la parte que más llama la atención de las flores de este género; su labelo es muy distintivo posee un hipochilo cóncavo y un par de apéndices en la parte de la base (Fernandez et al., 2018).



2.2.2 Especies del género *Restrepia* colectadas fuera del Ecuador

<p>4541</p>  <p><i>Restrepia fritillina</i></p>	<p>4542</p>  <p><i>Restrepia sanguinea</i></p>	<p>4543</p>  <p><i>Restrepia elegans</i></p>	<p>4544</p>  <p><i>Restrepia chameleon</i></p>
<p>4545</p>  <p><i>Restrepia nittiorhyncha</i></p>	<p>4546</p>  <p><i>Restrepia escobariana</i></p>	<p>4547</p>  <p><i>Restrepia metae</i></p>	<p>4548</p>  <p><i>Restrepia jesupiana</i></p>
<p>4549</p>  <p><i>Restrepia roseola</i></p>	<p>4550</p>  <p><i>Restrepia pelyx</i></p>	<p>4556</p>  <p><i>Restrepia echo</i></p>	<p>4557</p>  <p><i>Restrepia tsubotae</i></p>

4858  <i>Restrepia citrina</i>	4563  <i>Restrepia vasquezii</i>	4567  <i>Restrepia aristulifera</i>	4570  <i>Restrepia tabeae</i>
4573  <i>Restrepia chocoensis</i>	4575  <i>Restrepia falkenbergii</i>	4580  <i>Restrepia limbata</i>	4581  <i>Restrepia cuprea</i>

Fuente: Los autores, Alberto Guerrero, (OrchidRoots, 2022).

2.3 ADN Barcode

El código de barras de ADN es una herramienta utilizada para la identificación de especies, con el uso de una región pequeña del genoma que funciona como identificador único de cada especie (Rey & Capdevielle, 2020). Para que una región pueda ser considerada para usarse en el “*barcoding*” es necesario que permita distinguir la variación intraespecífica e interespecífica (Paz et al., 2011), para ello la región debe cumplir con tres criterios: (i) tener alta variabilidad y

divergencia genética a nivel de especie, (ii) tener una longitud de secuencia corta lo que facilite los procesos de extracción y amplificación de ADN, y (iii) poseer sitios conservados para desarrollar cebadores de PCR universales para la aplicación taxonómica (Kress & Erickson, 2008).

La aplicación de esta metodología ha abierto nuevas posibilidades en el estudio de ecosistemas altamente biodiversos permitiendo inventariar especies y tener una identificación más completa mediante la información morfológica y ecológica (Paz et al., 2011).

2.4 Técnicas Moleculares

2.4.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN consiste en aislar y purificar las moléculas de ADN y básicamente se fundamenta en las características fisicoquímicas de la molécula, es por lo que la selección del método de extracción depende del organismo que se esté estudiando, la cantidad de tejido y su estado de conservación (Alejos et al., 2014).

Los protocolos de extracción, normalmente, buscan eliminar los inhibidores de reacciones de amplificación (ADNsas, ARNasas, proteínas, etc.) que complique los procesos y análisis posteriores, además deben ser rápidos, sencillos y eficaces para garantizar la obtención de material genético de calidad (Fonseca et al., 2010).

El proceso de extracción consiste en 4 importantes fases:

- 1) *Homogenización y lisis del tejido:* Resulta un buen método al aplicar una homogenización química mediante un buffer de lisis que mantiene estable el material genético y desnaturaliza proteínas y, una homogenización mecánica con la utilización de pistilos que disuelven y separan la muestra mediante la fricción (Alejos et al., 2014).

- 2) *Separación de proteínas y lípidos*: Aquí se separa el ADN de las proteínas y lípidos mediante el uso de ciclos de centrifugación y solventes orgánicos (Alejos et al., 2014; Senna, 2020), como el SDS (Dodecilsulfato sódico) que se utiliza para disociar proteínas y alterar las membranas celulares (Senna, 2020), y también el Acetato de potasio que lo que hace es formar complejos junto con el SDS para interaccionar de mejor manera con las proteínas (Checa et al., 2020). También se utiliza el fenol: cloroformo con el fin de desnaturalizar proteínas y eliminar lípidos.
- 3) *Precipitación del ADN*: Una vez separados los lípidos y proteínas deben ser eliminados para posteriormente recuperar el ADN, para esto se adiciona isopropanol y etanol lo que permite que el ADN tener una forma insoluble mediante su plegamiento sobre sí mismo (Alejos et al., 2014).
- 4) *Redisolución del ADN*: es un paso esencial con el fin de hidratar el ADN para lo cual se puede utilizar agua ultrapura.

2.4.2 PCR

Denominada la reacción en cadena de la polimerasa es una reacción que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN de manera *in vitro* durante varios ciclos repetidos de copia, para ello se aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar nuevas cadenas de ADN (de Dios et al., 2013).

Entre los elementos que se utiliza para esta reacción esta una solución amortiguadora como el DMSO que disminuye la estructura secundaria del ADN aumentando la especificidad de la reacción, Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) que vienen a funcionar como los bloques que van construyendo nuevas cadenas de ADN, agua Taq polimerasa que normalmente se encuentra en kits ya comerciales, los cebadores que permiten que la Taq Polimerasa comience la síntesis de la nueva cadena de ADN, la muestra de ADN y por ultimo agua que es utilizada como un solvente de los demás ingredientes (Rodríguez & Barrera, 2004).

La PCR inicia con un proceso de separación de las dos cadenas que conforman la doble hélice de ADN mediante altas temperaturas que van desde los 94 a 96 °C en donde se rompen los puentes de hidrógeno que las mantenía unidas, así cada cadena queda disponible como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria (Serrato et al., 2014). Después se desarrolla una etapa denominada de alineamiento en donde ambos *primers* se alinean en un punto de crecimiento específico donde existe libre un grupo -OH en el extremo 3' necesarios para la acción de la ADN polimerasa, dicho proceso se lo realiza en temperaturas entre los 50 y 65 °C (Bolívar et al., 2014). La siguiente, y última etapa es la Elongación en donde se forman los amplicones con un tamaño determinado conocido previamente, esto realiza gracias a que la Taq polimerasa comienza a agregar dNTP's complementarios para crear cadenas completas de ADN en dirección 5' a 3' a una temperatura de 72 °C (Berg et al., 2008).

2.4.3 Secuenciación

La secuenciación es una herramienta de investigación que funciona mediante la incorporación de dideoxinucleótidos en una hebra en desarrollo de ADN que le suministra la parte terminal 3'OH que necesita la correspondiente polimerasa para comenzar a elongar, posteriormente se preparan 4 tubos de reacción donde son añadidos una pequeña proporción de un dideoxinucleótido trifosfato (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddCTP) y los productos de estas 4 reacciones son sometidos a electroforesis para analizar el patrón de bandas en orden de donde se puede deducir la secuencia de ADN (Berg et al., 2008).

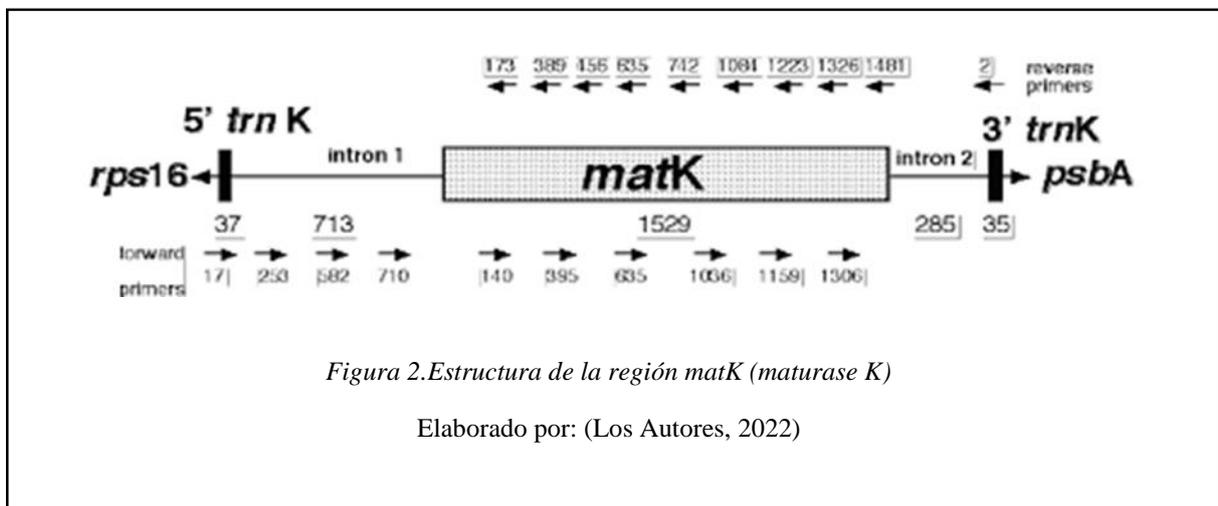
El análisis de estos fragmentos es muy útil para determinar sitios conservados o de variabilidad en el amplicón obtenido de PCR, y como resultado del estudio de estas regiones variables se puede usar para la identificación de especies (Winn et al., 2008).

2.5 Marcadores moleculares en orquídeas

2.5.1 Gen *matK*

El segmento del gen *matK* es una maturasa que participa en el splicing como un factor de maduración del pre-ARNm, 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 una fuerte señal filogenética (Albán & Toapanta, 2019).

El gen *matK* posee un tamaño ideal, una alta tasa de sustitución lo que le proporciona un nivel de variación a nivel de ácido nucleico en la posición del primer y segundo codón, pero a su vez tiene una baja proporción de transición/transversión y la presencia de sectores mutacionalmente conservados (Selvaraj et al., 2008). Estas características del gen *matK* son esenciales para resolver relaciones a nivel de familia y especie.

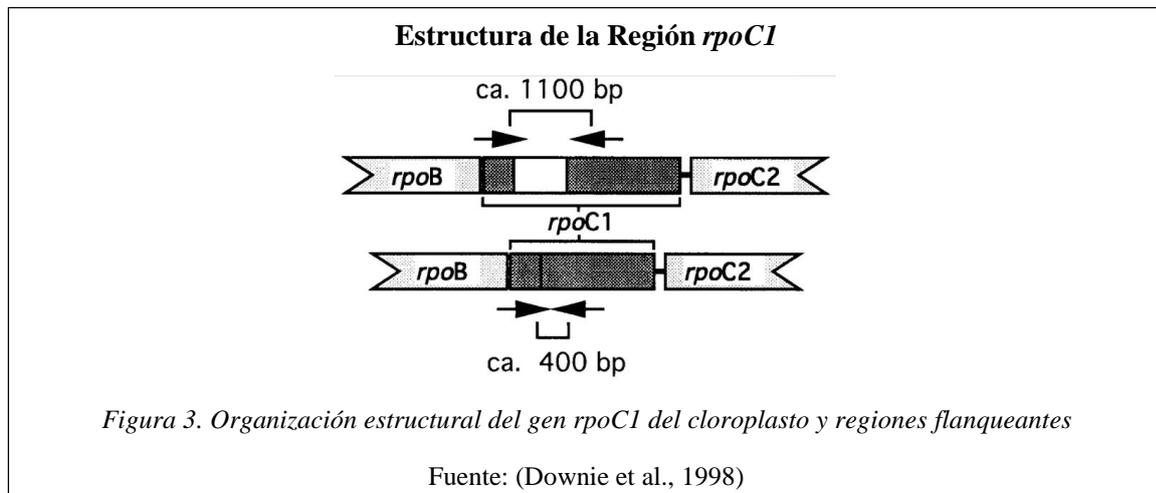


2.5.2 Gen *rpoC1*

Este gen pertenece a las plantas superiores y participa en los procesos de fotosíntesis (S. Lee et al., 2016), está involucrado en el proceso de transcripción de genes del cloroplasto (Cruz, 2011),

ya que codifican proteínas homólogas a las subunidades α , β y β' de la ARN polimerasa bacteriana (K. Lee et al., 2012).

Como marcador molecular, según varias investigaciones, es excelente ya que su tamaño oscila entre los 550 a 750 pb (Wang et al., 2017), además presenta altas tasas de evolución, es decir que posee altas tasas de variabilidad y son universales lo que los hace ideales para para procesos de identificación (Cruz, 2011).



2.6 Filogenia

La filogenia es la relación que existe entre todos los organismos que descienden de un ancestro común, entonces como ciencia se puede definir como el estudio de la relación evolutiva entre grupos biológicos usando una representación gráfica denominado árbol filogenético (Sarma et al., 2019).

Los análisis bioinformáticos que se realizan para la obtención de un árbol filogenético ayudan a comprender las relaciones que existen entre la estructura y los patrones de datos biológicos, para ello se analizan secuencias de ADN para encontrar diferencias o similitudes que pueden ser estructurales o funcionales; 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).

Para poder reconstruir un árbol filogenético es importante contar con las especies de interés que serán colocadas en un grupo interno, versus un grupo de especies que están emparentadas de manera cercana al grupo interno pero lo suficientemente distintas para encontrarse fuera del grupo que permite enraizar el árbol filogenético, permitiendo definir la dirección del árbol (Sosa, 2009).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de muestras

Las muestras vegetales internacionales desde el código 4541 hasta el código 4550 son especies de orquídeas del género *Restrepia* y fueron recolectadas de la colección privada de Alberto Guerrero, esta colección se encuentra ubicada en Pichincha y contiene la mayoría de los especímenes de Centro y Sur América.

Las muestras vegetales de orquídeas del género *Restrepia* con el código 4556, 4557, 4558, 4563, 4567, 4570, 4573, 4575, 4580, y 4581, fueron recolectadas en los invernaderos de Ecuagenera que se encuentran en Cuenca, en donde poseen especies de orquídeas tanto nacionales como internacionales de este género, también en Ecuagenera se recolectaron más muestras nacionales de este género que no se sabía con claridad que especies eran.

