



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

**REVISIÓN DEL GÉNERO *BOMAREA* DEL ECUADOR MEDIANTE INFORMACIÓN
MOLECULAR A TRAVÉS DEL SISTEMA BARCODE.**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

MATEO RODRIGO CALLATASIG MONTENEGRO

ROBERTO DARIO MIRANDA CADENA

TUTOR: MARCO FERNANDO CERNA CEVALLOS

Quito-Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Mateo Rodrigo Callatasig Montenegro con documento de identificación N° 1724083330 y Roberto Dario Miranda Cadena con documento de identificación N° 1719839357; 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, 1 de agosto del año 2023

Atentamente,



Mateo Rodrigo Callatasig Montenegro
1724083330

Roberto Dario Miranda Cadena
1719839357

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

Nosotros, Mateo Rodrigo Callatasig Montenegro con documento de identificación No.1724083330 y Roberto Dario Miranda Cadena con documento de identificación No. 1719839357, 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: “Revisión del género *Bomarea* del Ecuador mediante información molecular a través del sistema barcode”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero 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, 1 de agosto del año 2023

Atentamente,



Mateo Rodrigo Callatasig Montenegro
1724083330



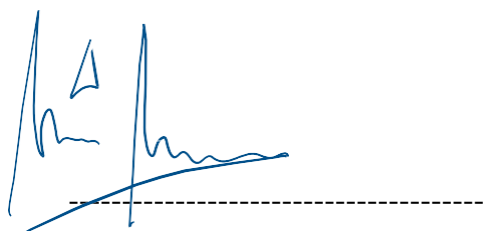
Roberto Dario Miranda Cadena
1719839357

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos con documento de identificación N° 0501872071, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: REVISIÓN DEL GÉNERO *BOMAREA* DEL ECUADOR MEDIANTE INFORMACIÓN MOLECULAR A TRAVÉS DEL SISTEMA BARCODE, realizado por Mateo Rodrigo Callatasig Montenegro con documento de identificación N° 1724083330 y por Roberto Dario Miranda Cadena con documento de identificación N° 1719839357, 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, 1 de agosto del año 2023

Atentamente,



Lic. Marco Fernando Cerna Cevallos, PhD.

0501872071

Dedicatoria

Quiero dedicar este logro principalmente a mis abuelitos Arturo y Carmela allá en el cielo, quienes desde un principio siempre confiaron en mí y no dudaron en que lograría culminar esta etapa de mi vida, esto es por y para ustedes, con mucho cariño de uno de sus nietos quien los va a añorar toda la vida.

A mis padres, Verónica y Rodrigo, por seguir conmigo y brindarme su apoyo incondicional ante cualquier adversidad y saber aconsejarme para mejorar cada día. A mis hermanos, Leonardo y Amelia, quienes me tienen como un ejemplo a seguir, no los voy a defraudar. A mis tíos, Wilfrido, Sonia, Gladys y Segundo por ser mi segunda familia y por sus palabras de aliento para llegar a donde estoy. Mis primos, Daniel, Oscar y Vanessa, por ser referentes en mi vida y demostrarme que todo se puede lograr con esfuerzo y perseverancia. A todos mis amigos de la universidad, colegio y colegas de laboratorio, de quienes me llevo lo mejor que he aprendido de cada uno de ellos, las experiencias vividas en esta travesía con todos las llevaré conmigo siempre.

Mateo Callatasig

Mi agradecimiento más sincero va para mis padres William y Norma, por cuidar de mi toda la vida, han sido mi más grande apoyo y los responsables de las mejores cosas en mí, gracias por brindarme todo su amor y soporte, sin ustedes no estaría cumpliendo este gran sueño. Son mi más grande inspiración y ejemplo a seguir, algún día quisiera llegar a ser tan buena persona como lo son ustedes, mi gratitud y amor será eterno para ambos.

A toda mi familia, mis hermanos Betty y Xavier, gracias por estar a mi lado y al igual que mis padres velar por mí bienestar, brindándome su alegría y protección, siendo siempre guías en mi formación, así como a mi abuelita Soledad que en paz descanse, a mi abuelita Fabiola y a mi tía Sandra muchas gracias por todo su amor y cariño.

Para Diana mi gran amor, gracias por brindarme tu cariño y comprensión en los buenos y malos momentos, has sido mi compañía y felicidad.

A mi compañero de tesis y gran amigo, gracias por confiar en mí y darme esta oportunidad. Además, les doy las gracias a mis amigos de la adolescencia y a aquellos que han compartido conmigo en la universidad, por su amistad, ayuda y apoyo incondicional. Y también a aquellos que ya no se encuentran entre nosotros, siempre perduraran en mis recuerdos.

Le agradezco a Dios por todo lo que tengo, por velar por toda mi familia, su obra y presencia en mi vida me han dado la fuerza para seguir adelante.

Roberto Miranda

Agradecimiento

Agradecemos a nuestro profesor y tutor Marco Fernando Cerna Cevallos, PhD., quien confió en nosotros para ser parte del grupo de investigación *Nunkui Wakan*, por brindarnos los conocimientos necesarios y experiencia en investigaciones para poder lograr la ejecución del trabajo sin complicaciones.

A la Ing. Elizabeth Yugsi, por ser una de las mejores docentes que hemos tenido, por su conocimiento y carisma, siendo una persona fundamental en la culminación de este proyecto y habernos enseñado lo bonito y difícil que puede llegar a ser la Biología Molecular, agradecemos a los demás colaboradores de los *Laboratorios de Ciencias de la Vida*, quienes supieron colaborarnos con su tiempo y gestión en las instalaciones para poder lograr nuestro objetivo.

A nuestras familias, quienes estuvieron desde un principio brindándonos su apoyo incondicional cada día de esta aventura y sabemos que en el futuro van a seguir con nosotros con los mismos ánimos de siempre.

A nuestros compañeros y amigos quienes fueron nuestra compañía durante las noches largas en el laboratorio y ayudarnos en todo lo posible con sus conocimientos, experiencia y tiempo, de todo corazón les agradecemos infinitamente.

Resumen

La familia Alstroemeriaceae cuenta con varios géneros entre los más conocidos son *Alstroemeria* y *Bomarea*, siendo el último género el que se encuentra distribuido por zonas de la cordillera de los Andes en su mayoría. En la presente investigación se realizó un estudio molecular de especies ubicadas en la región interandina del Ecuador. Las muestras vegetales colectadas en las provincias de Pichincha y Tungurahua, fueron procesadas para sus análisis moleculares. Se extrajo ADN con la técnica Doyle & Doyle y Kit comercial, en donde las muestras fueron amplificadas las regiones cloroplásticas *matK* y *ycf1* mediante la técnica de PCR convencional usando el kit *Platinum Direct PCR Universal Master Mix*, las secuencias utilizadas fueron obtenidas de la página web *Tropicos*. Para continuar con el proceso, se procedió a limpiar y alinear las secuencias, mediante el software *MEGA 11* se construyeron los árboles filogenéticos de los marcadores *matK*, *rbcL* y *rpoC1*, mientras que para el análisis biogeográfico se utilizó el programa *DIVA GIS* para demostrar la distribución y concentración de las especies del género *Bomarea* en la región interandina del Ecuador. Entre los resultados obtenidos se presentaron los 3 árbol filogenéticos con sus respectivos marcadores, en donde el árbol filogenético de *matK* presentó mayor discriminación entre los demás marcadores.

Palabras clave: Alstroemeriaceae, análisis molecular, *matK*, *ycf1*, filogenia

Abstract

The Alstroemeriaceae family has several genera, the best known of which are *Alstroemeria* and *Bomarea*, the latter being the genus that is mostly distributed in areas of the Andes Mountain range. In the present investigation a molecular study of species located in the inter-Andean region of Ecuador was carried out. Plant samples collected in the provinces of Pichincha and Tungurahua were processed for molecular analysis. DNA was extracted with the Doyle & Doyle technique and commercial kit, where the samples were amplified the chloroplastic regions *matK* and *ycf1* by conventional PCR technique using the *Platinum Direct PCR Universal Master Mix* kit, the sequences used were obtained from the *Tropicos* website. To continue with the process, the sequences were cleaned and aligned, the phylogenetic trees of the *matK*, *rbcL* and *rpoC1* markers were constructed using *MEGA 11* software, while for the biogeographic analysis the *DIVA GIS* program was used to demonstrate the distribution and concentration of the species of the *Bomarea* genus in the inter-Andean region of Ecuador. Among the results obtained, the 3 phylogenetic trees with their respective markers were presented, where the phylogenetic tree of *matK* showed greater discrimination among the other markers.

Keywords: Alstroemeriaceae, molecular analysis, *matK*, *ycf1*, phylogeny

Índice de contenido

1	Introducción	1
2	Marco teórico	4
2.1	Familia Alstroemeriaceae	4
2.2	Clasificación Taxonómica	4
2.3	Género <i>Bomarea</i>	5
2.3.1	Descripción Botánica	5
2.3.2	Distribución geográfica y hábitat	6
2.4	Identificación taxonómica y morfológica	7
2.5	Identificación molecular	7
2.6	Método BARCODE	8
2.7	Marcadores moleculares	9
2.7.1	Región <i>matK</i>	10
2.7.2	Región <i>ycfI</i>	10
2.8	Filogenia	10
3	Materiales y métodos	12
3.1	Recolección de muestras	12
3.2	Estudio molecular	12
3.2.1	Extracción ADN	12
3.2.2	Análisis cualitativo ADN	14
3.2.3	Amplificación ADN	15
3.3	Filogenia	16
3.4	Georreferenciación	16
4	Resultados y discusión	17
4.1	Colección de muestras	17
4.2	Estudio molecular	18
4.2.1	Extracción de ADN	18
4.2.2	Amplificación	21
4.2.3	Secuenciación	23

4.3	Filogenia	24
4.3.1	Análisis filogenético del gen <i>matK</i>	25
4.3.2	Análisis filogenético del gen <i>rbcL</i>	26
4.3.3	Análisis filogenético del gen <i>rpoC1</i>	28
4.3.4	Comparación filogenia <i>matK - rbcL</i>	29
4.3.5	Comparación filogenia <i>matK – rpoC1</i>	29
4.3.6	Comparación filogenia <i>rbcL – rpoC1</i>	29
4.4	Georreferenciación	30
5	Conclusiones	33
6	Recomendaciones	34
7	Bibliografía	35
8	Anexos	41

Índice de figuras

Figura 1 Filogenia de la familia Alstroemeriaceae.	5
Figura 2 Descripción botánica de una especie de <i>Bomarea</i> . Características principales de <i>Bomarea edulis</i>	6
Figura 3 Extracción de ADN protocolo modificado. Proceso detallado de la extracción de ADN por protocolo modificado.	14
Figura 4 Recolección de muestras. <i>Bomarea multiflora</i>	17
Figura 5 Extracción protocolo directo (Kit comercial). Resultados en gel de electroforesis al 1%.	19
Figura 6 Extracción protocolo modificado Doyle & Doyle (1987). Resultados en gel de electroforesis al 1%.	20
Figura 7 Amplificación del marcador <i>matK</i> . Visualización gel de electroforesis al 1%, con un tamaño de 750 pb y una concentración de >100ng/0.5ug.	22
Figura 8 Amplificación marcador <i>ycf1</i> . Visualización gel de electroforesis al 1%, con un tamaño de 1500 pb y una concentración de >50ng/0.5ug.	23
Figura 9 Electroferograma de la región <i>matK</i>	24
Figura 10 Electroferograma de la región <i>ycf1</i>	24
Figura 11 Árbol filogenético del género <i>Bomarea</i> de la región <i>matK</i> conformado por 7 grupos y el grupo externo <i>Colchicum doerfleri</i> y <i>Burchardia multiflora</i>	25
Figura 12 Árbol filogenético del género <i>Bomarea</i> de la región <i>rbcL</i> conformado por 5 grupos y el grupo externo <i>Rhipogonum album</i> y <i>Smilax glycohylla</i>	27
Figura 13 Árbol filogenético del género <i>Bomarea</i> de la región <i>rpoC1</i> conformado por 6 grupos y el grupo externo <i>Smilax herbacea</i> y <i>Trillium erectum</i>	28
Figura 14 Ubicación de las especies del género <i>Bomarea</i> distribuidas en el Ecuador.	31