Para la recolección de las muestras vegetales de estas orquídeas primero se seleccionaron las plantas que presentaban flor y de estas se seleccionaron las hojas más jóvenes y sanas que no presentaban ningún tipo de daño. Las muestras se almacenaron en bolsas de papel Kraft las cuales fueron etiquetadas según el código de colección pertinente, después se las guardó en fundas ziploc para que así fuera más fácil su empaquetamiento en cajas de cartón y ser transportadas con mucho cuidado al laboratorio, donde fueron almacenadas en un congelador a -20°C , hasta su análisis.

3.2 Georreferenciación

Para determinar la posición de los especímenes dentro de un sistema de coordenadas espacial se utilizó el programa DIVA GIS 7.5. En primer lugar, se obtuvo información en la plataforma GBIF sobre la distribución de especies del género *Restrepia*, esta plataforma está vinculada la

base de datos Trópicos por lo que se obtuvo las coordenadas (latitud y longitud) de las especies registradas.

Se cargaron 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.

3.3 Estudio Molecular

La parte experimental del proceso se lo realizón los Laboratorios de Ciencias de la Vida que pertenecen a la Universidad Politécnica Salesiana, la cual se encuentra ubicada en el Ecuador, en el campus Norte de la ciudad de Quito, en la sede del Girón, durante el período septiembre-enero del 2022 al 2023.

3.3.1 Extracción de ADN

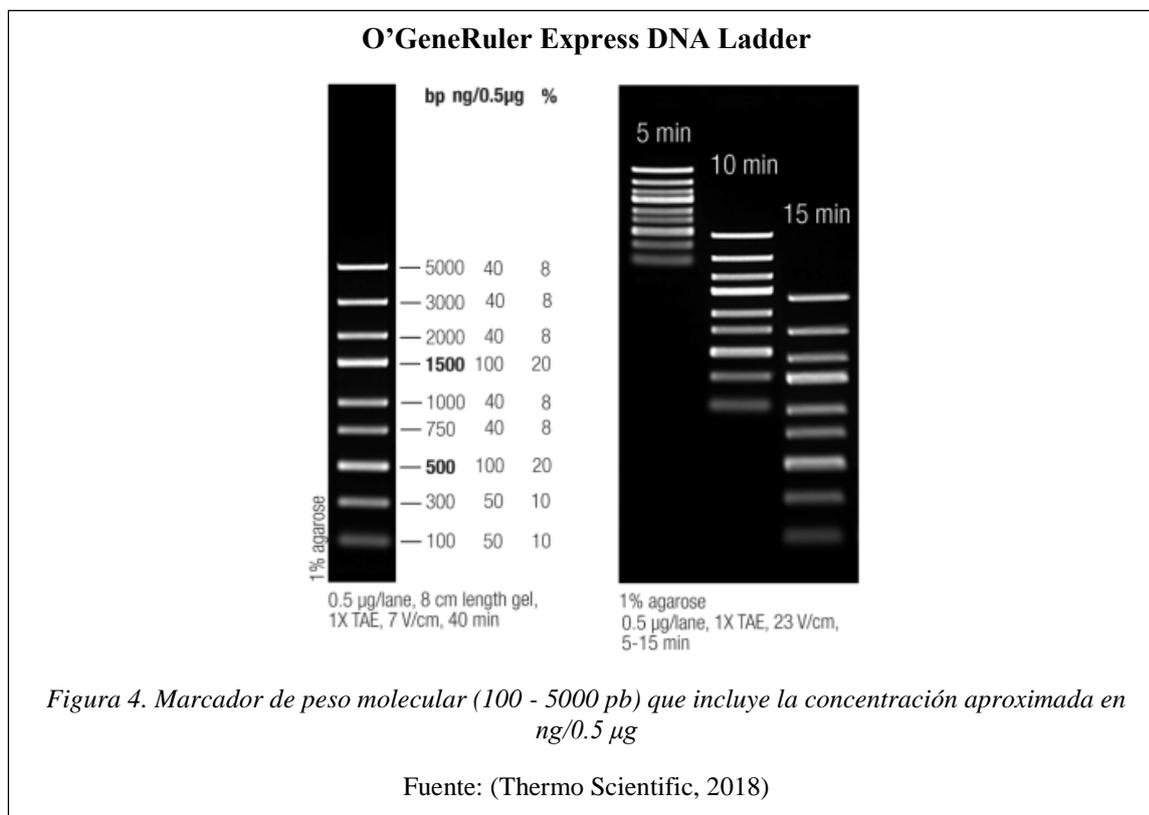
La extracción de ADN total se realizó con el método Doyle & Doyle (1987), modificado por Iza (2018) y los autores (2023) en el cual se inició cortando 50 mg de muestra, para posteriormente ser colocada en un mortero con 480 μ L de Buffer de Lisis y 75 μ L de Dodecilsulfato sódico SDS 10%, y ser triturada con el pistilo hasta obtener una mezcla homogénea, luego se transfirió la mezcla triturada a tubos eppendorf de 1.5 mL y se añadió 75 μ L de Dodecilsulfato sódico SDS 10%, y se mezcló por inversión de 5 a 10 veces, a continuación se incubaron los tubos eppendorf en un termo bloque de Thermo Scientific™ por 25 minutos a 65,1°C; al cumplirse ese periodo de tiempo se añadió 94 μ L de acetato de potasio (5M) y se mezcló nuevamente por inversión de 5 a 10 veces, luego se congeló a -20°C por 2 horas, al culminar las 2 horas en el congelador se centrifugó por 5 minutos a 12 000 rpm, se trasladó el sobrenadante a un tubo eppendorf 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 trasladó la fase intermedia (350 μ L aproximadamente) con una micropipeta en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL,

evitando topar las paredes del tubo y la parte inferior de la fase intermedia, posteriormente se añadió 350 μL de isopropanol frío, se mezcló por inversión de 5 a 10 veces, finalmente se almacenó a -20°C por toda la noche; una vez pasada la noche, al día siguiente se centrifuga las muestras durante 4 minutos a 12 000 rpm, percibiendo el pellet en la parte de abajo del tubo eppendorf, se elimina el sobrenadante y se realizan tres lavados añadiendo 300 μL de etanol (70%) y centrifugando cada vez por 4 minutos a 12 000 rpm, luego se colocan los tubos en un termo bloque a 37.1°C para evaporar los residuos de alcohol que quedan después de los lavados y así lograr resuspender el pellet con 30 μL de TE 1X y almacenarlo a -20°C .

3.3.2 Electroforesis

Para tener una 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 de 50mL al 1%, para lo cual se usó 0,5g 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 minutos hasta que se disolvió la agarosa, se dejó enfriar hasta unos 60°C o este accesible al tacto y se añadió 0.2 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. alrededor.

Para la preparación de muestras que se colocaron en el gel de electroforesis se tomó 2 μL de tampón de carga Blue Juice 2X con 8 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.



3.3.3 Amplificación de ADN

Para poder realizar la amplificación primero se seleccionan las regiones cloroplásticas, que en este caso serán las regiones de *matK* y *rpoC1* y se utilizó la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) convencional usando el termociclador ProFlex PCR System, Applied Biosystems-USA, para el kit se utilizó el Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix como se describe en la *Tabla 2*.

La región cloroplástica *matK* se amplificó con los primers forward *matK*-1RKIM (5'CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG3') y reverse *matK*-3FKIM (5'ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC3'), en el caso de la región cloroplástica *rpoC1* se amplificó con los primers forward (5'GTGGATACACTTCTTGATAATGG3') y reverse (5'TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC 3') (Endara & Ocaña, 2022; Mongrovejo & Proaño, 2020; Montalvo & Vargas, 2019).

Las condiciones para la amplificación que se usaron fueron las de (Endara & Ocaña, 2022) en donde nos indican que la temperatura ideal de Annealing para *matK* es de 53.5 °C y para *rpoCl* es de 47.5°C, el resto de las condiciones se mantuvieron como indica el protocolo, para los componentes de la reacción PCR se modificaron las cantidades para el agua de PCR y para el ADN, el resto continuo siendo igual, en las siguientes tablas se detallan de mejor manera las condiciones de PCR y sus componentes.

Tabla 2. Componentes de la reacción PCR con Phire Plant Direct PCR para las regiones rpoCl y matK

Componentes	Volumen en μL para 1 muestra
Phire Plant Direct PCR Master mix	10
Primer forward (10 μM)	0.5
Primer reverse (10 μM)	0.5
Agua de PCR	5.5
DMSO	0.5
ADN	3
Volumen total de la reacción	20

Obtenido de: (Thermo Scientific, 2018). Modificado por: Los autores, 2022

Tabla 3. Condiciones de la PCR para matK

Condiciones para <i>matK</i>			
Pasos	Temperaturas	Tiempos	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	98 °C	10 segundos	40
Annealing	53.5 °C	10 segundos	
Extensión	72 °C	40 segundos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1
Mantenimiento	4 °C	∞	1

Obtenido de: (Endara & Ocaña, 2022)

Tabla 4. Condiciones de la PCR para rpoC1

Condiciones para <i>rpoC1</i>			
Pasos	Temperaturas	Tiempos	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	98 °C	10 segundos	40
Annealing	47.5 °C	10 segundos	
Extensión	72 °C	40 segundos	
Extensión final	72 °C	10 minutos	1
Mantenimiento	4 °C	∞	1

Obtenido de: (Endara & Ocaña, 2022)

Se realizó después de las amplificaciones una electroforesis para examinar si se obtuvieron los productos deseados, para esto en el gel de agarosa en cada uno de sus pocillos se cargó 1.5 µL de producto de PCR y se tiñó el gel con 0.2 µL del fluoróforo (SafeView™ Classic).

3.4 Filogenia

Una vez recibidas las secuencias que fueron enviadas a la empresa *Macrogen* tanto para *matK* como para *rpoCI*, y junto con las secuencias de Endara & Ocaña (2022), se realizó la limpieza de los cromatogramas mediante la herramienta Geneious donde pudimos seleccionar las secuencias de mejor calidad eliminando aquellos extremos donde existía más ruido en el cromatograma, además mediante un alineamiento previo de estas secuencias y ubicando las variaciones y SNPs se pudo corregir los errores que hayan sido posibles de solucionar.

Posteriormente se seleccionó grupos externos tanto para *matk* como para *rpoCI* y secuencias de la base de datos GenBank de especies de *Restrepia* de las cuales solo existía información para *matk*, (ver **Anexo 2**).

Luego se realizó un alineamiento de todas las secuencias antes mencionadas, tanto para *matk* como para *rpoCI*, usando el programa Geneious Prime Trial y se usó el programa en línea GBLOCKS (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/one_task.cgi?task_type=gblocks) para eliminar las regiones divergentes o posiciones con mal alineamiento, manteniendo las regiones consideradas más informativas para el análisis filogenético. Una vez procesadas las secuencias obtenidas, se obtuvieron 2 árboles filogenéticos aplicando los métodos de reconstrucción filogenética: Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB).

Para realizar el árbol filogenético por el método de Máxima Verosimilitud (MV) en el programa Mega 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) se empleó el modelo T92+G denominado (Tamura 3-Parameter con la distribución Gamma) proporcionado por este mismo programa, con un Bootstrap de 500 para el marcador molecular *matK*. Mientras que para el marcador *rpoCI* se empleó el modelo JC (Jukes-Cantor) con un Bootstrap de 500.

Con el método de Inferencia Bayesiana (IB) se utilizó el programa Beauti para establecer el grupo externo y el grupo de estudio, el modelo de evolución fue el T93+G (Tamura Nei) debido

a que el modelo T92+G no se encuentra en la herramienta. Para MCMC (Monte Carlo con Cadenas de Markov) se estableció condiciones de 10000000 de generaciones de árboles y el mismo valor para la frecuencia del muestreo.

Y por último para obtener el árbol filogenético se subieron los datos anteriormente procesados al programa BEAST versión v1.10.4 obteniendo dos archivos los cuales serán procesados en la herramienta LogCombiner v1.10.4 que permite combinar los dos archivos de árbol y obtener una curva de identidad, luego con TreeAnnotator v1.10.4 se resumirá la información de los árboles producidos por BEAST en un solo árbol "objetivo" y finalmente se observó el árbol consenso obtenido en el programa FigTree v1.4.4 con los correspondientes valores de probabilidad.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Colección de Muestras

La colección de muestras de tejido foliar de las especies tanto nacionales como internacionales del género *Restrepia* se realizó en la colección privada de Alberto Guerrero y además en la salida de campo hacia la provincia de Azuay y Loja realizada el 21 de septiembre de 2022, obteniendo 26 muestras para el estudio.

Tabla 5. Listado de plantas del género *Restrepia* colectadas para el estudio

Número de muestras	Nombre científico	Código de colección	Lugar de recolección	Lugar de registro
1	<i>R. fritillina</i> Luer & V.N.M.Rao	4541	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Cali)
2	<i>R. sanguinea</i> Rolfe	4542	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Antioquia)
3	<i>R. elegans</i> H.Karst.	4543	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Norte de Santander) Ecuador (Morona Santiago)

				Venezuela (Aragua, Distrito Federal, Mérida)
4	<i>R. chameleon</i> Luer & R.Escobar	4544	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Norte de Santander)
5	<i>R. nittiorhyncha</i> (Lindl.) Garay	4545	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia, (Norte de Santander) Venezuela (Mérida)
6	<i>R. escobariana</i> Luer	4546	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Risaralda)
7	<i>R. metae</i> Luer	4547	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Cauca)
8	<i>R. jesupiana</i> Luer	4548	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Antioquia)
9	<i>R. roseola</i> Luer & R.Escobar	4549	Colección privada Alberto Guerrero	Venezuela (Táchira)

10	<i>R. pelyx</i> Luer & R.Escobar	4550	Colección privada Alberto Guerrero	Colombia (Antioquia), Venezuela (Mérida)
11	<i>R. echo</i> Luer & R.Escobar	4556	Gualaceo (Ecuador)	Colombia (Choco)
12	<i>R. tsubotae</i> Luer & R.Escobar	4557	El Pangi (Ecuador)	Colombia (Antioquia)
13	<i>Restrepia citrina</i> Luer & R.Escobar	4558	Saraguro (Ecuador)	Colombia (Norte de Santander)
14	<i>R. howei</i>	4559	Mario Portilla	Ecuador (Morona Santiago)
15	<i>R. vasquezii</i> Luer	4563	El Cisne (Ecuador)	Bolivia (La Paz)
16	<i>R. aristulifera</i> Garay & Dunst.	4567	El Cisne (Ecuador)	Colombia (Norte de Santander) Venezuela (Táchira)
17	<i>R. tabeae</i> H.Mohr	4570	El Pangi (Ecuador)	Colombia (Norte de Santander)
18	<i>R. chocoensis</i> Garay	4573	Gualaceo (Ecuador)	Colombia (Antioquia)
19	<i>R. falkenbergii</i> Rchb.f.	4575	Cuenca (Ecuador)	Colombia (Antioquia)

20	<i>R. limbata</i> Luer & R.Escobar	4580	Cuenca (Ecuador)	Colombia (Risaralda)
21	<i>R. cuprea</i> Luer & R.Escobar	4581	El Cisne (Ecuador)	Colombia (Antioquia)
22	<i>R. Gutulatta</i> <i>extra big xxxxx</i>	4561	Saraguro (Ecuador)	Ecuador (Cuenca) Venezuela (Táchira)
23	<i>R. Gutulatta</i> <i>extra big xxxxx</i>	4562	El Pangi (Ecuador)	Ecuador (Morona Santiago) Venezuela (Táchira)
24	<i>R. Brachypus</i> <i>yellow #1</i>	4582	Gualaceo (Ecuador)	Colombia (Risaralda)
25	<i>Restrepia sp.</i>	4583	El Cisne (Ecuador)	Ecuador (Cuenca)
26	<i>Orchidea sp</i>	4584	El Pangi (Ecuador)	Ecuador (Cuenca)
27	<i>Restrepia sp.</i>	4585	Cuenca (Ecuador)	Ecuador (Cuenca)

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

Fuente: (Los autores, 2023).

4.2 Georreferenciación

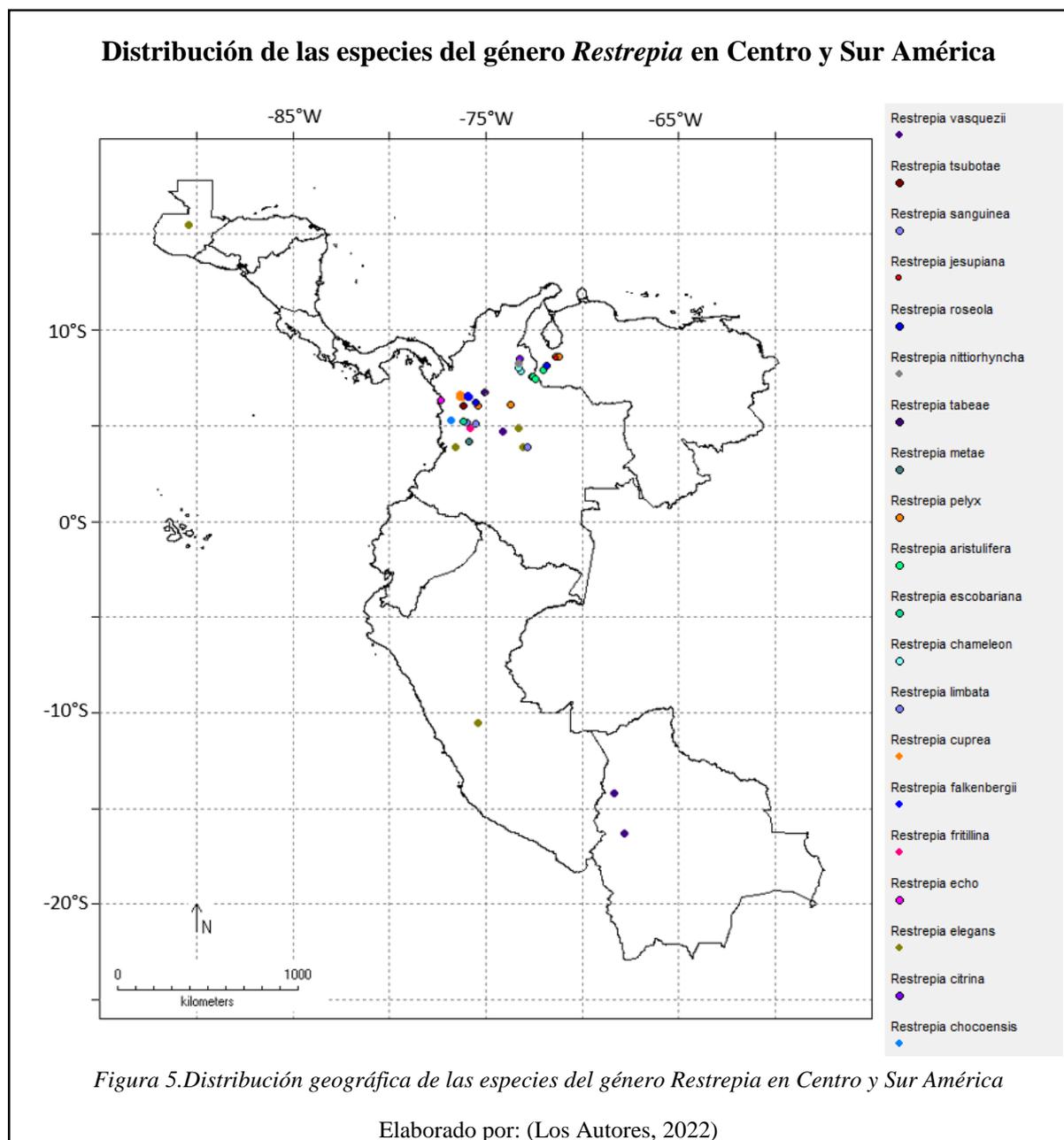
En la página web Trópicos se encontró la información que nos permitió fijar las áreas de distribución del género *Restrepia* en los países de Centro y Sur América, la mayoría de las especies de este género se encuentran ubicadas en el país de Colombia, como se puede observar en la Figura 5.

En Colombia se encuentran una gran cantidad de orquídeas del género *Restrepia* en especial en la región del Choco, debido a que este lugar presenta un gran rango topográfico que va desde 1 m.s.n.m. hasta los 2.800 m.s.n.m. (Gutiérrez & Mosquera, 2001), las demás especies se encuentran distribuidas en este país cerca de la frontera con Venezuela en el departamento del Norte de Santander que presenta un rango altitudinal que va desde los 1.000 m.s.n.m. hasta los 4.000 m.s.n.m. (Gauta, 2020).

Las demás especies de *Restrepia* están distribuidas por Venezuela en los estados de Táchira y Mérida, el estado de Táchira limita con Colombia, este estado presenta elevaciones que van desde 2.020 m.s.n.m. hasta los 3.912 m.s.n.m. (Martínez, 2005). Mérida presenta un rango altitudinal que va desde los 100 m.s.n.m. hasta los 5.000 m.s.n.m. (Gómez, 2004).

El resto de las especies de este género se encuentran en los países de Guatemala, Perú y Bolivia que presentan rangos altitudinales que van, desde el nivel del mar hasta los 4.000 m.s.n.m. para Guatemala (Irungaray et al., 2018), para Perú en la región andina va desde los 1.500 m.s.n.m. hasta los 3.800 m.s.n.m. (MINAM, 2019) y en Bolivia en la eco-región de los valles secos que va desde los 2.200 m.s.n.m. hasta los 3.200 m.s.n.m. (Moya et al., 2015).

Todos los rangos altitudinales de los países coinciden con los rangos del género *Restrepia* ya que este género se encuentra creciendo a alturas entre 1.000 y 3.000 m.s.n.m.



En Colombia se encuentran las especies: *R. chocoensis*, *R. citrina*, *R. echo*, *R. aristulifera*, *R. fritillina*, *R. falkenbergii*, *R. cuprea*, *R. limbata*, *R. chameleon*, *R. escobariana*, *R. pelyx*, *R. metae*, *R. nittiorhyncha*, *R. roseola*, *R. sanguinea*, *R. tabeae*, *R. tsubotae*, *R. vasquezii* y *R. elegans*.

En Venezuela se encuentran las especies: *R. aristulifera*, *R. pelyx*, *R. roseola* y *R. jesupiana*.

En Bolivia se encuentra la especie *R. vasquezii*.

En los países de Guatemala y Perú se encuentra la especie *R. elegans*.

4.3 Estudio Molecular

4.3.1 Extracción de ADN

Se utilizó un solo método para la extracción de ADN, Doyle & Doyle (1987) modificado (2018 y 2022). En las bandas obtenidas en la **Figura 5** se evidencian cadenas de ADN por encima de las 5000 pb y una concentración entre los 50 – 100 ng/μL aproximadamente con barridos leves, en la **Figura 6** se puede observar bandas que presentan una concentración entre los 40, 50 y 100 ng/μL y por encima de las 5000 pb pero con barridos mucho más pronunciados. Y por último en la repetición de la extracción de las muestras 4557, 4573, 4583, 4584 y 4585 (**Figura 7**) se obtuvieron bandas similares a las anteriores, por encima de las 5000 pb y con concentraciones entre 50 – 100 ng/μL y con barridos tenues.

La concentración de ADN obtenida en la mayoría de las muestras es relativamente baja, esto puede estar relacionado con que las hojas del género *Restrepia* presentan una contextura carnosa, por lo cual es complicado poder tener un proceso adecuado de rotura de las uniones entre células y así facilitar a los buffers de lisis la liberación del material genético, por lo que se necesita una homogenización mecánica.

Por lo antes mencionado se hizo una modificación al protocolo tradicional en el que se utilizaba un pistilo y se lo cambio por el uso de un mortero para la trituración del material vegetal, ya que de esta manera se permitía una mejor fricción y ruptura de la pared y membrana celular y nuclear permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos (Alejos et al., 2014).

Gel electroforético de ADN de muestras de la 4541 – 4556 extraído por método Doyle & Doyle (1987), modificado por Iza (2018) y los autores (2022-2023)

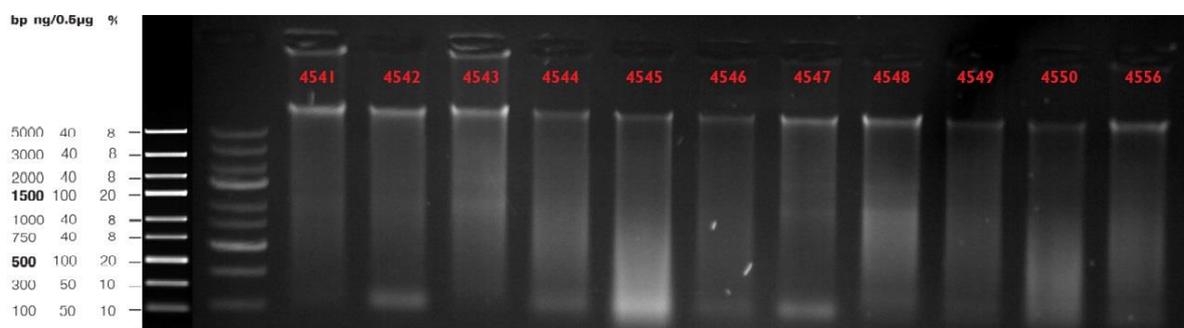


Figura 6. ADN extraído por el método Doyle & Doyle modificado

Elaborado por: (Los autores, 2022)

Gel electroforético de ADN de muestras de la 4557 – 4585 extraído por método Doyle & Doyle (1987), modificado por Iza (2018) y los autores (2022-2023)

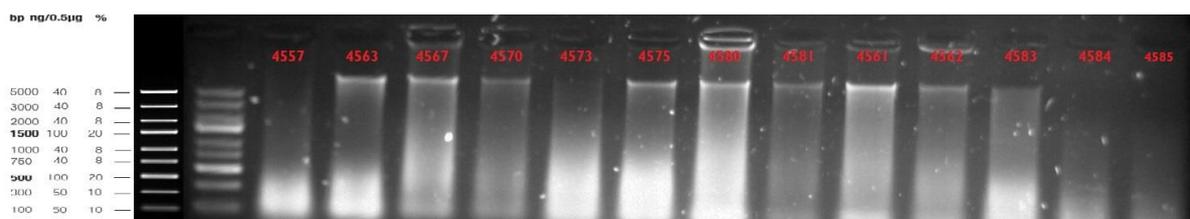


Figura 7. ADN extraído por el método Doyle & Doyle modificado

Elaborado por: (Los autores, 2022)

Gel electroforético de ADN de muestras de la 4557, 4573, 4583, 4584 y 4585 extraído por método Doyle & Doyle (1987), modificado por Iza (2018) y los autores (2022-2023)

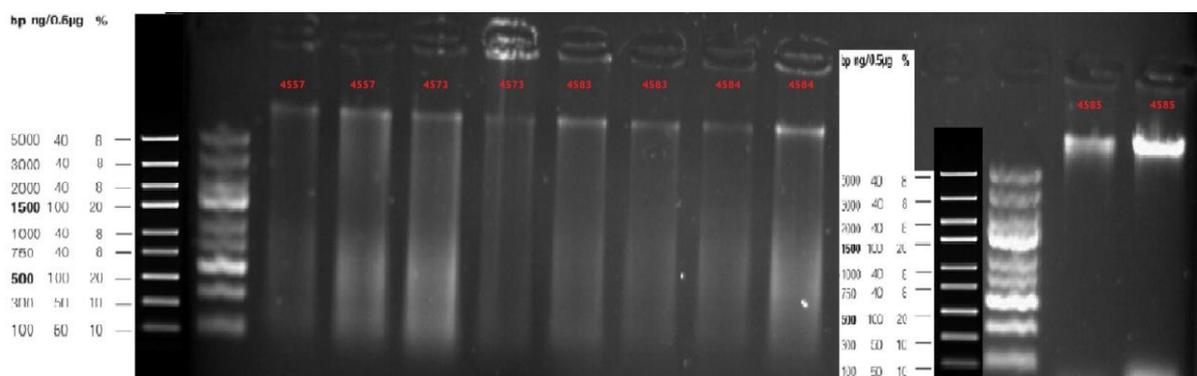


Figura 8. ADN extraído por el método Doyle & Doyle modificado

Elaborado por: (Los autores, 2022)

En el caso de las bandas con barridos observados estos evidencian degradación del ADN debido a compuestos contaminantes o la digestión por las enzimas, esto puede interferir en el proceso de extracción, por lo que en muestras que son de la misma especie se pueden obtener distintas concentraciones de ADN (Mazo, 2011).