Índice de tablas

Tabla 1 Componentes reacción PCR.....	15
Tabla 2 Condiciones PCR	16
Tabla 3 Especies del género Bomarea	17
Tabla 4 Resultados del análisis en Nanodrop de la extracción protocolo directo y modificado.	20

Índice de anexos

Anexo 1 Colecta de las especies vegetales del género <i>Bomarea</i> ¡Error! Marcador no definido.	
Anexo 2 Alineamiento de las secuencias de <i>rbcL</i>	42
Anexo 3 Alineamiento de las secuencias de <i>matK</i>	43
Anexo 4 Alineamiento de las secuencias de <i>rpoC1</i>	44
Anexo 5 Electroferograma de las secuencias del género <i>Bomarea</i>	45

1 Introducción

Los procesos para dar lugar a la biodiversidad han sido acontecimientos importantes en el continente como los cambios climáticos y el levantamiento de montañas, en América hay regiones megadiversas como los Andes el cual ha sido uno de los principales factores para el desarrollo de nuevas especies y hábitats, generando nuevas condiciones ambientales como la altitud, temperatura y la precipitación, dando como resultado una convergencia morfológica en clados distantemente relacionados (Alzate, Mort, et al., 2008; Tribble et al., 2022). Sin embargo, este tipo de regiones han sido poco estudiadas a diferencia de otras regiones mucho más templadas, por lo que no hay la información suficiente sobre historias evolutivas en la región de los Andes y es un reto lograr inferir filogenias detalladas y fiables principalmente por dichos eventos geológicos que han intervenido en los procesos evolutivos (Tribble et al., 2022).

Es por ello que a través del tiempo se han implementado códigos de barras de ADN, los cuales han contribuido con la caracterización e identificación de plantas y animales, mediante el uso de segmentos estandarizados de ADN (Jones et al., 2021). Estos sistemas de caracterización pueden contribuir con métodos de identificación morfológicos y taxonómicos, develando nuevas especies y facilitando la diferenciación de especies ya existentes a aquellos profesionales que se enfocan en este tipo de investigación (Sarmiento et al., 2020).

Esto se debe a que los códigos de barras permiten una rápida identificación de especies vegetales sin limitarse al estadio de las mismas, a diferencia de estudios morfológicos, los cuales pueden requerir de varios meses de trabajo de campo para obtener resultados concluyentes, además ayudan reducir los costos de investigación, ya que los análisis morfológicos por especie pueden llegar a ser altamente costosos a diferencia de las técnicas moleculares, las cuales tienen costos de secuenciación relativamente bajos por especie (Farooq et al., 2020).

La definición de los códigos de barras moleculares es la de ser secuencias de corta longitud ortólogas, pertenecientes a regiones específicas y estandarizadas del genoma, a las cuales se las puede separar y caracterizar de forma sencilla, estas pueden ser utilizadas como distintivos para diferenciar entre especies biológicas (Niizawa, 2020). El uso de secuencias de regiones cpDNA y nrDNA ITS en el género *Bomarea* siguen siendo débilmente respaldadas y se puede deber a las alteraciones ambientales, en donde sería necesario buscar fuentes alternativas de filogenética, como regiones de copia única pequeña o el uso de mtDNA (Alzate, Mort, et al., 2008).

La aplicación de códigos de barra genéticos, han permitido la implementación de bibliotecas genómicas referenciadas, las cuales cuentan con metadatos de muestra de especies analizadas, su uso puede incrementar la precisión de aplicaciones que están relacionadas a la identificación de especies basadas en ADN (Jones et al., 2021).

La familia Alstroemeriaceae es originaria de Sudamérica e incluye cuatro géneros: *Alstroemeria*, *Bomarea*, *Leontochir* y *Schickendantzia*. El género *Alstroemeria* es un grupo importante para cultivos ornamentales en todo el mundo, las primeras especies de *Alstroemeria* y *Bomarea* fueron descritas en Chile y se creía que *Alstroemeria* inicialmente pertenecía a la familia Amaryllidaceae basándose en la presencia del ovario inferior, posteriormente los análisis del cariotipo mediante técnicas de bandas cromosómicas determinaron las diferencias de Alstroemeriaceae y Amaryllidaceae, ya que citológica y morfológicamente los miembros de Alstroemeriaceae presentaban dos o tres cromosomas asimétricos, lo cual no se podía evidenciar en otro tipo de cariotipo de la familia de las Amaryllidaceae (Garbiso & Estrada, 2015; Hoshino, 2008).

Estas plantas tienen características favorables como un valor ornamental, una larga vida en macetas, variación en el color de las flores y un bajo consumo de energía para su cultivo, sin embargo, para el cultivo de *Alstroemeria* se han desarrollado procedimientos en base a la biotecnología como también en técnicas con cultivos convencionales (Hoshino, 2008). Las plantas del género *Bomarea*, al igual que las del género *Alstroemeria*, tiene importancia por su valor ornamental, al poseer bellas flores, otra característica importante, es que se ha descubierto que poseen propiedades antioxidantes, importantes para la elaboración de medicamentos preventivos contra el cáncer, arterioesclerosis, o problemas cardiovasculares (Fernández, 2010).

El género *Bomarea* se extiende en toda la región de los Andes subtropicales hasta las montañas centroamericanas, con altitudes que oscilan entre 1500 y 5200 m.s.n.m. (Hofreiter & Rodríguez, 2005). El género *Bomarea* es el más diverso de la familia Alstroemeriaceae, en donde se encuentran alrededor de 100 a 120 especies distribuidas desde México hasta Argentina y Chile en zonas neotropicales principalmente (Alzate, 2007).

Las relaciones filogenéticas están respaldadas a nivel de género, sin embargo, algunas ramas externas de los árboles filogenéticos de Alstroemeriaceae no se han logrado ramificar por la falta de regiones variables y no va a tener resultado en la ramificación a nivel de especies, para ese problema se necesita de mucha más información sobre la variabilidad entre Alstroemeriaceae a nivel molecular, así como la secuencia completa del genoma para la comprensión de su evolución (Kim et al., 2016).

Un factor que complica la taxonomía y la clasificación de *Bomarea*, es que los caracteres morfológicos utilizados para definir los grupos taxonómicos son en algunos casos muy variables dentro y entre poblaciones, sin embargo, la falta de estimación concreta de la filogenia del género, impide una evaluación exhaustiva de estas características para definir taxones a nivel de género en *Bomarea* (Alzate, Mort, et al., 2008; Jara & Urrutia, 2022).

Se ha considerado al Ecuador como uno de los países más megadiversos, por su abundancia de flora y fauna, sin embargo, no posee un control ambiental apropiado llevando a que sus recursos se

encuentren en peligro, es por esta razón, que la conservación genética de especies del género *Bomarea* es la manera más viable para evitar las amenazas, ya sean por factores antropogénicos o biológicos (Japa, 2021). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es identificar la filogenia del género *Bomarea* del Ecuador mediante análisis molecular ADN Barcode como aporte para la conservación de especies en peligro.

2 Marco teórico

2.1 Familia Alstroemeriaceae

La familia Alstroemeriaceae comprende alrededor de 200 especies entre cuatro géneros: *Bomarea*, con 120 especies en América Central y el centro-norte de Sudamérica; *Alstroemeria*, con 78 especies en el sur de Sudamérica y el este de Brasil; *Luzuriaga*, con tres especies en Chile y una en Nueva Zelanda; y *Drymophila*, con una especie en Australia y otra en Tasmania (Chacón, de Assis, et al., 2012). El clado hermano de las Alstroemeriaceae es la familia Colchicaceae, que cuenta con 200 especies en todos los continentes excepto Sudamérica (y la Antártida), y basándose en un análisis anterior a escala de Liliales, la familia de las Alstroemeriaceae podrían haber entrado en Sudamérica desde el sur (Chacón, de Assis, et al., 2012).

La mayoría de las especies de Alstroemeriaceae se encuentran en elevaciones de 2500 a 3800 m en los Andes, motivo por el cual existe una diversificación de la familia por la influencia de la Cordillera de los Andes (Hofreiter, 2007). Viven en una amplia variedad de hábitats, desde bosques nubosos hasta pantanos y zonas desérticas. Esta familia incluye dos géneros principales: *Alstroemeria L.* (50 especies) y *Bomarea Mirb.* (100 especies), las características en sus hojas son únicas en los miembros de la familia, sus flores son epíginas y casi siempre zigomorfas por el ángulo entre sus tépalos inferior y superior. Además, todos los miembros de la familia tienen anteras basifijas y raíces engrosadas para almacenar nutrientes y agua (Aagesen & Sanso, 2003). Las Alstroemeriaceae se encuentran entre las 28 familias de angiospermas compartidas entre Sudamérica, Nueva Zelanda y Australia (Chacón, de Assis, et al., 2012).

2.2 Clasificación Taxonómica

Los géneros de Alstroemeriaceae se han clasificado tradicionalmente, debido a su ovario inferior, como parte de las Amaryllidaceae sin embargo estudios sobre la filogenia de las monocotiledóneas, las Alstroemeriaceae son el grupo hermano de Colchicaceae junto a Luzuriagaceae (Hofreiter, 2008).

La familia Alstroemeriaceae se ha reclasificado como una familia ampliada compuesta por cuatro géneros y 204 especies, incluida la familia Luzuriagaceae en el sistema APG III (Kim et al., 2016).