Además, parte de estos contaminantes se deben a que el tejido foliar de *Restrepia* posee material de reserva como almidón, gránulos lípidos, cristales de proteínas y además agua que les ayuda a conservar la humedad (Endara & Ocaña, 2022). Es por ello que, en la medida de lo posible, se prefiere material foliar fresco, joven, tierno y sin magulladuras para el aislamiento del ADN genómico porque el número de células por unidad de área será mayor y la cantidad de metabolitos secundarios no deseados y otros compuestos fenólicos será menor, además, las hojas maduras contienen una mayor cantidad de polifenoles y polisacáridos, lo que hace que la extracción sea muy difícil para aislar ADN genómico de buena calidad (Kamba & Ranjan, 2018).

4.3.2 Amplificación de ADN

Se amplificaron 26 muestras con el marcador molecular *matK*, la temperatura de hibridación que se usó para la amplificación de estas muestras fue de 53.5 °C, como lo recomiendan Endara & Ocaña (2022).

En la **Figura 9** y **Figura 10** se puede observar las bandas obtenidas con el marcador molecular *matK*, estas se encuentran entre 750 – 1000 pb y una concentración de 50 a 300 ng/μL, el tamaño de los amplicones es el adecuado y corresponden a los obtenidos en anteriores trabajos de otros autores para el gen de *matK* (Endara & Ocaña, 2022; Mongrovejo & Proaño, 2020).

Gel electroforético No.1 de productos de PCR del gen *matK*

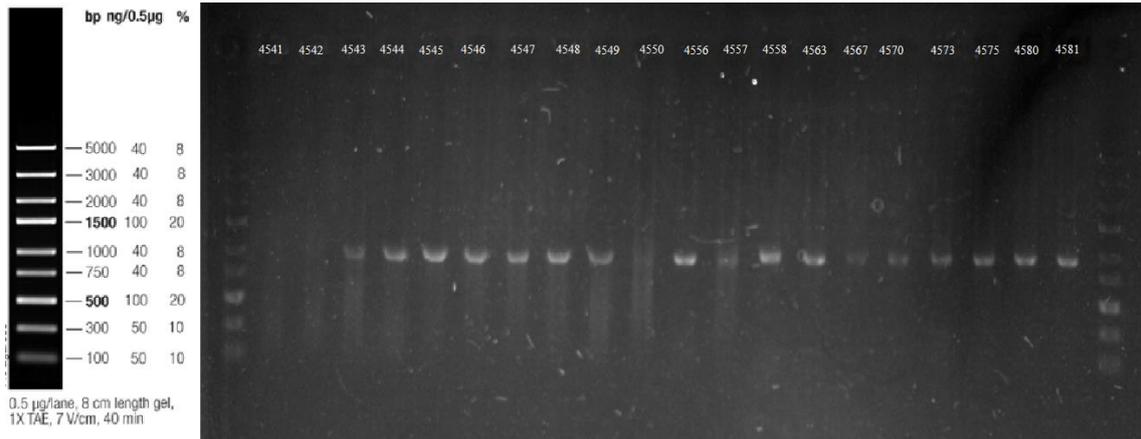


Figura 9. Productos de PCR con el marcador *matK*

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Nota: Marcador de peso molecular a ambos lados, carriles donde no se observa banda son el 4541, 4542, 4550, 4557 y 4567, mientras que en los demás además se observa bandas claras entre 1000 y 1500 pb.

Gel electroforético No.2 de productos de PCR del gen *matK*

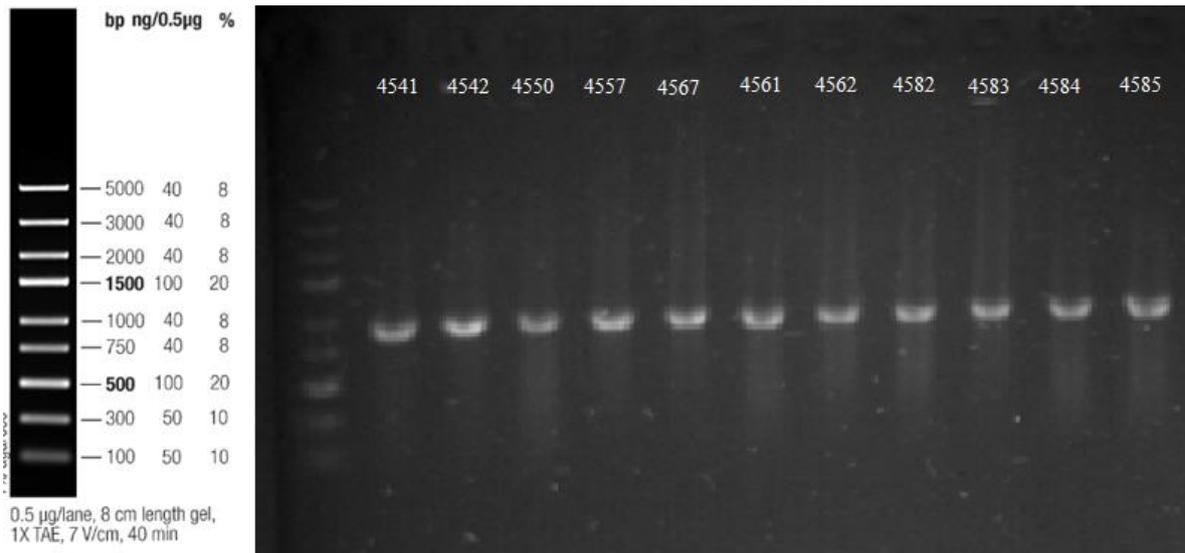


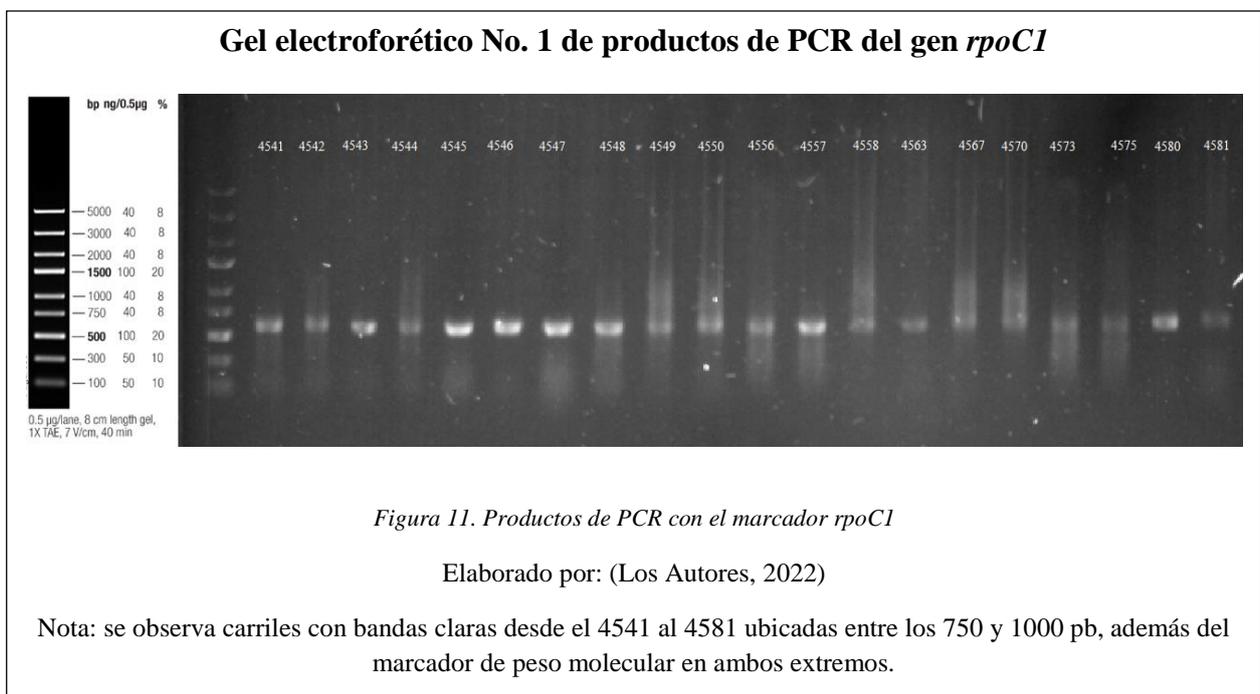
Figura 10. Productos de PCR con el marcador *matK*

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Nota: Marcador de peso molecular a la izquierda, en todos los carriles se observa una banda clara entre 1000 y 1500 pb

Se amplificaron 24 muestras con el marcador molecular *rpoC1*, la temperatura de hibridación que se usó para la amplificación de estas muestras fue de 47.5 °C, como lo recomiendan Endara & Ocaña (2022).

En la **Figura 11** y **figura 12** se puede observar las bandas obtenidas con el marcador molecular *rpoC1*, estas se encuentran entre 500 – 750 pb y una concentración de 50 a 100 ng/μL, el tamaño de los amplicones es el adecuado y corresponden a los obtenidos en anteriores trabajos de otros autores para el gen de (Endara & Ocaña, 2022; Mongrovejo & Proaño, 2020)



Gel electroforético No. 2 de productos de PCR del gen *rpoC1*

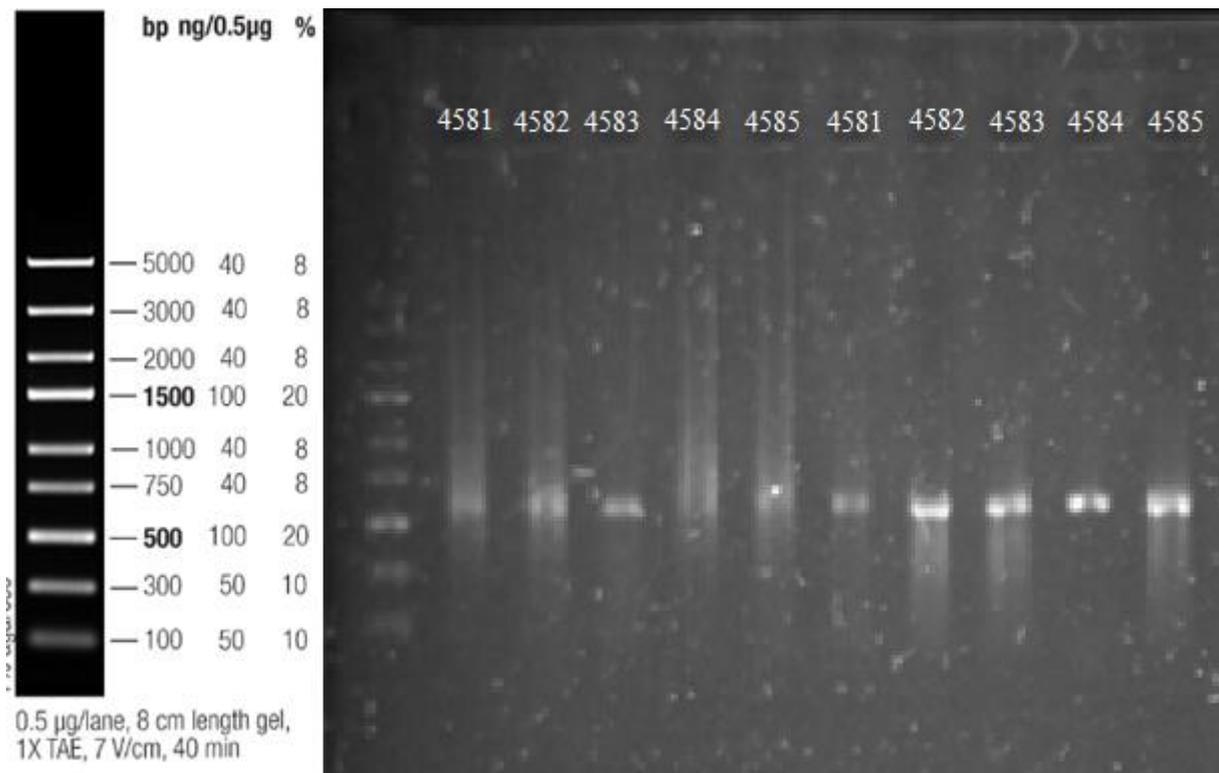


Figura 12. Productos de PCR con el marcador *rpoC1*

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Nota: se observa carriles con bandas claras desde el 4581 al 4585 ubicados entre los 500 y 750 pb, además del marcador de peso molecular de 100 a 5000 pb en un extremo, en este gel se realizó por duplicado.

4.3.3 Filogenia

Usando las 37 secuencias, 10 de la base de datos de GenBank, 12 del trabajo experimental de Endara & Ocaña (2022) y 15 del presente trabajo, se obtuvieron dos árboles filogenéticos para el gen *matK*. El primero con el método de Máxima Verosimilitud (Figura 14), con el modelo evolutivo T92+G con un Bootstarp de 500, considerando una distribución Gamma que indica heterogeneidad del alineamiento. El modelo T92 resulta ser muy bueno ya que tiene una tasa de corrección muy alta debido a que toma en cuenta el sesgo del contenido de G+C y la diferencia de la tasa de transición (Tamura et al., 2011).