Reino: Plantae

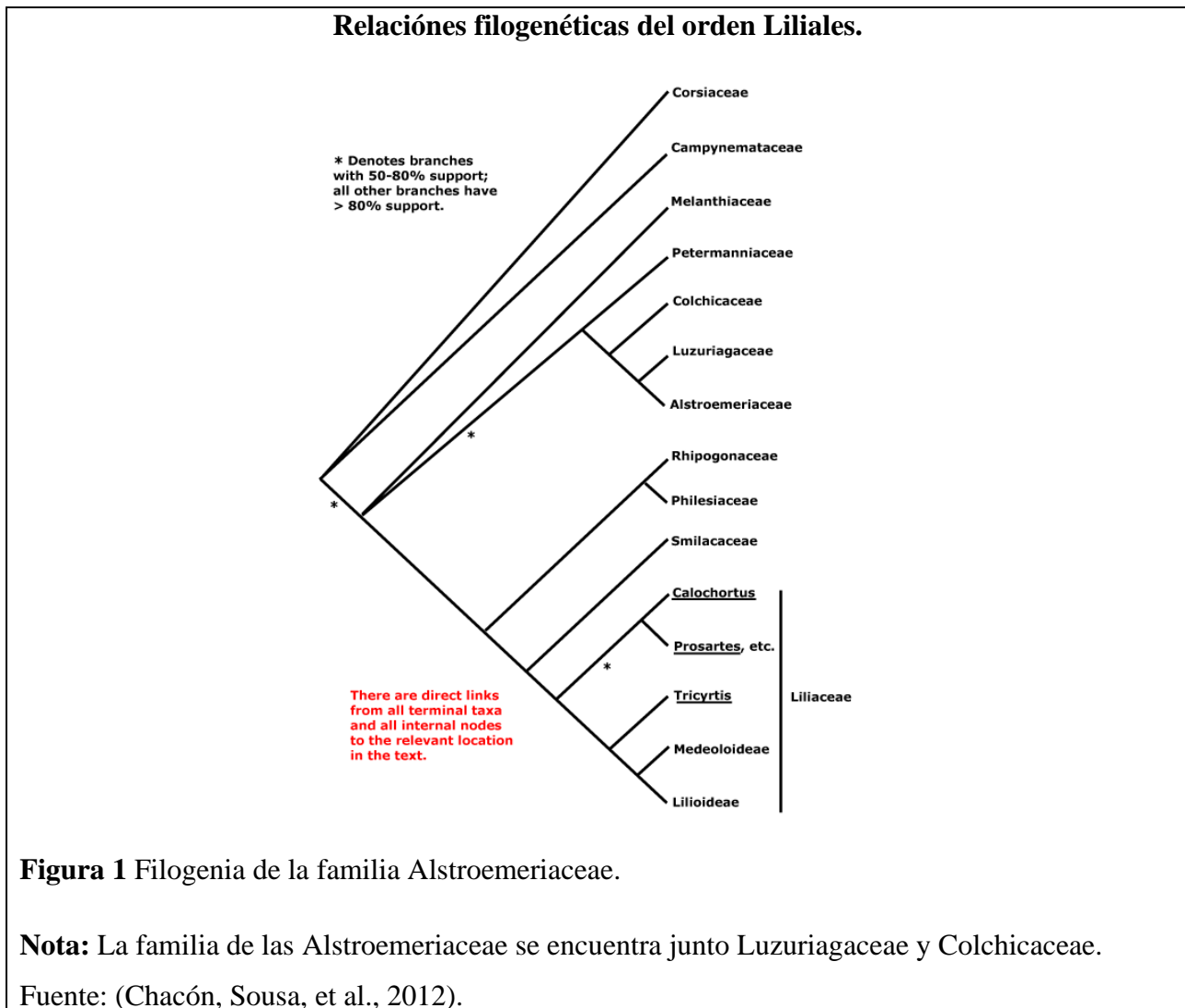
División: Angiospermae

Clase: Monocotyledoneae

Orden: Liliales

Familia: Alstroemeriaceae

Género: *Bomarea*



2.3 Género *Bomarea*

El género *Bomarea* cuenta con 100 a 120 especies distribuidas en zonas neotropicales de América del Sur y en gran medida se encuentran en zonas de la cordillera de los Andes y su continuación en América Central (Mohammad et al., 2015). Por sus características morfológicas el género *Bomarea* se divide en 4 subgéneros: *Baccata* (cinco spp.), *Bomarea s. str.* (c. 79 spp.), *Sphaerine* (12 spp.) y *Wichuraea* (18 spp). El subgénero *Bomarea* se caracteriza por un hábito generalmente enroscado, con flores péndulas y actinomorfas u orientadas horizontalmente y zigomorfas, tépalos caducos, ovario inferior, dehiscente y fruto coriáceo (Mohammad et al., 2015).

2.3.1 Descripción Botánica

Se caracterizan por tener flores péndulas y actinomorfas u orientadas horizontalmente y zigomorfas, tépalos caducos, ovario inferior y dehiscente, y fruto coriáceo, esta morfología ha sido caracterizada en diferentes grupos principales según sus inflorescencias y tépalos inferiores y exteriores (Mohammad et al., 2015).

Su sistema radicular lo conforman ejes filamentosos, los cuales forman nodos para el almacenamiento de nutrientes, el área de sus raíces cubren hasta 1.5 m de diámetro y 1 m de profundidad; sus tallos son volubles y no cuenta con ramificaciones aéreas y la mayoría de especies crecen gracias al apoyo de otras especies alcanzando hasta los 15 m de longitud y 1-15 mm de diámetro; cuenta con hojas simples, alternas, lineares, sus láminas foliares son ovadas, lanceoladas u obovadas, con longitudes entre hasta los 21 cm y hasta 10 cm de ancho, con una epidermis foliar la cual cuenta con una gruesa cutícula en el haz en algunas especies; presenta flores actinomorfas, zigomorfas, campanuladas y cuenta con tépalos libres, con pequeños pétalos; sus frutos presentan cápsula loculicida y sus semillas son globosas de color rojo o anaranjado cubiertas por una sarcotesta carnosa (Alzate, 2016; Camargo, 2012).

Descripción botánica de una especie de *Bomarea*.

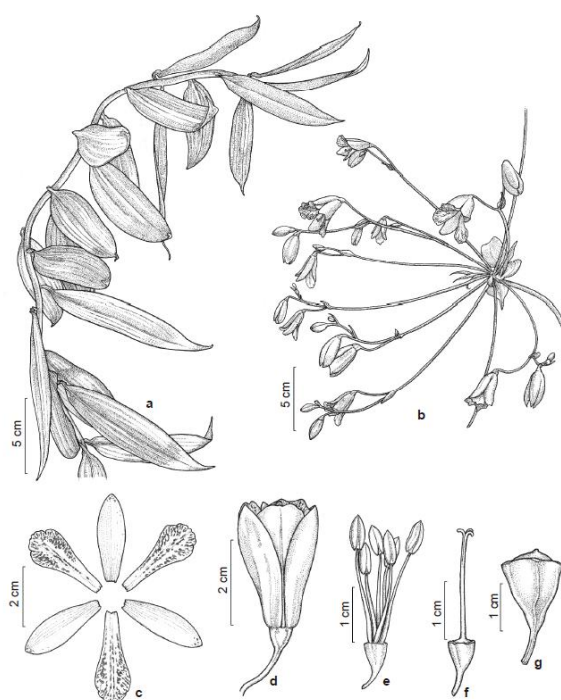


Figura 2 Descripción botánica de una especie de *Bomarea*. Características principales de *Bomarea edulis*.

Nota: a. hábito; b. inflorescencia; c. flor vista superior; d. flor vista lateral; e. androceo; f. pistilo; g. fruto

Fuente: (Koch, 2016).

2.3.2 Distribución geográfica y hábitat

Por su diversidad, el género *Bomarea*, se encuentra distribuida por bosques montanos bajos y montanos (2000 a 3500 m), con cantidades de humedad relativamente altas, este género no se encuentra comúnmente en zonas secas. Algunas especies de este género crecen en bosques tropicales

que se encuentran cerca al nivel del mar (Alzate, 2016). El género tiene una distribución desde México y las Antillas hasta el sur de América del Sur, con la mayoría de las especies concentradas en los Andes desde Colombia hasta Bolivia, sin embargo, es posible encontrar a *B. edulis* distribuida en las regiones selváticas de Brasil, siendo esta la única especie presente en dicho país (Koch, 2016).

Pueden encontrarse pocas especies del género *Bomarea* en valles interandinos o al pie de montañas amazónicas. *Bomarea* se encuentra comúnmente en zonas de luz, es decir, en zonas abiertas, claras o en el borde de los bosques (Alzate, 2016). Especies como *Bomarea linifolia* (Kunth) Baker pueden ser heliófitas en zonas del páramo y bosques altos andinos, entre otras especies que se encuentran en zonas de soto bosque donde hay escasa cantidad de luz (Alzate, 2016; Garbiso & Estrada, 2015).

2.4 Identificación taxonómica y morfológica

La identificación de especies vegetales requiere una serie de datos biológicos, los cuales en conjunto permiten obtener una idea clara del panorama de los distintos organismos, estos datos son: taxonómicos, genéticos, geográficos y de carácter, su relación nos permite tener una noción de la evolución de las especies y como estas han logrado sobrevivir en la naturaleza. Sin embargo, la taxonomía como tal, actúa como un enlace entre los otros tipos de conocimientos (Cornwell et al., 2019). Esta actúa no solo como una herramienta para la distinción de especies, sino que permite obtener valiosa información acerca de la biodiversidad (Costello, 2020).

A diferencia de la identificación molecular de organismos vegetales, en la identificación taxonómica es esencial poseer conocimientos fundamentados y especializados en taxones, por lo cual es una tarea que requiere de botánicos especializados que contribuyan con datos para la caracterización de especies vegetales. Por otra parte, los datos genéticos junto con los geográficos al presentar similitudes en sus procesos de conservación de la biodiversidad pueden ser almacenados en un mismo sitio (Cornwell et al., 2019).

La distinción de nuevas especies vegetales se puede dar por evaluación de características morfológicas, sin embargo, esto presenta limitantes de tiempo, costo y requieren de conocimientos especializados, a diferencia de la identificación molecular, las cuales hacen emplean loci en el genoma de las plantas, por lo cual son más específicos. También permiten comparar datos de investigaciones previas (Nyambura & Ang, 2019).

2.5 Identificación molecular

La aplicación de técnicas moleculares permite el análisis de ácidos nucleicos, y a su vez reconocer genotipos diferentes localizados en una misma especie (Diz, 2020). Para la identificación molecular de especies vegetales es necesario realizar una serie de pasos para lograr dicho objetivo, inicialmente es esencial que se pueda contar con un protocolo establecido que permita la obtención de ADN vegetal

de alta pureza, que sea aplicable a los siguientes pasos de amplificación y secuenciación (Velasco, 2005).

Luego de establecer un protocolo que cumpla con los requerimientos, es posible utilizar las muestras obtenidas para realizar un proceso de amplificación en un equipo termociclador. Pueden requerirse varios intentos antes de estandarizar un proceso idóneo de extracción de ADN, se debe considerar factores tales como: la humedad, la procedencia de las muestras, cantidad, hojas, esporas, entre otros (González, 2021).

Al momento de realizar la extracción de ADN vegetal, se deben tomar en cuenta ciertos aspectos que permitirán obtener resultados confiables y replicables, tales como seleccionar tejidos jóvenes que generen una mayor cantidad de ADN. El proceso de extracción debe pasar por las siguientes etapas: Lisis celular, remoción de proteínas, y finalmente la purificación del ADN (Rocha, 2002).

El proceso de amplificación de una secuencia específica de ADN se la realiza mediante el uso de la técnica de PCR, esta permite una caracterización específica de los ácidos nucleicos, pudiendo analizar biomoléculas presentes en una muestra, su funcionamiento consiste en la aplicación de oligonucleótidos, que al identificar una secuencia complementaria en el ADN se elonga mediante ADN Polimerasa (Tamay et al., 2013).

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, permite amplificar regiones específicas de ADN, haciendo uso de primers, los cuales son secuencias cortas de ADN que acotan la zona de amplificación, y son complementarios a dicha región (Diz, 2020).

2.6 Método BARCODE

El origen del método de Código de barras o Barcode se remonta al año 2003, siendo catalogada como una herramienta enfocada en la taxonomía, su importancia radica en su capacidad de identificar especies, frente a circunstancias limitantes en la morfología y conocimiento especializado en taxonomía (Yang et al., 2020), es un sistema aplicable para todo tipo de organismos, genes o segmentos de interés, por lo que su utilidad puede darse a nivel general en toda la biodiversidad (Tanabe & Toju, 2013), puede emplearse para otros fines, tal como conservación biológica, estudios ecológicos y de biodiversidad, medicina, farmacología y bioseguridad (Yang et al., 2020).