Modelo evolutivo

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models										
Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(U)
T92+G	76	4475.930	3860.477	-1853.998	n/a	0.16	0.65	0.338	0.338	0.1
T92+G+I	77	4476.027	3852.483	-1848.995	0.60	0.71	0.65	0.338	0.338	0.1
TN93+G	79	4488.316	3848.588	-1845.035	n/a	0.18	0.65	0.298	0.379	0.1
TN93+G+I	80	4490.059	3842.240	-1840.854	0.57	0.70	0.65	0.298	0.379	0.1
HKY+G	78	4493.678	3862.041	-1852.768	n/a	0.16	0.67	0.298	0.379	0.1
HKY+G+I	79	4493.794	3854.066	-1847.774	0.60	0.72	0.67	0.298	0.379	0.1
GTR+G	82	4517.319	3853.318	-1844.380	n/a	0.18	0.65	0.298	0.379	0.1
GTR+G+I	83	4518.982	3846.891	-1840.159	0.57	0.70	0.65	0.298	0.379	0.1
T92+I	76	4525.541	3910.087	-1878.804	0.43	n/a	0.65	0.338	0.338	0.1
TN93+I	79	4533.399	3893.672	-1867.576	0.43	n/a	0.66	0.298	0.379	0.1
HKY+I	78	4542.896	3911.259	-1877.377	0.43	n/a	0.65	0.298	0.379	0.1
JC+G+I	75	4560.394	3953.033	-1901.282	0.61	0.73	0.50	0.250	0.250	0.2
JC+G	74	4560.706	3961.437	-1906.491	n/a	0.15	0.50	0.250	0.250	0.2

Figura 13. Modelo evolutivo proporcionado por el programa MEGA

Fuente: Datos obtenidos del software MEGA

Para el análisis de estos árboles se emplearon las secuencias de GenBank para verificar si se agrupan con las metodologías empleadas, es así que se puede observar que con el método MV (Figura 14), en las especies NCBI-*R. citrina* se agrupan entre sí, más no con las *R. citrina* de la presente investigación, esto debido a que las muestras de secuencias de este trabajo probablemente no tenían una buena calidad, más no por el marcador molecular utilizado.

Además, las NCBI-*R. citrina* se agrupan entre ellas con la secuencia de NCBI-*Restrepia* sp., esto debido a que son casi idénticas ya que al realizar un Blastn solo varía en dos posiciones (Anexo 5), también la secuencia de *Restrepia* sp. la cargaron a la base datos en el 2017 y las de *R. citrina* en el 2022, por lo que al parecer los autores del 2017 no realizaron una revisión de sus secuencias, y no actualizaron la identificación, por lo que posiblemente sea una *R. citrina*.

La especie NCBI-*R. trichoglossa* y NCBI-*R. brachypus* no se agrupan de una manera coherente, debido posiblemente a que una de estas dos, esté mal identificada o que el marcador molecular no pueda ser discriminativo para estas dos especies.

- Existe una agrupación clara de las especies de NCBI-*R. muscifera*, se agrupan las especies *R. cuprea* y *R. escobariana* con un soporte de 70.
- Grupo C: Con el clado que posee un soporte de 83 en el que se agrupan las especies *R. vasquezii* y *R. nittiorhyncha*.
- Grupo D: Con un clado con soporte estadístico de 66 que agrupa las especies NCBI-*R. citrina* y NCBI-*Restrepia* sp., en este mismo grupo encontramos un clado con soporte de 56 donde se agrupan *R. seketi*, *R. mohri* y *R. condorensis*.

La especie *Dracula alcithoe* MN615347.1 fue crucial para poder enraizar el árbol filogenético debido a que pertenece a la subtribu *Pleurothallidinae* y la familia *Orchidaceae*, por lo que se utilizó como grupo externo.

El hecho de que en GenBank solo existan dieciséis secuencias disponibles de las cuales para este trabajo se utilizan diez, demuestra la necesidad de realizar más 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* (Endara & Ocaña, 2022).

Árbol filogenético del género *Restrepia* para *matK*

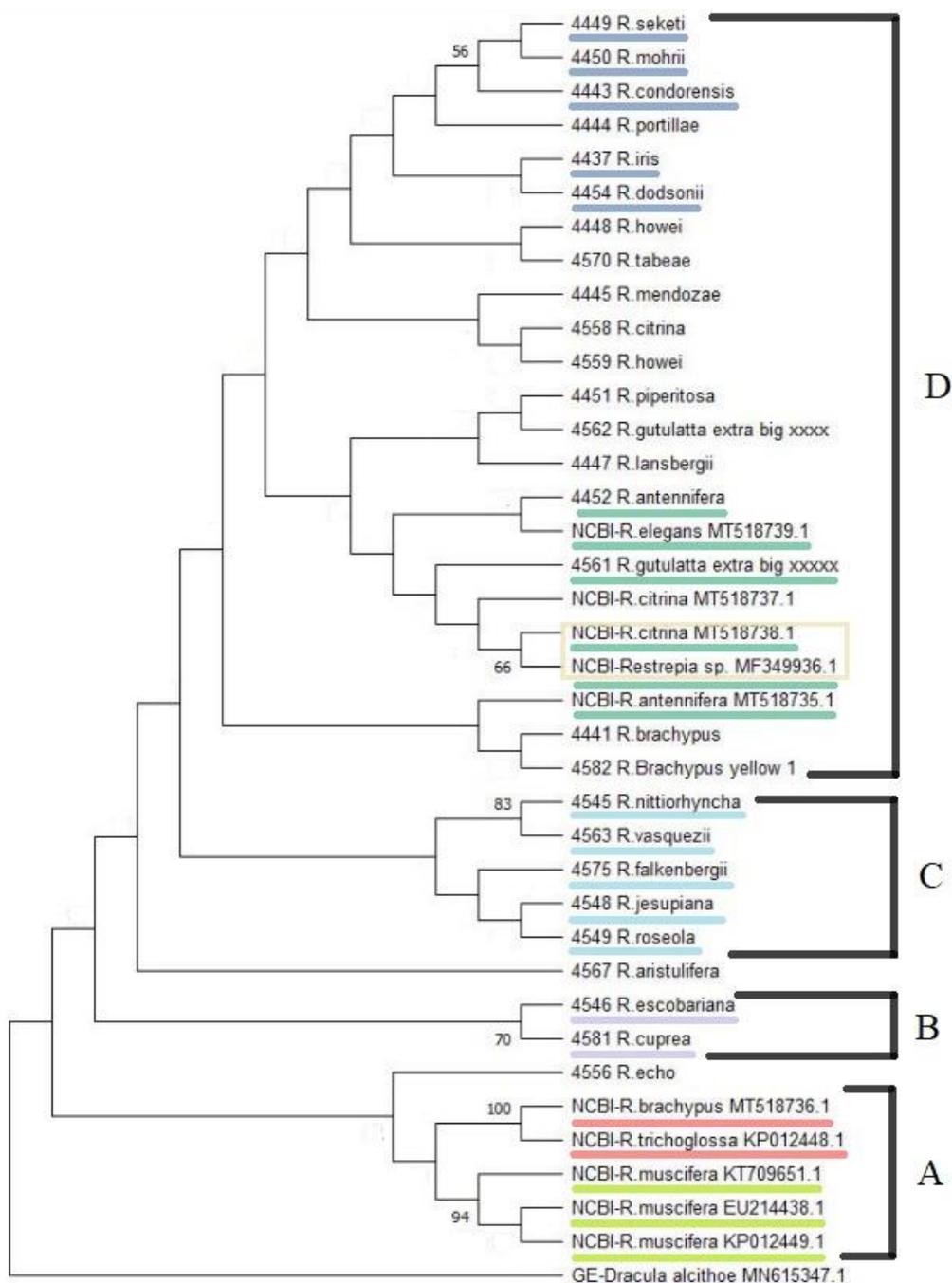


Figura 14. Árbol consenso del género *Restrepia* usando la región *matK* con el método de Máxima verosimilitud

Fuente: Datos procesados con el software MEGA

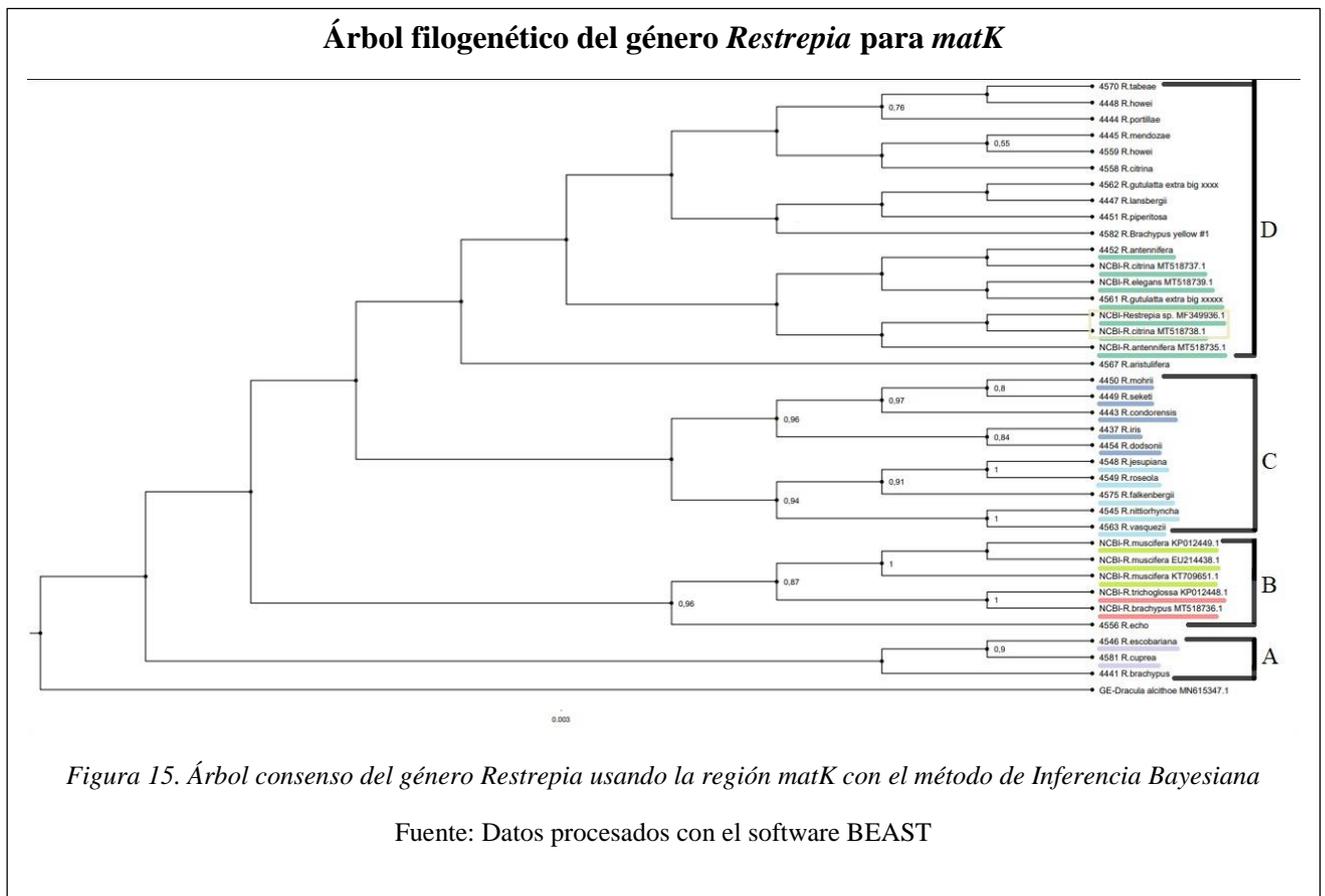
El segundo árbol se lo obtuvo con el método de Inferencia Bayesiana, el modelo de evolución fue el T93+G, con un número de generación de árboles de 10000000, debido a que el modelo

T92+G no está disponible en Beauti; este modelo considera un parámetro extra para caracterizar la diferencia entre las transiciones y transversiones (Chavez, 2015).

Continuando con el análisis del árbol con el método de IB (Figura 15), los grupos formados que se pueden identificar se describen como:

- Grupo A: Que posee un clado con una probabilidad posterior de 0,9 donde se encuentran las especies *R. escobariana* y *R. cuprea* donde podemos notar que se agrupan de igual manera en el árbol con el método de MV.
- Grupo B: con probabilidad posterior de 0,96 donde se encuentran las NCBI-*R.muscifera*, NCBI-*R. trichoglossa* y NCBI-*R. brachypus*. Observando que todas las especies de NCBI-*R.muscifera* se agrupan entre sí por lo que se puede identificar que son la misma especie. También NCBI-*R. trichoglossa* y NCBI-*R. brachypus* se vuelven a agrupar por lo que se verifica que una de las dos está mal identificada por lo que el marcador molecular no las puede discriminar. Aquí también podemos analizar que *R. echo* se agrupan en un solo clado tal como se observó en el árbol con el método MV, por lo cual comparten características similares entre todas estas especies.
- Grupo C: Posee dos clados, uno con una probabilidad de 0,94 donde se agrupan *R. jesupiana*, *R. roseola*, *R. falkenbergii*, *R. nittiorhyncha* y *R. vasquezii.*, y el otro clado con 0,96 en el que se agrupan las especies *R. mohrii*, *R. seketi*, *R. condorensis*, *R. iris* y *R. dodsonii*. Aquí podemos observar que estas especies de estos dos clados se siguen agrupando entre sí tanto con el método de IB como con el de MV.
- Grupo D: El cual es la agrupación más grande una probabilidad posterior baja en donde se encuentran las especies de *R. tabae*, *R. howei*, *R. portillae*, *R. mendozae*, *R. citrina*, *R. gutulatta extra big xxxx*, *R. gutulatta extra big xxxxx*, *R. lansbergii*, *R. piperitosa*, *R. brachypus yellow #1*, *R. antennifera*, NCBI-*R. citrina*, NCBI-*R. elegans*, NCBI-*Restrepia sp.* y NCBI- *R. antennifera*. Aquí podemos observar que NCBI-*R. citrina* y

NCBI-*Restrepia* sp. se vuelven a agrupar lo que respalda que esta última podría ser una *R. citrina*.



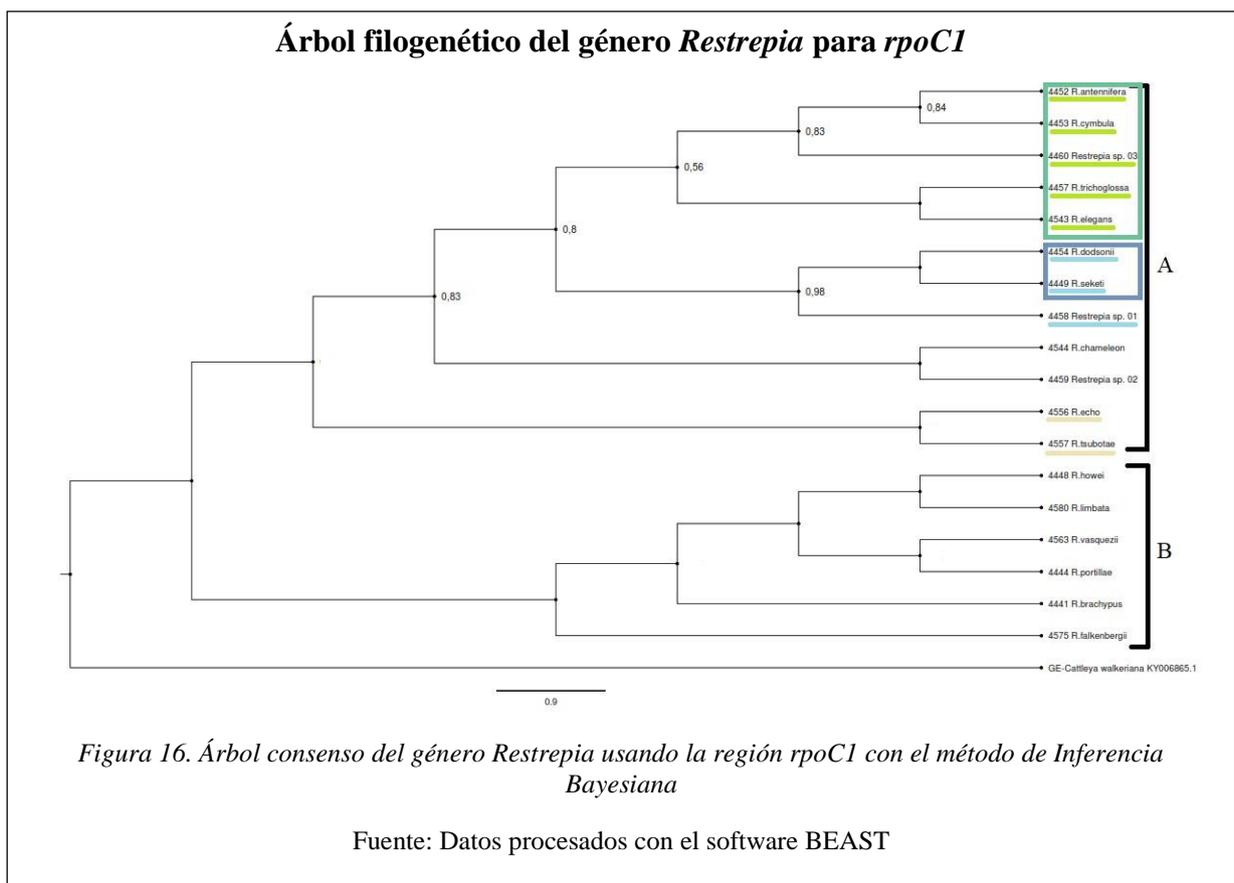
Con el marcador molecular *rpoC1* se obtuvieron dos árboles filogenéticos tanto con el método de IB como con el de MV. Se usaron 19 secuencias: una secuencia de la base de datos de GenBank que nos sirvió como grupo externo, once del trabajo experimental de Endara & Ocaña (2022) y siete de nuestro muestreo.

Para el método de Inferencia bayesiana se usó el modelo JC, ya que es un modelo sencillo que asume la misma frecuencia para los cuatro nucleótidos y un único tipo de sustitución donde el número de parámetros de JC será el número de longitudes de rama del árbol (Jukes & Cantor, 1969). Además, utilizó un número de generación de árboles de 10000000. Las especies con este método de IB se unieron en dos grupos de los cuales se presenta en el Grupo A probabilidades posteriores altas como el clado que tiene una probabilidad posterior de 0,98 donde se encuentran

las especies *R. dodsoni*, *R. seketi* y *Restrepia* sp. 01, podemos notar aquí que tanto en los árboles *matK* como el árbol de *rpoC1* estas especies se agrupan entre sí, con lo que podemos decir que presentan cierta similitud entre ellas.

Otro clado que presenta una probabilidad posterior alta, de 0,56, que agrupa las especies de *R. antennifera*, *R. cymbula*, *Restrepia* sp. 03, *R. trichoglossa*, *R. elegans*. También podemos notar que en este grupo con una probabilidad posterior baja se agrupan las especies *R. echo* y *R. tsubotae*.

El Grupo B con una probabilidad posterior baja, se considera que sus agrupaciones *Restrepia* no son robustas, por lo cual las agrupaciones en este grupo no son muy fiables (Figura 16).



Para el método de Máxima verosimilitud se usó el modelo JC (Figura 17) con un bootstrap de 500.

Modelo evolutivo

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)
JC	35	1802,901	1572,268	-750,901	n/a	n/a	0,50	0,250	0,250	0,250
T92	37	1806,708	1562,924	-744,202	n/a	n/a	0,63	0,285	0,285	0,21
JC+G	36	1807,842	1570,633	-749,070	n/a	0,80	0,50	0,250	0,250	0,25
JC+I	36	1808,548	1571,339	-749,423	0,45	n/a	0,50	0,250	0,250	0,25
K2	36	1810,595	1573,386	-750,447	n/a	n/a	0,63	0,250	0,250	0,25
T92+G	38	1811,942	1561,583	-742,517	n/a	0,85	0,63	0,285	0,285	0,21
T92+I	38	1812,708	1562,349	-742,901	0,44	n/a	0,63	0,285	0,285	0,21
K2+G	37	1815,789	1572,005	-748,742	n/a	0,83	0,63	0,250	0,250	0,25
K2+I	37	1816,498	1572,713	-749,097	0,45	n/a	0,63	0,250	0,250	0,25
JC+G+I	37	1816,804	1573,020	-749,250	0,00	0,78	0,50	0,250	0,250	0,25
T92+G+I	39	1820,900	1563,967	-742,695	0,00	0,85	0,63	0,285	0,285	0,21
HKY	39	1823,479	1566,546	-743,985	n/a	n/a	0,63	0,285	0,284	0,20
K2+G+I	38	1824,747	1574,388	-748,920	0,00	0,83	0,63	0,250	0,250	0,25

Figura 17. Modelo evolutivo proporcionado por el programa MEGA

Fuente: Datos obtenidos del software MEGA

Las especies con el modelo de MV (Figura 18) se unieron en dos grupos donde los valores del soporte estadístico fueron muy bajos, exceptuando el Grupo A en donde se encuentran las especies *R. seketi*, *R. dodsonii* y *Restropia sp. 01* con un soporte estadístico de 55, que se agrupan de igual forma en el modelo con el método de IB, notando que *R. seketi* y *R. dodsonii* se vuelven a agrupar como en los árboles de *matK* lo que reafirma la agrupación correcta de estas especies.

También en este Grupo A, se encuentran las especies *R. echo* y *R. tsubotae* con un soporte estadístico de 94, por lo cual podríamos decir que presentan cierta similitud entre sí. Además, en este grupo con una probabilidad posterior baja las especies de *R. antinnifera*, *R. trichoglossa*, *R. elegans* se siguen agrupando entre sí, tanto con este método como con el de IB.

El Grupo B al tener un soporte estadístico muy bajo no son fiables para poder realizar un correcto análisis.

Árbol filogenético del género *Restrepia* para *rpoC1*

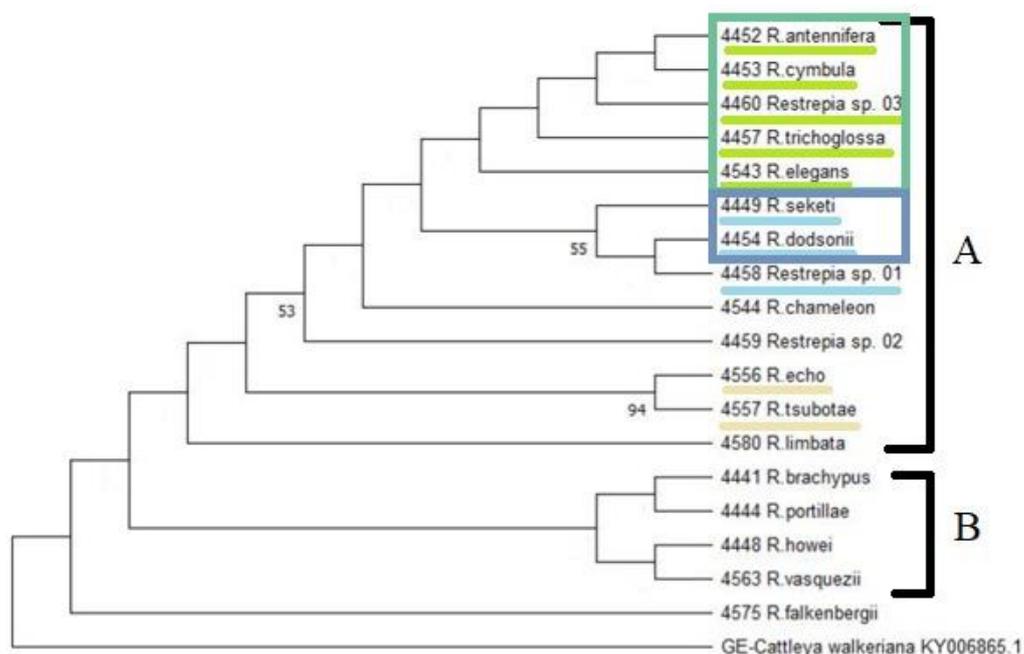


Figura 18. Árbol consenso del género *Restrepia* usando la región *rpoC1* con el método de Máxima verosimilitud

Fuente: Datos procesados con el software MEGA

El presentar una baja robustez tanto para el método de IB como con el de MV podría deberse a que la región *rpoC1* no es discriminativa para diferenciar las especies del género *Restrepia*. y según Cruz et al. (2011), este marcador no presenta mayor variación para este género de estudio.

También es importante destacar que no se encuentran secuencias del género *Restrepia* en la base de datos de GenBank, por lo que no fue posible comparar las secuencias de *rpoC1* obtenidas en este trabajo, que vendrían a ser un aporte nuevo para esta base de datos, una vez que se realice un segundo análisis con las secuencias reverse y forward que nos ayudarán entre los heterocigotos y partes de la secuencia con mala calidad.

Solo con las especies de *R. seketi* y *R. dodsoni* pudimos analizar su agrupación tanto con *matK* y *rpoC1*, ya que fueron las únicas secuencias que coincidían con estos marcadores, las demás

secuencias que se encontraban con ambos marcadores no formaron agrupaciones similares en los árboles de *matK* y *rpoC1* para poder analizarlas.

Hay que mencionar que tanto para las secuencias de *matK* como de *rpoC1* con los métodos de IB como de MV se presentaron árboles con valores muy bajos en los clados, esto debido a que existía una señal de secuencia ruidosa lo que provocó que la asignación de bases sea ambigua en algunos puntos de la secuencia, siendo los picos muy anchos o no muy definidos, como los mostrados en el **Anexo 3** (Applied Biosystems, 2000; CCIB, 2014). Otra posibilidad es que haya muy poca información dentro del alineamiento, como es el caso cuando se utiliza un fragmento de ADN demasiado conservado como *matK* o que no presenta mucha variación como *rpoC1*, por lo que las secuencias serían demasiado similares entre sí y no se podría concluir mucho a partir de valores de Bootstrap tan bajos (Riehl, 2016).

Realizando una comparación entre los árboles podemos notar que algunas especies se agrupan de la misma manera tanto en los árboles de *matK* y *rpoC1* por lo que podríamos decir que a pesar de usar diferentes marcadores moleculares estas especies presentan una relación entre sí formando grupos como las especies *R. antennifera* y *R. elegans* que en cada árbol forman grupo, en el de *rpoC1* con el método de IB en el grupo A que está conformado por el clado con una probabilidad posterior de 0,56 y que agrupa a las especies *R. antennifera*, *R. cymbula*, *Restrepia sp. 03*, *R. trichoglossa* y *R. elegans* y en el árbol realizado con el método IB de *matK* en el Grupo D en el clado con una probabilidad posterior baja el cual está conformado *R. antennifera*, *R. citrina*, *Restrepia sp.*, *R. gutulatta extra big xxxxx* y *R. elegans*, NCBI-*R.citrina*, NCBI-*R.elegans*, NCBI-*Restrepia sp.* y NCBI- *R. antennifera*. Cabe destacar que tanto con *rpoC1* y con *matK* las especies de *R. elegans* y *R. antinnifera* tanto de nuestra investigación como de la base de datos de GeneBank, junto con sus especies asociadas, se agrupan en ambos árboles.

Por lo tanto, podríamos agrupar a estas especies según lo propuesto por Luer & Restrepo (1996) que en su clasificación subgenérica, las agrupa en el subgénero *Restrepia* sección *Restrepia* que está compuesto de *R. antennifera* y todas sus afiliadas, este subgénero contiene todas las especies del género excepto dos especies excepcionales que han sido segregadas en subgéneros monotípicos. Todas las especies del subgénero *Restrepia* están estrechamente relacionadas y son básicamente similares, se caracterizan por un pedúnculo alargado, más o menos flexible, que lleva la flor por encima de la mitad, cerca o más allá del ápice de la hoja.

Las únicas dos especies conocidas que se desvían significativamente de las demás son *R. aberrans* y *R. chocoensis*, cada una aislada en un subgénero monotípico (C. A. Luer & Restrepo, 1996), al no contar con secuencias correspondientes a estas dos especies tanto de *matK* como de *rpoCl*, resulta complicado el poder identificar si las demás especies de *Restrepia* pertenecen a alguno de estos subgéneros monotípicos.