La identificación de especies haciendo uso de los códigos de barras tienen por base a una biblioteca de referencia, misma que proporciona la capacidad de distinguir secuencias de ADN de aquellos organismos que aún no han sido identificados, por medio de secuencias de taxones ya reconocidos (Grant et al., 2021). En la actualidad Barcode of Life Data Systems es la base de datos más grande para almacenar este tipo de información, sus archivos cuentan con más de nueve millones de códigos de barras, siendo una fuente de conocimiento en constante renovación (Grant et al., 2021).

Las secuencias de ADN empleadas en los códigos de barras son cortas y ortólogas, con una longitud que va de entre 400 a 800 pb de regiones estandarizadas del genoma, es posible aislar a estas secuencias y a su vez caracterizarlas con relativa facilidad para que actúen como etiquetas, cuya conformación va a estar dada por los 4 nucleótidos existentes, para que de esta forma se pueda identificar a los diversos organismos (Niizawa, 2020).

Los códigos de barras permiten diferenciar entre los diversos componentes de una planta tal como sus semillas, raíces, hojas, polen, entre otros y a su vez permite la distinción en los estadios ontogenéticos, lo que vendría a ser la forma de reproducción de la planta, la cual bien puede ser sexual o asexual. Es una herramienta para diferenciar entre géneros, por lo cual son sistemas aplicables a este tipo de investigaciones, los cuales buscan distinguir entre especies de plantas pertenecientes al género *Bomarea* (Niizawa, 2020).

Pese a que Barcode sea una herramienta importante para la identificación de especies, esta presenta ciertas limitantes en la identificación de organismos vegetales a diferencia de los códigos de barras aplicadas en animales o algunas especies fúngicas, debido a que en el caso de los genes mitocondriales, estos no pueden establecer la identificación en una gran extensión de taxones, principalmente por bajas tasas de variabilidad y diversidad en el genoma de este tipo de organismos, los cuales requieren de múltiples marcadores para poder generar un código de barras (Niizawa, 2020).

2.7 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares pueden ser empleados en diversas ramas de la biología tales como el estudio de la biodiversidad, medicina, ciencias forenses, entre otros. Pueden ser aplicados para la localización y aislamiento de secuencias de gran relevancia dentro de los diversos campos de la investigación, hoy en día existe una gran variedad de técnicas moleculares que brindan la posibilidad de determinar las proporciones de los genes encontrados en las poblaciones. Existen diversos tipos de marcadores, los cuales se diferencian por su capacidad de localizar polimorfismos en loci únicos o múltiples (Eguiarte et al., 2007).

Los marcadores moleculares empleados para la identificación de especies han sido tanto nucleares como mitocondriales, sin embargo en los últimos años se ha evidenciado que los marcadores cloroplásticos a diferencia de los marcadores mitocondriales, presentan menores inconvenientes al presentar una mayor tasa de mutaciones aleatorias y son más fáciles de amplificar, permitiendo establecer relaciones entre los distintos géneros y especies, para que de esa forma se puedan establecer estudios filogenéticos más específicos (Londoño, 2021).

Los marcadores más utilizados en la caracterización de especies vegetales, utilizando el sistema de barcoding son: *matK*, *rpoC1*, *rbcL*, *ycf1*, *ndhF*, *psaB* y *trnL-trnF*, los cuales se originan en las regiones del genoma cloroplástico, en el caso de los genes nucleares se encuentran: *ITS*, *XDH* y las

regiones pertenecientes a los genes mitocondriales son: *MATR*. La efectividad de los marcadores va a variar dependiendo de la especie vegetal en estudio (Londoño, 2021).

En el proceso de investigación se utilizarán genes plástidos, de forma más específica, los marcadores *matK* y *ycf1*, considerando que en la actualidad permiten una mayor efectividad en el proceso de identificación de especies (Fazekas et al., 2008).

2.7.1 Región *matK*

Maturasa K o (*matK*) es un marcador molecular que posee dos características únicas que lo hacen destacar en el campo de la biología molecular y la evolución, posee un ritmo evolutivo apresurado y su otra característica es que cuenta con una función putativa como un grupo II intron maturasa (Kar et al., 2015). Este gen está codificado por el cloroplasto que se encuentra anidado entre los exones 5' y 3' de *trnK*, ARNt-lisina, localizado en el genoma del cloroplasto, se diferencia de otros genes cloroplásticos, ya que posee un modo y ritmo evolutivo específico (Niizawa, 2020).

2.7.2 Región *ycf1*

Dentro del genoma cloroplástico, *ycf1* es el segundo gen de mayor tamaño, tiene como función codificar una proteína cuya composición es de unos 1800 aminoácidos, según estudios científicos, se llegó a determinar que este gen es imprescindible para la viabilidad de las plantas. Es un marcador de mayor variabilidad a comparación con *matK*, pese a no ser considerado inicialmente como un marcador idóneo para el sistema de código de barras debido a su gran tamaño, sin embargo, posee una característica muy prometedora, esta es la de su gran variabilidad, lo que es idóneo para el diseño de cebadores universales aplicable a especies vegetales que van desde las angiospermas, gimnospermas, monilófitas y briófitas (Dong et al., 2015).

2.8 Filogenia

La filogenia consiste en el estudio del desarrollo evolutivo que se da entre especies biológicas, permite establecer una base para la filogenética, ya que esta se encarga de relacionar a los organismos y establecer semejanzas y diferencias evolutivas. Por lo cual, es una herramienta valiosa para develar los cambios presentes en especies actuales, siendo esto posible mediante la implementación y análisis de árboles filogenéticos (Munjál et al., 2019).

Por lo tanto, los datos aportados de la construcción de los árboles filogenéticos, permite determinar cuál es la relación que presentan las especies que han ido evolucionando con el tiempo, además de reflejar posibles cambios taxonómicos, esto es posible de lograr mediante el análisis de los genes que se vayan a utilizar en la investigación (Arenas et al., 2009). Respecto de los análisis filogenéticos, nos es posible tomar acciones para la conservación de especies, ya que a través de estos se puede evaluar la distribución de especies en peligro de extinción, sin embargo los riesgos de extinción siempre estarán presentes afectando la sostenibilidad y la disponibilidad de los recursos de los

ecosistemas (Cheikh et al., 2020). Los estudios filogenéticos nos pueden proporcionar una forma novedosa de identificar especies de plantas, en comparación con las prácticas etnobotánicas casuales basadas en los taxones (Zaman et al., 2021).

Ahora, los análisis filogenéticos utilizan datos moleculares como ADN o proteínas; para seleccionar la molécula adecuada, los genes deben ser compartidos por todas las especies dadas y finalmente los genes deben tener una tasa de evolución adecuada, ya que las proteínas tienen una tasa de evolución variada. En los análisis filogenéticos, se utilizan secuencias homólogas que mantengan una similitud entre sí, este tipo de secuencias se logran detectar a partir de bases de datos de ADN o proteínas mediante programas como BLAST; finalmente se alinean las múltiples secuencias de tres o más secuencias biológicas, para que de esta forma generar arboles filogenéticos (Horiike, 2016).

Los programas bioinformáticos acumulan un conjunto de datos de características (rasgos alternativos) para analizar una serie de organismos relacionados. El fundamento de los árboles filogenéticos es que, para cada organismo o taxón, se compila un conjunto de características (o caracteres) en una matriz, que consta de T (Filas) x C (Columnas), donde T es el número de taxones y C es el número de caracteres. Cada carácter tiene dos o más tipos posibles de condición llamados estados, donde luego se construyen árboles para minimizar el número de cambios entre todos los estados para todos los caracteres entre todos los taxones y de igual manera el grupo externo se considera un taxón que está estrechamente relacionado con el grupo de interés, pero no forma parte de ese grupo (Staton, 2015).

3 Materiales y métodos

3.1 Recolección de muestras

El proceso de recolección de muestras vegetales pertenecientes al género *Bomarea*, fue realizado en la vía a El Triunfo cerca de Vizcaya localizado en la provincia de Tungurahua, en las coordenadas -1.360393, -78.407445. A una elevación de 2200 a 2300 m.s.n.m. La zona alberga un bosque nublado de gran humedad que posee una gran cantidad de biodiversidad, se encontró un gran número de ejemplares vegetales, consideradas como plantas epifitas. Se complementó la búsqueda de ejemplares en la vía Chiriboga en las coordenadas -0.266694, -78.724912 a una altura de 2100 m.s.n.m. y en la vía La Vaquería en las coordenadas -0.402807, -78.503957 a 2800 m.s.n.m. Se utilizó como guía de localización de las distintas especies del género *Bomarea*, la base de datos Trópicos, la cual permitió tener una referencia geográfica de especies verificadas.

Se consideró el estado de las especies vegetales recolectadas, colectando aquellas que poseían características idóneas, libres de enfermedades o irregularidades morfológicas tales como cortes o manchas divergentes al color de las mismas. El método de almacenamiento del material vegetal para extracción de ADN, se lo realizó utilizando bolsas de plástico ziploc llenas de arroz, aislando las muestras del ingreso de aire o humedad, en congeladora a -80°C o a su vez a -20°C evitando la fenolización de las muestras vegetales.

3.2 Estudio molecular

3.2.1 Extracción ADN

En el proceso de extracción de ADN, se realizaron observaciones de calidad de las muestras vegetales, consiguientemente se aplicaron reactivos para liberar el ADN; es necesario que el ADN presente la mayor pureza posible, por lo cual se probaron dos métodos de extracción: protocolo directo (*Platinum Direct PCR Universal Master Mix*), por el tiempo y agilidad del procedimiento de extracción; protocolo modificado Doyle & Doyle, en el cual se realizaron ajustes de cantidades y tiempo, debido a la cantidad de fenoles que pueden presentar las plantas del género *Bomarea*. Los resultados obtenidos de la extracción de ADN se analizaron mediante electroforesis horizontal y Nanodrop.

3.2.1.1 Protocolo directo (Kit comercial)

Para la extracción de ADN por método directo se lo realizó utilizando el kit de extracción comercial: *Platinum Direct PCR Universal Master Mix*, para el cual se procedió a tomar muestras vegetales de 0.5 cm de diámetro, depositándolas en microtubos *Eppendorf* de 1.5 mL, luego se añadieron 100 uL de buffer lisis para romper las membranas celulares y 3 uL de *proteínasa K* para digerir proteínas contaminantes. Rápidamente se maceran las muestras utilizando pistilos plásticos, permitiendo la ruptura de las paredes celulares y el ingreso de los componentes de lisis, una vez completadas las muestras se las dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido el periodo de reposo, se incubaron las muestras en un termobloque *Thermo Scientific* a 98°C durante 1 minuto, se transfirió las muestras a una centrifuga *Eppendorf 5430*, balanceando el peso para evitar la ruptura de los microtubos. Se centrifugó a 10000 rcf durante 3 minutos y se transfirió el contenido del sobrenadante a microtubos de 1.5 mL, posteriormente se añadió un volumen equivalente de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (CIA).

Posteriormente, las muestras fueron mezcladas por inversión de 5 a 8 veces y se centrifugaron a 12000 rpm durante 3 minutos, se retiraron las muestras y se procedió a rescatar la fase intermedia de cada microtubo, el valor de muestra rescatado fue de aproximadamente 60 a 80 uL, luego se agregó el doble del volumen rescatado con isopropanol frío alrededor de 120 a 160 uL y mezclando por inversión de 5 a 8 veces para luego almacenarlo en un congelador a -20°C durante una hora o toda la noche.

Luego de este periodo se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 3 minutos, para luego ser sometidas a un proceso de lavado del ADN utilizando etanol al 70%, en donde este proceso se repitió 3 veces a las mismas condiciones ya mencionadas. Finalmente se dejó secar las muestras a temperatura ambiente, una vez evaporado el etanol en su totalidad, el pellet fue resuspendido en 20 uL de agua libre de nucleasas.

3.2.1.2 Protocolo modificado Doyle & Doyle (1987).

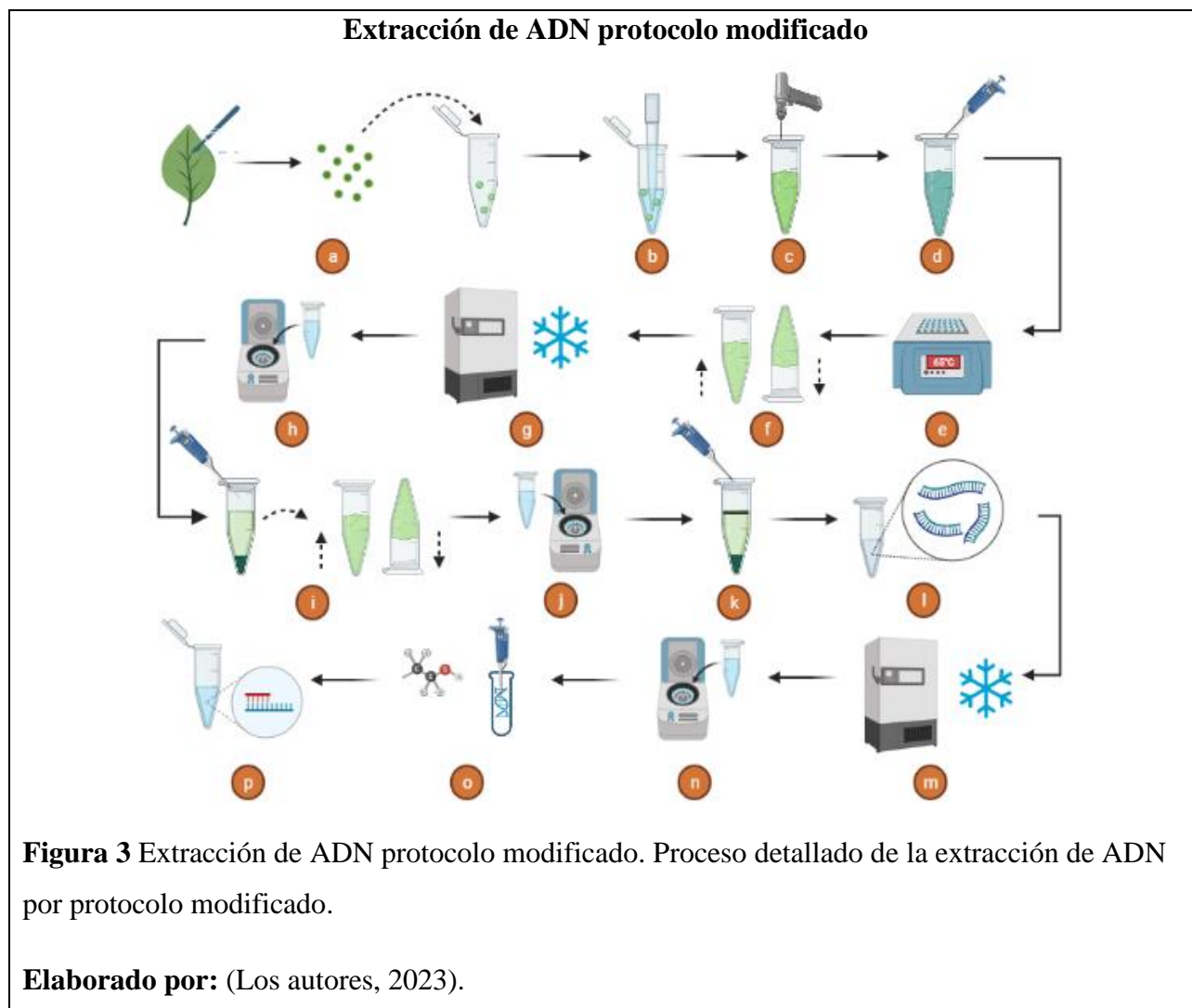
Con el protocolo de extracción de ADN convencional, se tomó como base al proceso planteado por Doyle & Doyle y modificado por Iza (2018), en el cual se realizaron cambios acordes a la especie vegetal utilizada, por lo tanto, se utilizaron 300 mg de las muestras vegetales (a) añadiéndoles 600 uL de buffer de lisis (100 mM Tris (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl) en tubos *Eppendorf* de 1.5 mL (b), posteriormente se maceraron las muestras utilizando pistilos plásticos estériles y el uso de un taladro (c). Una vez rota la pared vegetal se añadió 94 uL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y se sometió a las muestras a inversión de 5 a 8 veces (d).

Se transfirieron las muestras a un termobloque a 65°C y se las incubó durante 10 minutos (e), luego se añadieron 118.5 uL de acetato de potasio 5M y fueron mezcladas por inversión de 5 a 8 veces (f), posteriormente se almacenaron las muestras en un congelador a -20°C durante 1 hora (g). Pasado el tiempo necesario en congelación, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 5 minutos (h).

Se transfirió el sobrenadante a microtubos de 2 mL y se añadieron 600 uL de cloroformo-alcohol isoamílico (CIA) (24:1), se mezclaron por inversión de 5 a 8 veces (i) y nuevamente se centrifugaron las muestras a 13000 rpm por 5 minutos (j), se rescató la fase intermedia de forma cuidadosa a microtubos de 1.5 mL (k) en los cuales se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol frío (l), para luego almacenar las muestras en un congelador a -20°C durante 24 horas (m). Transcurrido un día, se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 3 minutos procediendo con un lavado del ADN (n),

utilizando 400 uL de etanol al 70%, en donde este proceso se repitió 3 veces a las mismas condiciones ya mencionadas (o).

Para que el resto del etanol se evapore de las muestras, se incubaron en un termobloque a 37°C aproximadamente por 20 minutos para poder cumplir con esta fase. Transcurrido el tiempo de secado, las muestras se resuspendieron en 20 uL de TE o agua libre de nucleasas (p).



3.2.2 Análisis cualitativo ADN

Para verificar la presencia o ausencia del ADN extraído, se realizó una electroforesis horizontal, luego se preparó un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, solución diluida a partir del buffer concentrado de TBE 10X (54 g Tris HCl; 27.5 g ácido bórico; 2.93 g EDTA 0.5 M; pH 8) en 1000 mL, a continuación se pesó 0.5 g de agarosa los cuales se añadieron en 50 mL de TBE 1X, para luego calentarlo en un microondas durante 30 segundos hasta la disolución de la agarosa en el buffer, a continuación se adicionó 0.2 uL de *Safe View*, se depositó el gel en el molde de la cámara de electroforesis con su peine, para luego poder cargar las muestras de ADN correspondientes. Después de unos minutos que el gel se gelifique, el molde fue colocado en la cámara de electroforesis *Labnet*

con TBE 1X hasta verificar que el gel de agarosa se encuentre cubierto por el buffer en su totalidad. En cada pocillo, se depositó la mezcla de 5uL de ADN más 2 uL de tampón de carga “*Blue Juice*”. En el caso de productos de PCR se cargaron directamente las muestras, utilizando 5 uL del amplicón sin tampón de carga, ya que la master mix ya la contiene. Para verificar el tamaño y concentración de ADN extraído, se adicionó 2 uL del marcador de peso molecular *O’GeneRuler Express DNA Ladder* el cual tiene un tamaño de 100 a 5 000 pb, según el protocolo detallado en Thermo Scientific (2019). La cámara de electroforesis se programó a 100 voltios por 30 minutos. Finalmente, los resultados se visualizaron en un fotodocumentador de la marca *Bio-imagin systems*.

3.2.3 Amplificación ADN

Se amplificaron las regiones cloroplásticas *matK* y *ycf1* con la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, utilizando el kit *Platinum Direct PCR Universal Master Mix* de Thermo Scientific (2019), la cual se preparó para un volumen final de 20 uL, con los componentes de la reacción de PCR descritos en la Tabla 1. La región *matK* se amplificó con: primer forward *matK* 2.1 (ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC) y primer reverse *matK* 2.1 (GTTCTAGCACAAGAACTCG); mientras que la región *ycf1* se amplificó con: primer forward *ycf1* (TGAACGAATGGAAAACTGGTT) y primer reverse *ycf1* (GCTGTGTCGTGCAATGGWTT), la amplificación se la realizo en el equipo *Proflex Thermal Cycler* con las condiciones descritas en la Tabla 2.

Tabla 1 Componentes reacción PCR

Componentes	<i>matK</i>	<i>ycf1</i>
	20 uL de reacción	
Platinum Direct PCR Universal Master Mix	10 uL	10 uL
Primer forward	0.5 uL	0.5 uL
Primer reverse	0.5 uL	0.5 uL
DMSO	0.5 uL	0.5 uL
ADN	2 uL	2 uL
Agua PCR	6.5 uL	6.5 uL
Volumen final	20 uL	20 uL

Nota: Componentes de la reacción para *matK* y *ycf1*.

Fuente: (Thermo Scientific, 2019).

Tabla 2 Condiciones PCR

Etapa	<i>matK</i>	<i>ycf1</i>	Tiempo	Ciclos
	Temperatura (°C)	Temperatura (°C)		
Desnaturalización inicial	94	94	2 min	1
Desnaturalización	94	94	15 s	40
Alineamiento	53.5	58.7	15 s	
Extensión	68	68	40 s	
Extensión final	68	68	1 min	1
Mantenimiento	4	4	∞	

Nota: Condiciones de PCR para las regiones *matK* y *ycf1*.

Fuente: (Thermo Scientific, 2019).

3.3 Filogenia

Las secuencias se utilizaron de la base de datos GENE BANK de los marcadores *matK* y *rbcL*: para el marcador *rpoCl*, se utilizaron secuencias registradas por Sánchez (2020). Las secuencias se importaron al programa *MEGA 11* y se eliminó el ruido de fondo, a continuación, se procedió a alinear las secuencias con la opción *MUSCLE*, para la elaboración de los árboles filogenéticos. Para la construcción de los árboles se utilizó en método de *Maximum likelihood* con 1 000 réplicas.

3.4 Georreferenciación

Para la georreferenciación de las ubicaciones de las muestras de *Bomarea*, se utilizó el programa *DIVA GIS*, en donde se ingresó la ubicación en el Ecuador a través de coordenadas geográficas de su colecta, cabe señalar que se tomó como referencia datos en bases de datos de internet como es el caso de la página web *Tropicos*.

4 Resultados y discusión

4.1 Colección de muestras

Los tejidos foliares del género *Bomarea* empleados en el estudio, fueron encontrados en las provincias de Pichincha y Tungurahua, en las vías Quito - Chiriboga y El Triunfo - Patate, además se emplearon muestras en conservación pertenecientes al herbario de la Universidad Politécnica Salesiana, dando una totalidad de 9 muestras utilizadas en los análisis.

Recolección de Muestras



Figura 4 Recolección de muestras. *Bomarea multiflora*.

Nota: Muestra floral y foliar de *Bomarea*

Fuente: (Los autores, 2023).