5 CONCLUSIONES

La modificación del proceso de trituración en el método de extracción de ADN de las muestras de tejido e especies del género *Restrepia*, ayudó a contar con óptimos resultados en el protocolo Doyle y Doyle (1987), por la obtención de bandas definidas a diferencia del proceso de trituración con pistilo y taladro, ya que al trabajar con muestras carnosas que poseen tejido parenquimático (reserva) en sus hojas se tiene muchos compuestos como lípidos, gránulos, almidón, cristales de proteína, etc., que influyen en la degradación del ADN.

El marcador molecular *matK* de acuerdo con los análisis y a las secuencias disponibles en la base de datos GenBank del género *Restrepia* resulta que no es adecuado ya que se caracteriza por ser demasiado conservado, lo que hace que la separación de especies en ocasiones se complique.

El marcador molecular *rpoCl* presenta cierta discriminación para la diferenciación del género *Restrepia*, al contrario de *matk*, pero no es tan eficaz ya que no presenta variaciones por lo cual no es tan adecuado para la identificación de especies de este género.

El análisis de georreferenciación se pudo realizar gracias a los datos obtenidos de la base de datos Tropicos.org. Missouri Botanical Garden, lo cual permitió delimitar las zonas de distribución del género *Restrepia*, presentando mayor abundancia en Colombia.

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda la continuación del trabajo experimental y del análisis molecular de otros marcadores para el género *Restrepia*, con el fin de lograr obtener una clasificación y descripción del género *Restrepia* mucho más amplia y correcta, y de esa manera generar una biblioteca de genes de esta especie.

Para la recolección de muestras vegetales del género *Restrepia* se recomienda mantener una cadena de frío, inclusive en los procesos posteriores de extracción y productos de PCR con el fin de mantener la integridad del ADN el mayor tiempo posible y evitar problemas a la hora de la secuenciación.

En el proceso de secuenciación y análisis de las secuencias, es recomendable tener tanto la secuencia forward como la reverse con el fin de tener un soporte en el momento en que se encuentren problemas de asignación de bases, y de esa manera corroborar la información y limpiar de manera correcta las secuencia, a la vez se recomienda la utilización del Qubit para cuantificar la calidad de ADN y no se presenten problemas en la secuenciación.

Para futuros trabajos de identificación de este género se recomienda tener las secuencias de las especies *R. aberrans*, *R. chocoensis* y *R. antennifera* ya que nos pueden ayudar al momento de asociarlas a los subgéneros descritos por Luer & Restrepo (1996) cuando se agrupan en los árboles filogenéticos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- 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 - Sede Quito.
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y Purificación de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (Primera, pp. 1–25). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Applied Biosystems. (2000). Sequencing Chromatogram Data. In *Automated DNA Sequencing* (pp. 739–743). Applied Biosystems. <https://ampliconexpress.com/wp-content/uploads/2014/04/DNASequencingGuide.pdf>
- Bautista, P. (2011). *Análisis químico de las fragancias producidas por las orquídeas Prosthechea varicosa y Prosthechea karwinskii para la identificación de compuestos volátiles*. Instituto Politécnico Nacional.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2008). *Bioquímica* (Sexta Edición). Editorial Reverté, S.A.
- Bolívar, A., Rojas, A., & García, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.
- CCIB. (2014). *Secuenciación de ADN de Sanger: solución de problemas*. Secuenciación de Sanger. https://dnacore.mgh.harvard.edu/new-cgi-bin/site/pages/sequencing_pages/seq_troubleshooting.jsp
- Chase, M., Cameron, K., Freudenstein, J., Pridgeon, A., Salazar, G., van den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of *Orchidaceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 177(2), 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>
- Chávez, F. (2015). *Extensión al proceso de simulación de poblaciones virales en secuencias genéticas, usando la programación paralela CUDA* [Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas]. <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/9112/2015-05-17%20Tesis%20ENTREGADA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Checa, A., Santillan, O., & Andrade, A. (2020, November 25). *Método de extracción: Extracción de ADN plasmídico (Lisis alcalina modificado)*. Biología Celular. <https://conogasi.org/articulos/metodo-extraccion-de-adn-plasmidico-lisis-alcalina-modificado/>
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants: Cronquist, Arthur : Free Download, Borrow, and Streaming : Internet Archive*. New York: Columbia University Press. <https://archive.org/details/integratedsystem0000cron/page/n1287/mode/2up>
- Cruz, M. (2011). Análisis filogenético de los subgéneros *Persea* y *Eriodaphne* (*Persea*; *Lauraceae*) mediante secuencias de ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto. [Universidad Autónoma de Chapingo]. En *Proceedings VII World Avocado Congress 2011* (Issue Junio). <https://docplayer.es/14906029-Universidad-autonoma-chapingo.html>

- Cruz, M., Barrientos, A., Rodríguez, J., & Reyes, J. (2011). *Análisis filogenético de los subgéneros Persea y Eriodaphne (Persea, Lauraceae) usando secuencias de ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales Del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242.
- Downie, S., Katz, D., Rogers, E., Zujewski, H., & Small, E. (1998). Multiple independent losses of the plastid *rpoC1* intron in *Medicago (Fabaceae)* as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Botany*, 76(5), 791–803. <https://doi.org/10.1139/CJB-76-5-791>
- Endara, A., & Ocaña, M. (2022a). *Identificación molecular de las especies registradas en el Ecuador del género Restrepia (Orchidaceae) mediante el sistema DNA BARCODE*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Endara, A., & Ocaña, M. (2022b). *Identificación molecular de las especies registradas en el Ecuador del género Restrepia (Orchidaceae) mediante el sistema DNA BARCODE*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Fernandez, D., Garzon, C., Yáñez, M., González, D., Mena, J., Tobar, F., & Freire, E. (2018). Orquídeas Y Bromelias De La Provincia De El Oro. En *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Fonseca, D., Mateus, H., & Contreras, N. (2010). *Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicación en Genética Básica* (Primera). Editorial Universidad del Rosario.
<https://books.google.com.ec/books?id=vG3FdDU0nC4C&pg=PA11&dq=EXTRACCION+DE+ADN&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiK--iTl6D7AhWrRzABHX-yAD4Q6AF6BAGGAI#v=onepage&q=EXTRACCION%20DE%20ADN&f=true>
- Freuler, M. (2008). *Orquídeas*. Editorial Albatros.
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=SjFbL4qd9-MC&oi=fnd&pg=PA7&dq=morfologia+orquideas&ots=07h_GwlNSx&sig=JqkUngk2bYGd6Pa8NUIMZStH2KE&redir_esc=y#v=onepage&q=morfologia+orquideas&f=false
- Gauta, L. (2020). *Aptitud Forestal a lo Largo del Gradiente Altitudinal en el Municipio de Cécota de Velasco, Norte De Santander*. Trabajo de Grado, en Ingeniería Agroforestal]. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD.
- Gómez, J. (2004). Estado Mérida. En *Geo Venezuela* (Vol. 6, pp. 484–561).
- Gutiérrez, R., & Mosquera, H. (2001). Diversidad y distribución de orquídeas en el departamento del Choco. *Sociedad Colombiana de Orquideología*, 5(3), 248–253.
- Irungaray, G., Monzón, J., Ibarra, R., & Cabrera, G. (2018). Ecosistemas de Guatemala basado en el Sistema de Clasificación de Zonas de Vida. En *Instituto de Investigación y Proyección sobre Ambiente Natural y Sociedad (Iarna) y Universidad Rafael Landívar (URL)* (42nd ed.).
- Iza, M. (2018). *Identificación molecular de especies de orquídeas del género Dracula, mediante el sistema Barcode*. Universidad Politécnica Salesiana .

- Jukes, T., & Cantor, C. (1969). Evolution of Protein Molecules. En *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press.
- Kamba, J., & Ranjan, C. (2018). A new simple and efficient DNA extraction protocol for orchid without liquid nitrogen and phenol. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 19(3 & 4), 143–147.
- Kress, W., & Erickson, D. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2761–2762. www.ctfs.si.edu/doc/index.php
- Lee, K., Kwon, K., Kang, W., Jeon, E., & Jang, J. (2012). Identification and analysis of the chloroplast *rpoCI* gene differentially expressed in wild ginseng. *Journal of Pharmacopuncture*, 15(2), 20–23. <https://doi.org/10.3831/KPI.2012.15.2.020>
- Lee, S., Lun, W., Mahat, M., Nazre, M., & Mohamed, R. (2016). DNA Barcoding of the *Endangered Aquilaria (Thymelaeaceae)* and its application in species authentication of agarwood products traded in the market. *PLoS ONE*, 11(4), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154631>
- Lu, H., Liu, Z., & Lan, S. (2019). Genome Sequencing Reveals the Role of MADS-box Gene Families in the Floral Morphology Evolution of Orchids. *Horticultural Plant Journal*, 5(6), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2019.11.005>
- Luer, C. (1996). Icones Pleurothallidarum XIII. Systematics of *Restrepia*. En *Monographs in Systematic Botanic from Missouri Botanical Garden* (59th ed.). <https://doi.org/10.5962/bhl.title.149317>
- Luer, C. A., & Restrepo, E. (1996). Icones pleurothallidarum XIII. Systematics of the genus *Restrepia* (Orchidaceae). *Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden* 59, 13, 1–168.
- Luer, C., & Restrepo. (1996). Icones Pleurothallidarum XIII. Systematics of *Restrepia*. En *Monographs in Systematic Botanic from Missouri Botanical Garden*. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.149317>
- Martínez, M. (2005). Estado Táchira. En *Geo Venezuela* (Vol. 7, pp. 128–241).
- Mazo, L. (2011). *Evaluación y comparación de 3 protocolos de extracción y amplificación del ADN contenido en exsiccados de orquídeas conservadas en colección de herbario*. Pontificia Universidad Javeriana-Bogotá.
- Meneses, C., Vanessa, L., Murillo, R., & Soto, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*, 16(49), 116–121.
- Millner, H., Bachman, S., & Baldwin, T. (2020). An assessment of the conservation status of *Restrepia* (Orchidaceae) reveals the threatened status of the genus. *Plant Ecology & Diversity*, 13, 1–49.
- 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>

- Millner, H., McCrea, A., & Baldwin, T. (2015). An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany*, 102(3), 487–494. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400555>
- MINAM. (2019). Mapa Nacional de Ecosistemas del Perú - Memoria Descriptiva. En *Ministerio del Ambiente*.
- Mongrovejo, L., & 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>
- Moya, I., Meneses, I., & Sarmiento, J. (2015). *Historia Natural de un valle en Los Andes: La Paz Segunda edición en español* (I. Moya, I. Meneses, & J. Sarmiento, Eds.; 2nd ed.).
- Musharof Hossain, M. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - An overview. *Fitoterapia*, 82(2), 102–140. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>
- Neubig, K., Whitten, W., Carlsward, B., Blanco, M., Endara, L., Williams, N., & Moore, M. (2009). Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: A plastid gene more variable than *matK*. *Plant Systematics and Evolution*, 277(1–2), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0105-0>
- OrchidRoots. (2022). *OrchidRoots. Restrepia* Species. <https://orchidroots.com/?role=pub>
- Paz, A., Gonzalez, M., & Crawford, A. (2011). Códigos de barras: Introducción y Perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3), 161–176. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v16n3/v16n3a11.pdf>
- Phillips, W., Rodríguez, H., & Fritz, P. (1995). Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. Con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). En *Marcadores de ADN: Teoría Aplicaciones y Protocolos de Trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (Theobroma cacao)*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza .
- Pridgeon, A. M., & Stern, W. L. (1983). Ultrastructure of Osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 70(8), 1233–1243. <https://medium.com/@arifwicaksanaa/pengertian-use-case-a7e576e1b6bf>
- Rey, F., & Capdevielle, F. (2020). Aplicación del código de barras de ADN (DNA Barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. *INNOTEC*, 1(20), 117–138. <https://www.redalyc.org/journal/6061/606163454009/html/>
- Riehl, T. (2016, June 29). *If I have low bootstrap values in a ML tree, does it mean that there is no separation between different genera?* Research Gate . <https://www.researchgate.net/post/If-I-have-low-bootstrap-values-in-a-ML-tree-does-it-mean-that-there-is-no-separation-between-different-genera#:~:text=Low%20bootstrap%20values%20indicate%20that,are%20ambiguous%20or%20too%20diverse>

- Roberts, D., & Dixon, K. (2008). Orchids. *Current Biology*, 18(8), 325–329. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.026>
- Rodríguez, I., & Barrera, H. (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *CIENCIA UANL*, 7(3), 323–335.
- Sarma, H., Pradhan, S., Mattaparthi, V., & Kaushik, S. (2019). Phylogenetic Analysis: Early Evolution of Life. In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* (Vols. 1–3, pp. 938–952). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20171-4>
- Senna, C. (2020). *Detergentes IBI SCIENTIFIC*. Científica Senna. <https://www.cientificasenna.com/producto/detergentes-ibi/#:~:text=SDS%20tambi%C3%A9n%20se%20utiliza%20para,de%20prehibidaci%C3%B3n%20y%20%2F%20o%20hibridaci%C3%B3n>
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (Primera, pp. 53–73). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Singer, R. (2010). MORFOLOGÍA FLORAL Y POLINIZACIÓN DE ORQUÍDEAS: EL SEGUNDO LIBRO DE CHARLES DARWIN Floral Morphology and Pollination in Orchidaceae : Charles Darwin ' s Second Book. *Acta Biológica Colombiana*, 14, 337–350.
- Sosa, V. (2009). El árbol de la vida. *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 60(4), 44–53.
- Swarts, N., & Dixon, K. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3), 543–556. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp025>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Masatoshi, N., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739. https://watermark.silverchair.com/msr121.pdf?token=AQECAHi208BE49Oan9kKhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAsMwggK_BgkqhkiG9w0BBwagggKwMIICrAIBADCCAqUGCSqGSIB3DQEHTAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMjx3Xdb7m7WynGS
- Tejeda, O., Téllez, M., & Escobar, J. (2017). Estado de conservación de orquídeas silvestres (*Orchidaceae*). *Agroproductividad*, 10(6), 3–12. <https://core.ac.uk/download/pdf/249320802.pdf>
- Téllez, M. (2011). *Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México SINAREFI Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura*.
- Thermo Scientific. (2018). *Thermo Scientific O'GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use*. www.thermoscientific.com/onebio
- Wang, X., Yang, S., Niu, Z., Xue, Q., Zhu, S., Sun, Liu, W., & Ding, X. (2017). The complete plastome sequences of four orchid species: Insights into the evolution of the *Orchidaceae* and the utility of plastomic mutational hotspots. *Frontiers in Plant Science*, 8(715), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00715>

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2008). Microbiología Molecular. En *Koneman: Diagnóstico microbiológico* (Sexta Edición, pp. 145–146). Editorial Médica Panamericana .