Tabla 3 Especies del género *Bomarea*

Código de Colección	Nombre Científico	Sitio de Colecta
4115	<i>Bomarea multiflora</i>	Provincia de Tungurahua Vizcaya
4130	<i>Bomarea patinii</i>	Provincia de Pichincha Amaguaña Vía La Vaquería
4702	<i>Bomarea multiflora</i>	Provincia de Tungurahua Patate Vía El Triunfo
4388	<i>Bomarea linifolia</i>	Provincia de Tungurahua Patate Vía El Triunfo
4390	<i>Bomarea linifolia</i>	Provincia de Pichincha Amaguaña Vía La Vaquería
4707	<i>Bomarea multiflora</i>	Provincia de Tungurahua Vizcaya

4100	<i>Bomarea caldasii</i>	Provincia de Pichincha Amaguaña Vía La Vaquería
4099	<i>Bomarea caldasii</i>	Provincia de Tungurahua Patate Vía El Triunfo
4127	<i>Bomarea multiflora</i>	Provincia de Tungurahua Patate Vía El Triunfo

Elaborado por: (Los autores, 2023).

4.2 Estudio molecular

4.2.1 Extracción de ADN

Para el proceso de extracción de ADN se realizaron 2 métodos diferentes, protocolo directo *Platinum Direct PCR Universal Master Mix* y protocolo modificado de Doyle & Doyle, (1987).

Los resultados obtenidos de las 9 muestras analizadas con el protocolo directo se pueden observar en la Figura 5, de igual manera los resultados de la extracción mediante el protocolo modificado en la Figura 6. Se pudo visualizar la integridad de las bandas de ADN correspondiente al tamaño esperado > 5000 pb gracias al marcador de peso molecular *O'GeneRuler Express DNA Ladder* de la marca Thermo Scientific (2019).

En la Figura 5 se pueden observar bandas débiles en las muestras 4115 y 4230; o ausencia de bandas en las muestras 4388, 4390, 4100, 4702, 4127, 4099 y 4121, esto se debe a la baja concentración de ADN que se obtiene con el kit de extracción rápida, según Thermo Scientific (2019) recomienda cargar un mínimo de 0.1 a 0.2 ug de muestra de ADN por milímetro de ancho de pocillo del gel.

Extracción protocolo directo (Kit comercial)

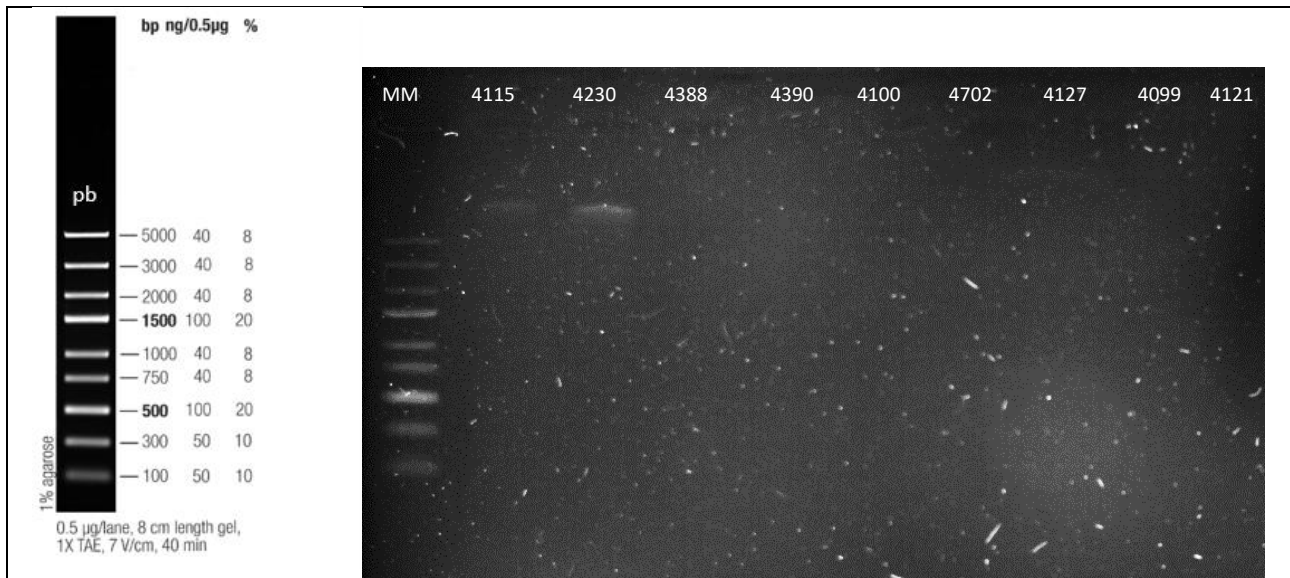


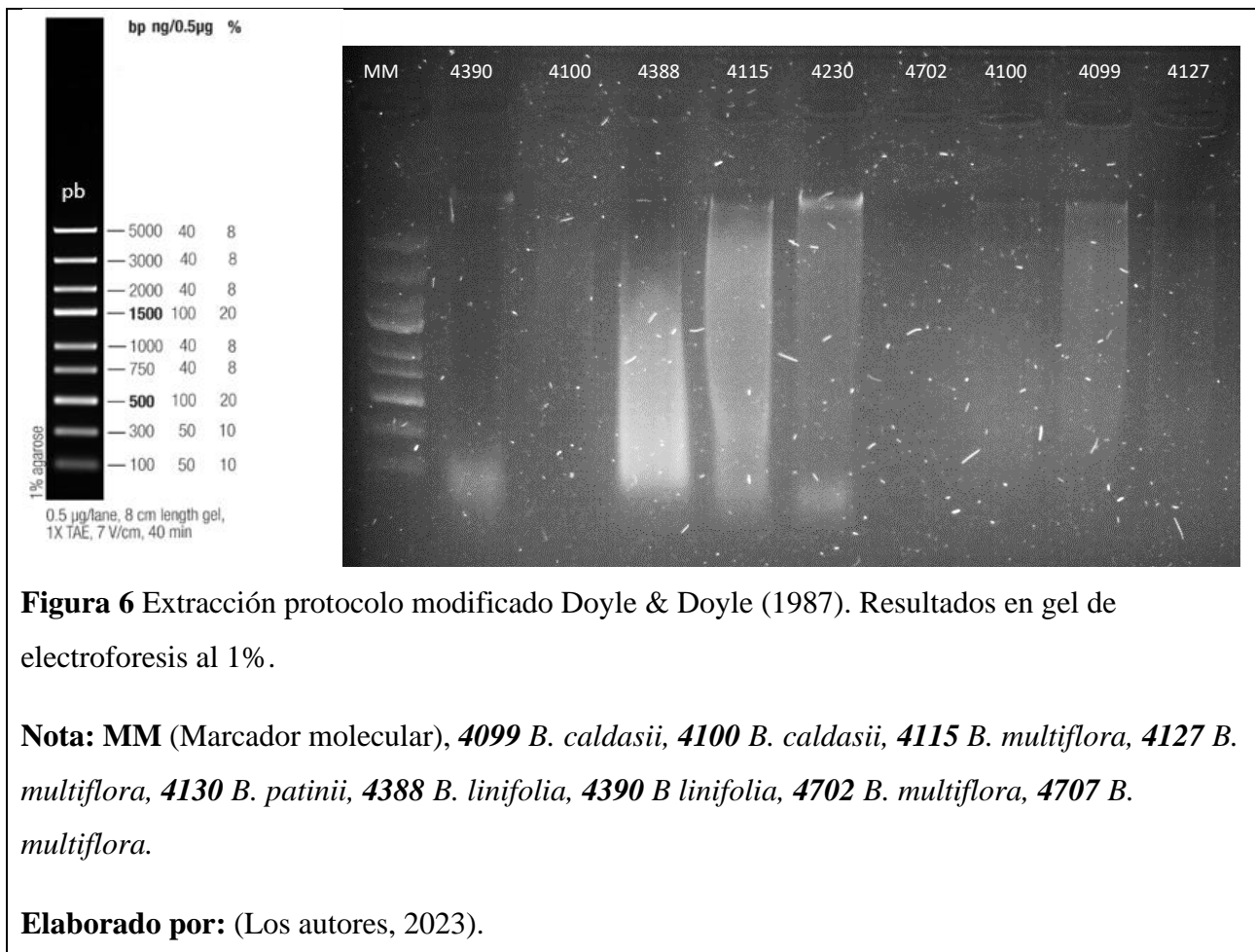
Figura 5 Extracción protocolo directo (Kit comercial). Resultados en gel de electroforesis al 1%.

Nota: MM (Marcador molecular), **4099** *B. caldasii*, **4100** *B. caldasii*, **4115** *B. multiflora*, **4127** *B. multiflora*, **4130** *B. patinii*, **4388** *B. linifolia*, **4390** *B. linifolia*, **4702** *B. multiflora*, **4707** *B. multiflora*.

Elaborado por: (Los autores, 2023).

En los resultados obtenidos mediante el protocolo modificado, se puede evidenciar la presencia de barrido en las muestras 4388, 4115 y 4320. Se debe principalmente por los compuestos fenólicos presentes en las hojas que a menudo dificultan la extracción de ADN, afectando la calidad y pureza del ADN mostrando barridos (Martida & Pharmawati, 2019). Como se puede observar en la Figura 6.

Extracción protocolo modificado Doyle & Doyle (1987).



De igual manera se realizó una cuantificación de la extracción de ADN para los dos métodos realizados, mediante el equipo Nanodrop en donde se pudo notar diferencias entre los dos métodos como se puede observar en la Tabla 4. Según Mazo et al. (2013) si hay una concentración de ADN menos de 10 ng (extracción baja, protocolo ineficiente, cantidad de tejido insuficiente); entre 11 y 30 ng (extracción aceptable y protocolo más eficiente) y de 31 ng en adelante (extracción óptima, protocolo muy eficiente y cantidad suficiente de tejido), mientras que las relaciones de absorbancia de 260/280 y 260/230, si son valores inferiores a 1.8 (mala calidad y contaminación por proteínas); entre 1.8 y 2.2 (buena calidad, libre de contaminación) y superior a 2.2 (mala calidad, contaminada por ARN, polifenoles y polisacáridos).

Tabla 4 Resultados del análisis en Nanodrop de la extracción protocolo directo y modificado.

Muestra	Protocolo directo (Kit comercial)			Protocolo modificado Doyle & Doyle		
	ng/uL	A 260/280	A 260/230	ng/uL	A 260/280	A 260/230
4115	55.4	1.87	1.95	165.1	1.60	0.97
4230	56.8	1.63	2.01	99.3	1.51	0.90
4708	50.5	1.78	2.33	114.8	1.83	1.09

4388	61.2	1.88	1.96	198.8	1.44	1.12
4390	31.7	1.74	1.89	90.8	1.84	1.19
4707	62.0	1.73	1.76	189.0	1.61	1.08
4100	92.0	1.68	1.83	165.0	1.66	0.96
4099	49.3	1.81	1.90	195.2	1.54	0.84
4127	65.1	1.63	1.77	116.4	1.52	1.04

Elaborado por: (Los autores, 2023)

Los mejores resultados obtenidos fueron con el protocolo directo, con la absorbancia de 260/280 promedio de 1.75 (1.63 - 1.88) y en relación de la absorbancia de 260/230 un promedio de 1.9 (1.77 – 2.33). Estos valores se asemejan a los estudios de Nath et al. (2022), en donde la absorbancia de 260/280 tienen un promedio de 1.8 y la absorbancia de 260/230 varió entre 0.75 y 1.83 según el cultivo.

La calidad del ADN extraído tanto con métodos convencionales como con kits comerciales puede ser alta, siempre que los protocolos se sigan correctamente. Sin embargo, los kits comerciales ofrecen la ventaja de los protocolos estandarizados y el control de calidad, que pueden aumentar la fiabilidad y la coherencia de la extracción de ADN, ya que están optimizados en cuanto a eficacia y pureza, lo que reduce el riesgo de variabilidad y contaminación (PACBIO, 2020).

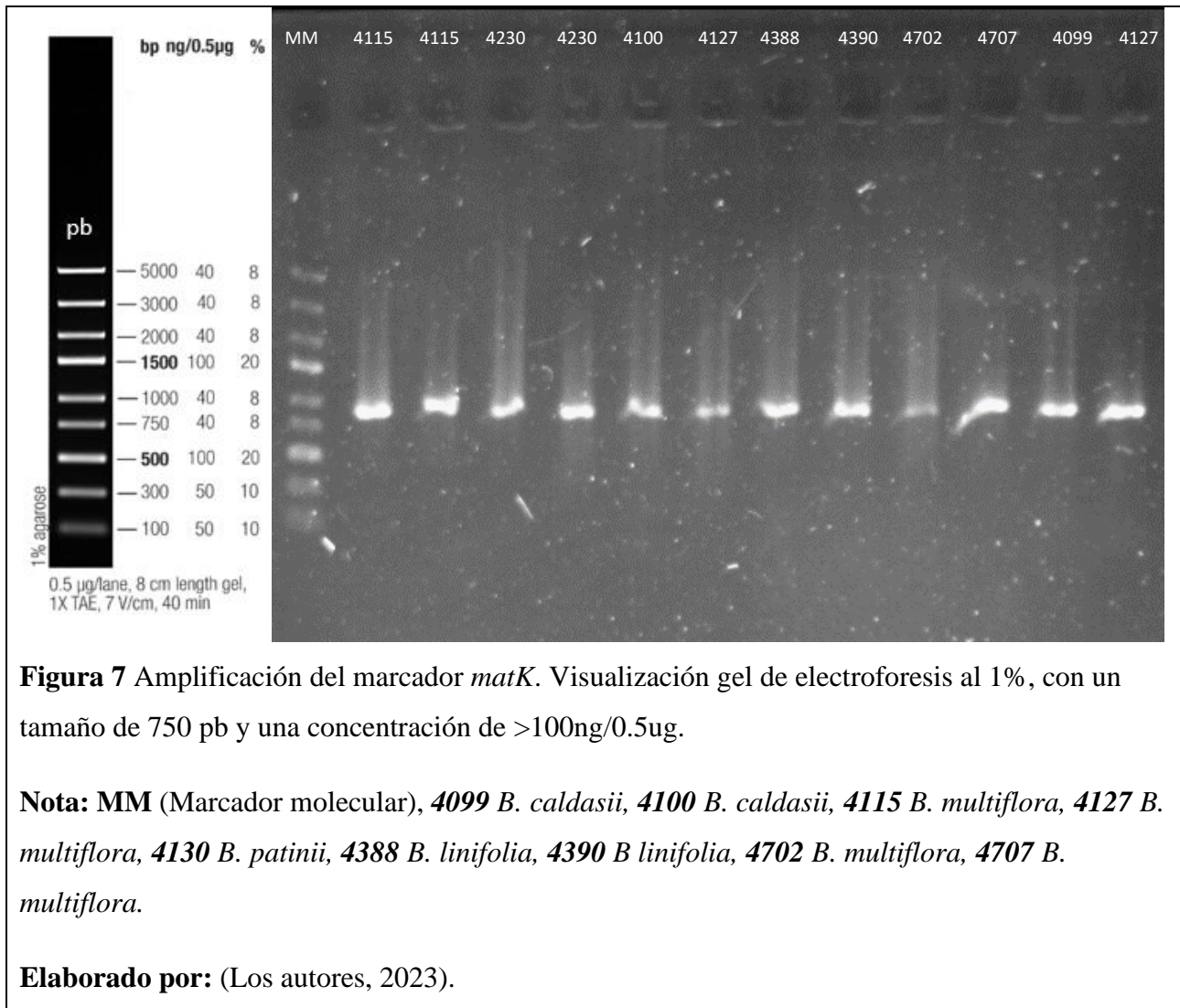
4.2.2 Amplificación

4.2.2.1 Gen *matK*

Las 9 muestras estudiadas se amplificaron con el gen *matK* de manera correcta, en donde se pudo presenciar las bandas del producto amplificado con su respectivo tamaño, el cual se encuentra alrededor de los 750 pb como se observa en la Figura 7. El tamaño del producto amplificado concuerda con los resultados de Endara & Ocaña (2022), en donde amplificaron la región *matK* en especies del género *Restrepia* los cuales están entre los 750 – 800 pb.

El tamaño de amplificación del marcador molecular *matK* puede variar en función de la especie o variante específica que se estudie sin embargo, el rango de tamaño típico para la amplificación de *matK* en plantas es de alrededor de 800 a 900 pares de bases (pb) (Parveen et al., 2017).

Amplificación gen *matK*

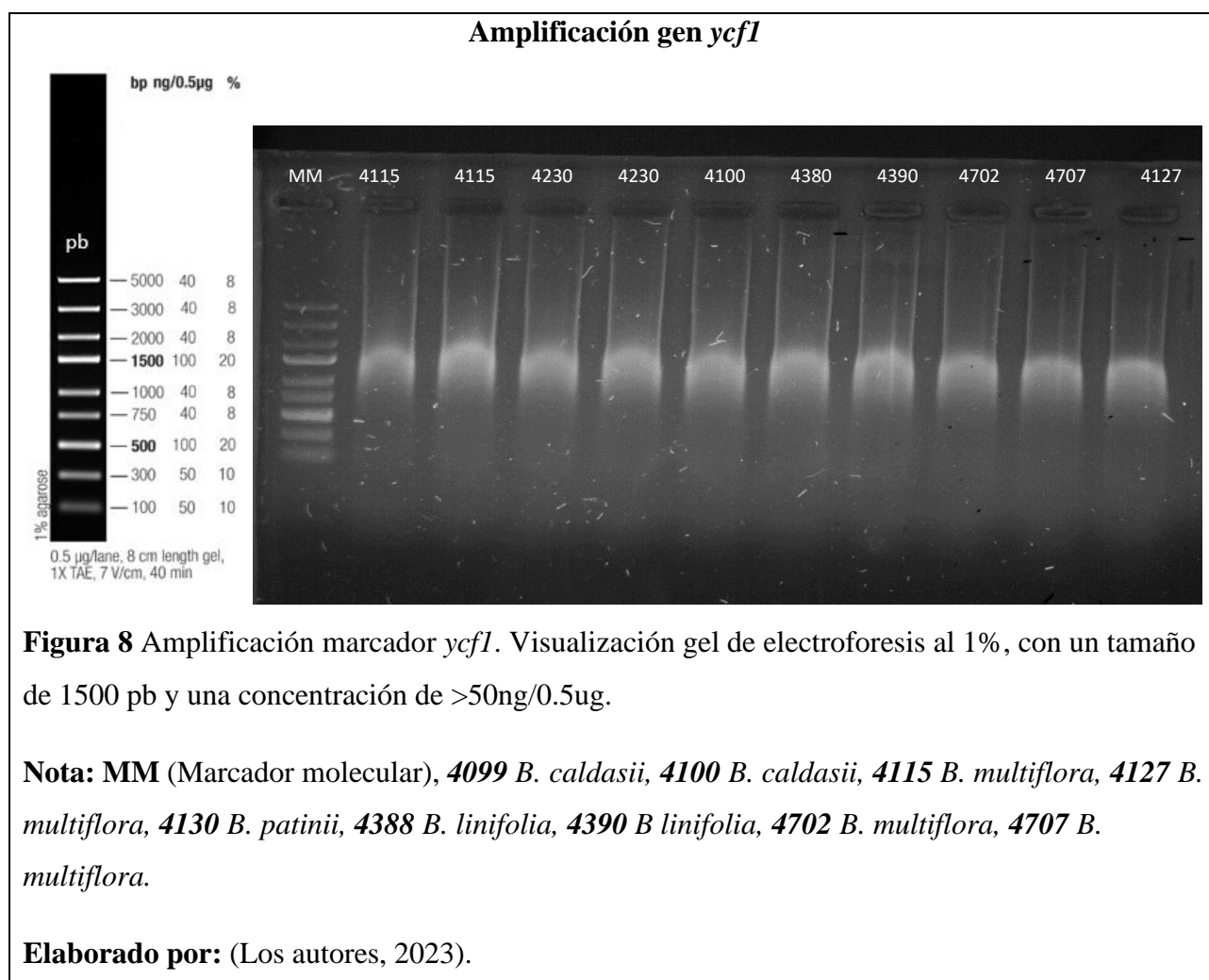


4.2.2.2 Gen *ycf1*

Los resultados obtenidos del gen *ycf1* de las 9 muestras amplificadas, mostraron bandas con barridos y baja intensidad, las cuales se encuentran respectivamente posicionadas en un rango de entre 1000 a 1500 pb como se observa en la Figura 8, rango que va de acuerdo a la longitud del primer diseñado del marcador *ycf1*. El rango de amplificación del marcador coincide con estudios del gen *ycf1*, según Amar (2020) en la identificación de otras especies vegetales como *Prunus pérsica*, los valores de peso molecular del marcador *ycf1* rondaba entre 1037 a 1085 pb, evidenciando que el rango del peso molecular para este marcador puede ser considerablemente alto. Por lo cual, hay que considerar que la región del marcador *ycf1* es muy amplia, conteniendo en su totalidad 5500 pb dificultando el diseño de primers específicos para los distintos tipos de especies vegetales (Londoño, 2021).

Otro aspecto a tomar en cuenta es que, al observar las bandas, se puede apreciar que estas no están completamente definidas, lo que implicaría que en el proceso de amplificación no todos los fragmentos se han unido de forma correcta, esto puede deberse a ciertos factores tales como una insuficiente especificidad de los cebadores para la especie con la cual se está trabajando, así como

condiciones subóptimas de PCR, tales como la temperatura de annealing, el periodo de extensión o presencia de contaminantes en las muestras de ADN (Dong et al., 2015).



4.2.3 Secuenciación

Las muestras amplificadas con los marcadores *matK* y *ycf1*, no se pudieron secuenciar debido a que el Secuenciador de la Universidad Politécnica Salesiana se encontraba en mantenimiento y faltaron reactivos para el proceso; como se puede observar en la Figura 9 y Figura 10, el proceso se llevó a cabo sin embargo, los resultados de la secuenciación fueron fallidos por los motivos mencionados anteriormente. A pesar de ello se obtuvieron secuencias de la base de datos de la página web *GENEBANK* del género *Bomarea* y de Sánchez (2020), las cuales fueron analizadas con la herramienta *Finch TV* y su posterior alineamiento en el programa bioinformático *MEGA 11*.