8 ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación del ADN

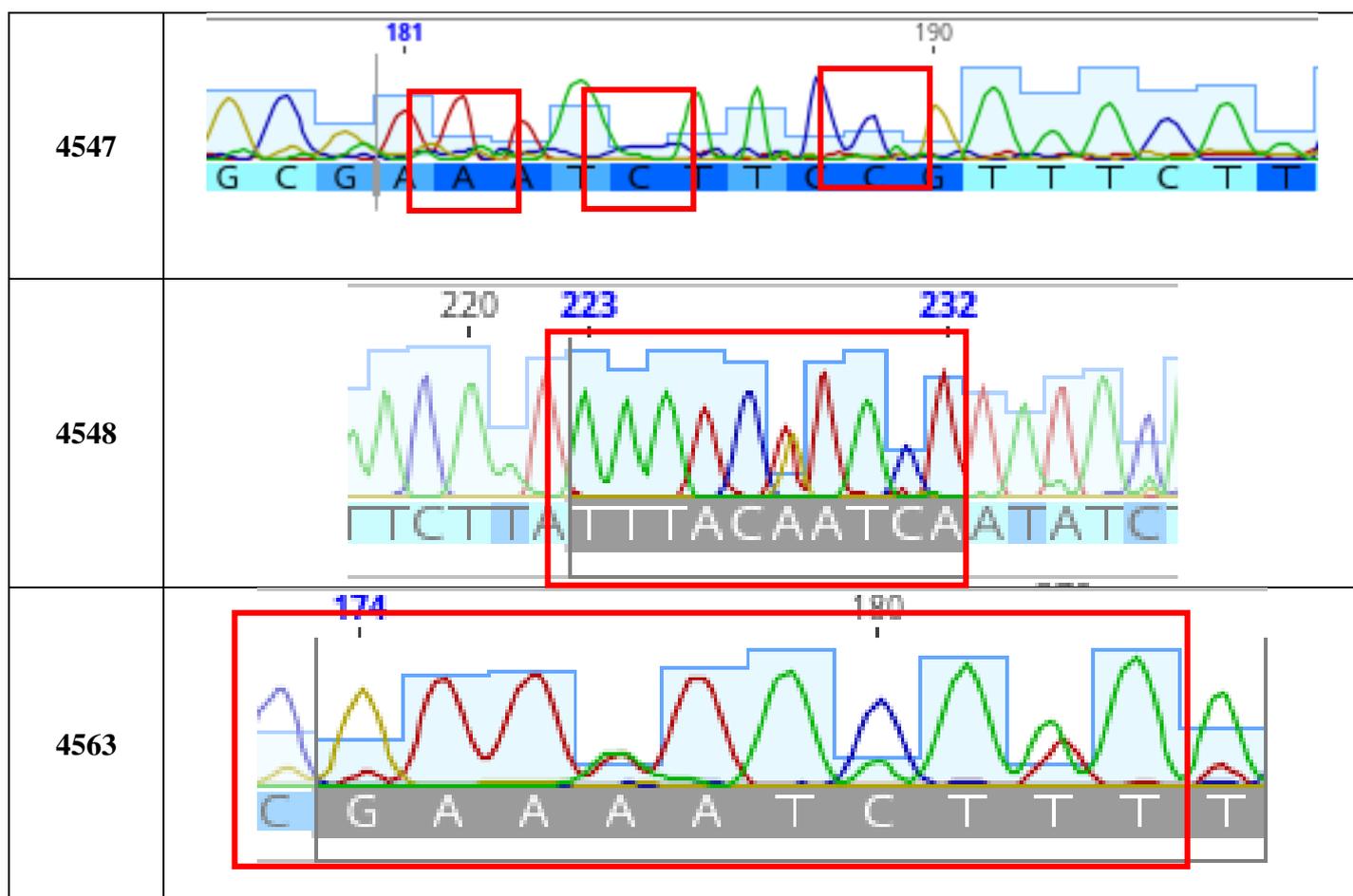
Número de muestra	Nombre científico	Código de Colección	Extracción de ADN	Amplificación	
				<i>matk</i>	<i>rpoC1</i>
1	<i>R. fritillina</i> Luer & V.N.M.Rao	4541	Si	Si	Si
2	<i>R. sanguinea</i> Rolfe	4542	Si	Si	Si
3	<i>R. elegans</i> H.Karst.	4543	Si	Si	Si
4	<i>R. chameleon</i> Luer & R.Escobar	4544	Si	Si	Si
5	<i>R. nittiorhyncha</i> (Lindl.) Garay	4545	Si	Si	Si
6	<i>R. escobariana</i> Luer	4546	Si	Si	Si
7	<i>R. metae</i> Luer	4547	Si	Si	Si
8	<i>R. jesupiana</i> Luer	4548	Si	Si	Si
9	<i>R. roseola</i> Luer & R.Escobar	4549	Si	Si	Si
10	<i>R. pelyx</i> Luer & R.Escobar	4550	Si	Si	Si
11	<i>R. echo</i> Luer & R.Escobar	4556	Si	Si	Si
12	<i>R. tsubotae</i> Luer & R.Escobar	4557	Si	Si	Si
13	<i>Restrepia citrina</i> Luer & R.Escobar	4558	Si	Si	Si
14	<i>R. howei</i>	4559	Si	Si	
15	<i>R. vasquezii</i> Luer	4563	Si	Si	Si
16	<i>R. aristulifera</i> Garay & Dunst.	4567	Si	Si	Si
17	<i>R. tabeae</i> H.Mohr	4570	Si	Si	Si
18	<i>R. chocoensis</i> Garay	4573	Si	Si	Si
19	<i>R. falkenbergii</i> Rechb.f.	4575	Si	Si	Si
20	<i>R. limbata</i> Luer & R.Escobar	4580	Si	Si	Si
21	<i>R. cuprea</i> Luer & R.Escobar	4581	Si	Si	Si
22	<i>R. Gutulatta extra big xxxxx</i>	4561	Si	Si	No
23	<i>R. Gutulatta extra big xxxxx</i>	4562	Si	Si	No
24	<i>R. Brachypus yellow #1</i>	4582	Si	Si	Si
25	<i>Restrepia sp.</i>	4583	Si	Si	Si
26	<i>Orchidea sp</i>	4584	Si	Si	Si
27	<i>Restrepia sp.</i>	4585	Si	Si	Si

Anexo 2. Secuencias del Genbank del género *Restrepia* y el outgroup de la región *matK* y *rpoC1*

#	Especie	Código
1	<i>Restrepia elegans</i> voucher ORDNA00179 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MT518739.1
2	<i>Restrepia citrina</i> voucher ORDNA00789 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MT518738.1
3	<i>Restrepia citrina</i> voucher ORDNA00759 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MT518737.1
4	<i>Restrepia brachypus</i> voucher ORDNA00292 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MT518736.1
5	<i>Restrepia antennifera</i> voucher ORDNA00803 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MT518735.1
8	<i>Restrepia</i> sp. Vo21 isolate AD7LJ60 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MF349936.1
9	<i>Restrepia muscifera</i> voucher Rodrigues 512 (SP) tRNA-Lys (<i>trnK</i>) gene, partial sequence; and maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	KT709651.1
10	<i>Restrepia muscifera</i> isolate DB9208 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	KP012449.1
11	<i>Restrepia trichoglossa</i> isolate JBL-02309 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	KP012448.1
14	<i>Restrepia muscifera</i> voucher FP 3921 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	EU214438.1
15	<i>Dracula alcithoe</i> voucher 4055 maturase K (<i>matK</i>) gene, partial cds; chloroplast	MN615347.1
16	<i>Cattleya walkeriana</i> voucher Or-66 RNA polymerase beta subunit (<i>rpoC1</i>) gene, partial cds; chloroplast	KY006865.1

Anexo 3. Problemas de secuenciación de ADN en algunas de las muestras

Código de Colección	Problema
4546	



Anexo 4. Ubicación geográfica de las especies del género *Restrepia*

Especie	N.	Latitud	Longitud	Lugar
<i>R. fritillina</i> Luer & V.N.M.Rao	1	4.847774	-75.798052	Colombia - Risaralda
<i>R. sanguinea</i> Rolfe	2	5.083394	-75.506748	Colombia
	3	3.8811	-72.8667	Colombia
<i>R. elegans</i> H.Karst.	4	4.891667	-73.281667	Colombia - Boyacá
	5	15.478278	-90.379646	Guatemala - Cobán
	6	3.880864	-76.564906	Colombia - Cauca
	7	-	-75.430165	Perú - Acuzazú
	8	3.8811	-72.8667	Colombia
	9	7.0758	-65.9119	Venezuela
	10	7.0758	-65.9119	Venezuela
	11	3.90111	-73.07333	Colombia
<i>R. chameleon</i> Luer & R.Escobar	12	7.122449	-66.169564	Venezuela
	13	7.838276	-73.194102	Colombia - Norte de Santander
	14	8.037285	-73.307272	Colombia - Norte de Santander

<i>R. nittiorhyncha</i> (Lindl.) Garay	15	8.231209	-73.31435	Colombia - Norte de Santander
<i>R. escobariana</i> Luer	16	5.246106	-76.136569	Colombia - Risaralda
<i>R. metae</i> Luer	17	4.162646	-75.882558	Colombia - Cauca
<i>R. jesupiana</i> Luer	18	8.548822	-71.382797	Venezuela - Mérida
<i>R. roseola</i> Luer & R.Escobar	19	8.149849	-71.853202	Venezuela - Tachira
	20	6.210432	-75.540509	Colombia - Antioquia
<i>R. pelyx</i> Luer & R.Escobar	21	6.028358	-75.433268	Colombia - Antioquia
	22	8.600829	-71.391672	Venezuela - Mérida
	23	8.613306	-71.21398	Venezuela - Mérida
	24	6.099621	-73.711262	Colombia - Santander
<i>R. echo</i> Luer & R.Escobar	25	6.330674	-77.354599	Colombia - Choco
	26	6.330674	-77.354599	Colombia - Choco
	27	6.330674	-77.354599	Colombia - Choco
	28	6.330674	-77.354599	Colombia - Choco
<i>R. tsubotae</i> Luer & R.Escobar	29	6.032232	-76.141032	Colombia - Antioquia
<i>Restrepia citrina</i> Luer & R.Escobar	30	8.466964	-73.257764	Colombia - Norte de Santander
	31	8.482924	-73.226521	Colombia - Norte de Santander
<i>R. vasquezii</i> Luer	32	4.668052	-74.10003	Colombia
	33	- 14.196209	-68.342699	Bolivia - Ucumari
	34	- 16.304627	-67.815054	Bolivia - Velo de la Novia
<i>R. aristulifera</i> Garay & Dunst.	35	7.916185	-72.020164	Venezuela - Queniquea
	36	7.560556	-72.576944	Colombia - Norte de Santander
	37	7.526209	-72.573426	Colombia - Entre Chinacota y Toledo
	38	7.409867	-72.408268	Venezuela - Tachira
<i>R. tabeae</i> H.Mohr	39	6.766554	-75.083363	Colombia - Antioquia
<i>R. chocoensis</i> Garay	40	5.255984	-76.825965	Colombia - Choco
<i>R. falkenbergii</i> Rchb.f.	41	6.565499	-75.950508	Colombia - Antioquia
	42	6.516297	-75.907781	Colombia - Antioquia
	43	6.513151	-75.889259	Colombia - Antioquia
<i>R. limbata</i> Luer & R.Escobar	44	5.185708	-76.012732	Colombia - Risaralda
<i>Restrepia cuprea</i> Luer & R.Escobar	45	6.552482	-76.246112	Colombia - Antioquia
	46	6.523831	-76.332629	Colombia - Antioquia
	47	6.604324	-76.336749	Colombia - Antioquia
	48	6.52656	-76.165087	Colombia - Antioquia

Anexo 5. Blastn de Restrepia sp.

Restrepia sp. Vo21 isolate AD7LJ60 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast

Sequence ID: [MF349936.1](#) Length: 812 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 596 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1094 bits(592)	0.0	594/596(99%)	0/596(0%)	Plus/Plus
Query 42	GGATCAAAGATGTTCTTCTTTGCATTTATTGCGATTGTTTTCCACGAATATCATAATT	101		
Sbjct 1	60		
Query 102	TCAATAGTCTCATTACTTCAAAGAAATCCATTTACGTCTTTTCAAAAAGAAAAGAAAGAT	161		
Sbjct 61	120		
Query 162	TCTTTGGGTTCTACATAATTCTTATGTATCTGAATGCGAATATCTATTCTGTTTCTTC	221		
Sbjct 121	180		
Query 222	GTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTCTTGAGCGAACACATT	281		
Sbjct 181	240		
Query 282	TCTATGGAAAAATAGAATATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATCTTTTCAGAGGATCTTAT	341		
Sbjct 241	300		
Query 342	GGTTCCTCAAAGATACTTTCATACATTATGTTTCGATATCAAGGAAAAGCAATTCTGGCTT	401		
Sbjct 301	360		
Query 402	CAAAAGGGACTCTTATTCTGATGAATAAATGGAAATTCATCTTGTGAATTTTGGCAAT	461		
Sbjct 361	420		
Query 462	CTTATTTTCACTTTTGGTTTCNACCTTATAGGATCCATATAAAGCAATTACCCAATTATT	521		
Sbjct 421 A	480		
Query 522	CTTTCTTTTTCTGGGGTATTTTCAAGTGTACGAAAAAATCCTTTGGTAGTAAGANATC	581		
Sbjct 481 A ...	540		
Query 582	AAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATACTCTGACTAAGAAATTAGATACCATA	637		
Sbjct 541	596		