Electroferograma de la región *matK*

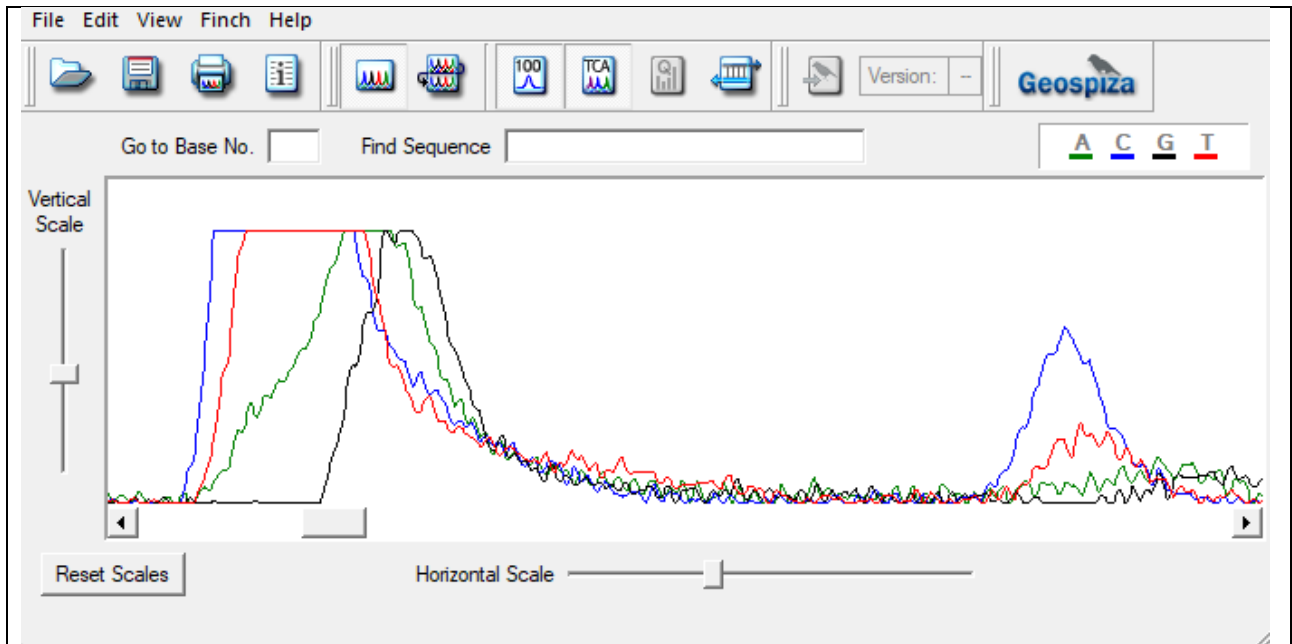


Figura 9 Electroferograma de la región *matK*.

Fuente: (Los autores, 2023).

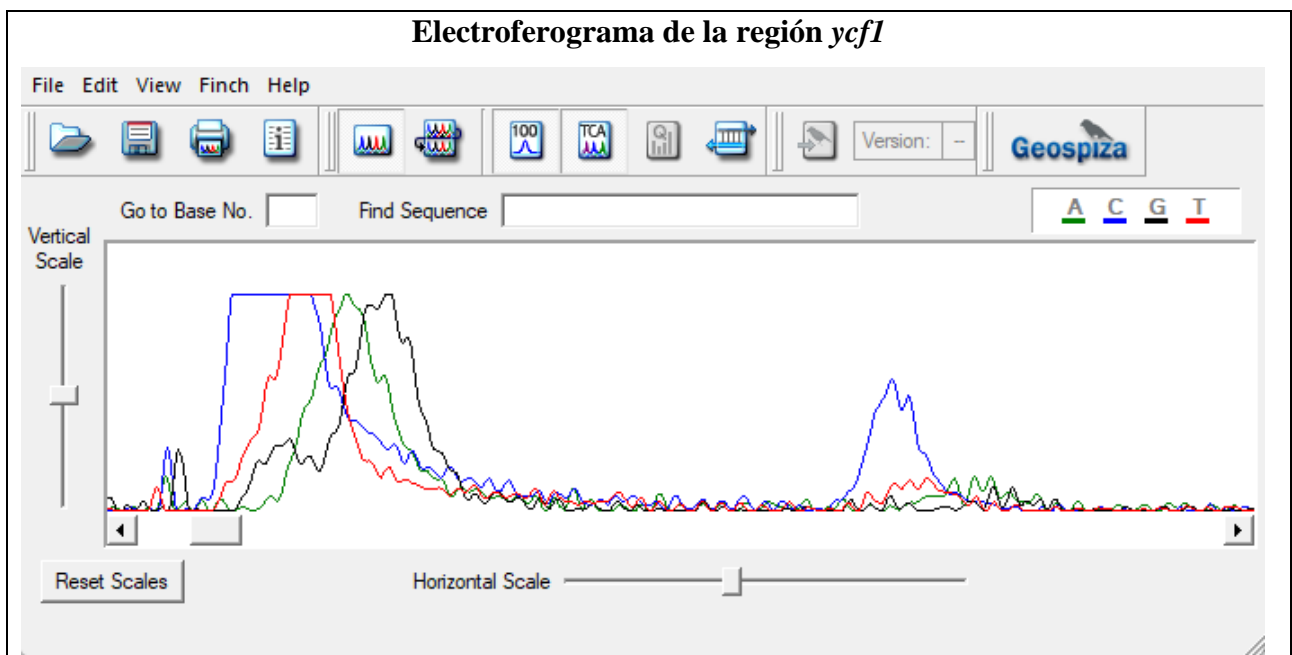


Figura 10 Electroferograma de la región *ycf1*.

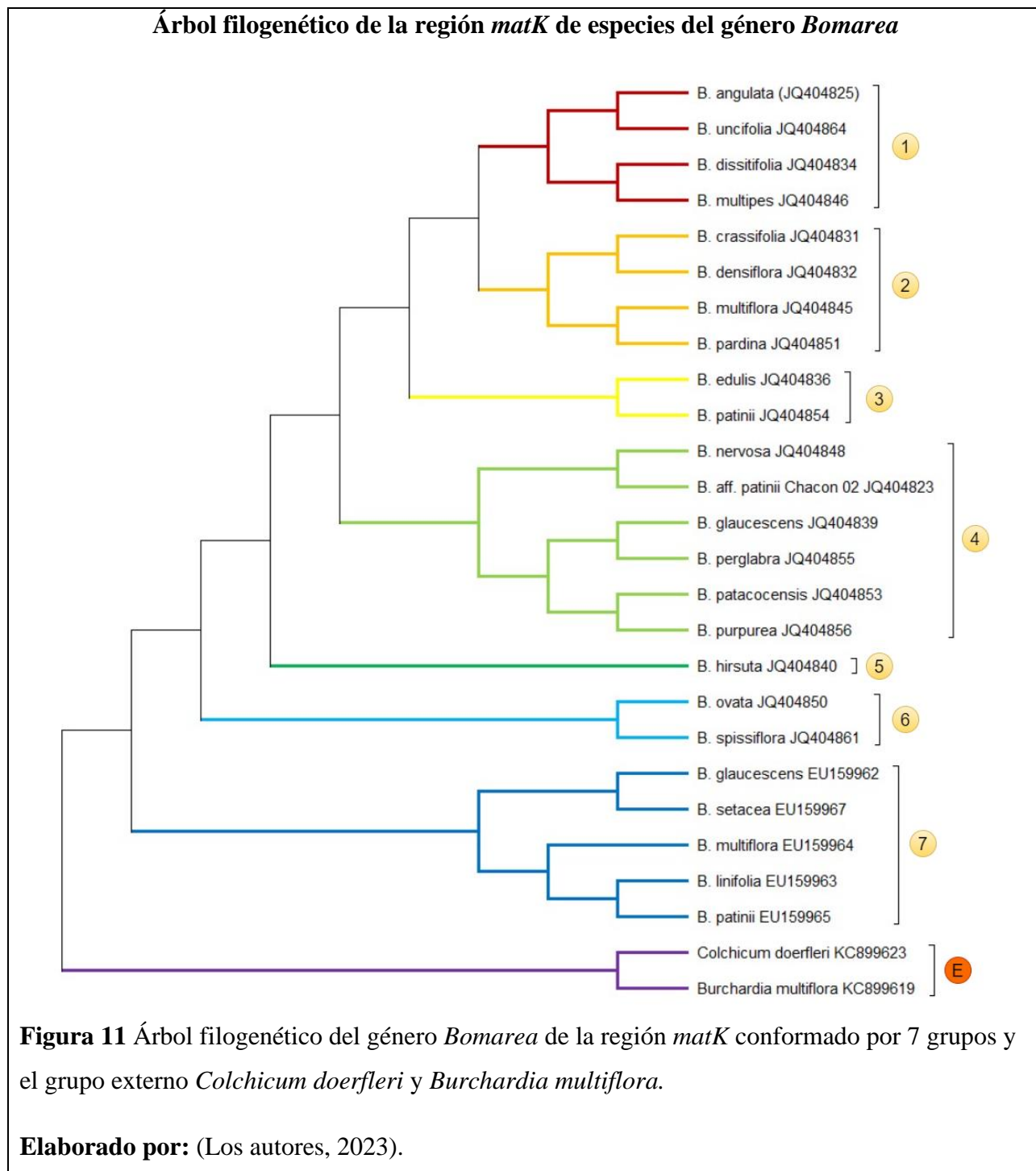
Fuente: (Los autores, 2023).

4.3 Filogenia

Para este análisis se construyeron arboles filogenéticos mediante el programa *MEGA 11* utilizando las secuencias procesada de *GENEBANK* del género *Bomarea*, pertenecientes a los marcadores *matK* y *rbcL*, además se utilizaron secuencias del marcador *rpoC1* obtenidas de Sánchez (2020). Los

resultados de la construcción de los árboles filogenéticos se pueden observar en la Figura 11 (*matK*), Figura 12 (*rbcL*) y Figura 13 (*rpoCI*).

4.3.1 Análisis filogenético del gen *matK*



Para la implementación del árbol filogenético del gen *matK*, se utilizaron 24 secuencias procesadas, seguidas de un grupo externo conformado por dos especies pertenecientes a la familia Colchicaceae, el cual es el clado hermano de la familia de las Alstroemeráceas, de esta forma dándose el enraizamiento. Se puede evidenciar que el grupo 4 es el más grande de todos contando con 6 especies, este clado en particular puede indicar concordancia entre sus individuos, debido a que las muestras

fueron encontradas en la región norte interandina, seguido del grupo 7 con 5 especies, y el grupo más pequeño es el 5, a más de ser el que presenta la mayor distancia filogenética. Además, se puede observar que el grupo 1 y 2 son grupos hermanos entre ellos, característica a la que se puede llegar, debido a que entre más reciente sea el ancestro en común, estos tendrán mayor relación (Verde & Saravia, 2023).

Otra característica importante es que el patrón de ramificación del árbol, nos revela que los grupos 1,2,3 y 4 han evolucionado a partir de una serie de ancestros en común. Finalmente, todos los grupos están vinculados en mayor o menor medida, ya que comparten un antepasado en común.

De acuerdo a análisis biogeográficos realizados por (Alzate, Quijano, et al., 2008), como estudios complementarios a su previo trabajo de investigación en la aplicación de marcadores moleculares, entre ellos *matK*, para la implementación de árboles filogenéticos en especies del género *Bomarea*, permite concordar la distribución geográfica de las especies *B. multiflora*, *B. edulis*, *B. patinii*, *B. glaucescens*, *B. hirsuta*, *B. linifolia*, las mismas que fueron utilizadas en la presente investigación.

4.3.2 Análisis filogenético del gen *rbcL*

Árbol filogenético de la región *rbcL* especies del género *Bomarea*

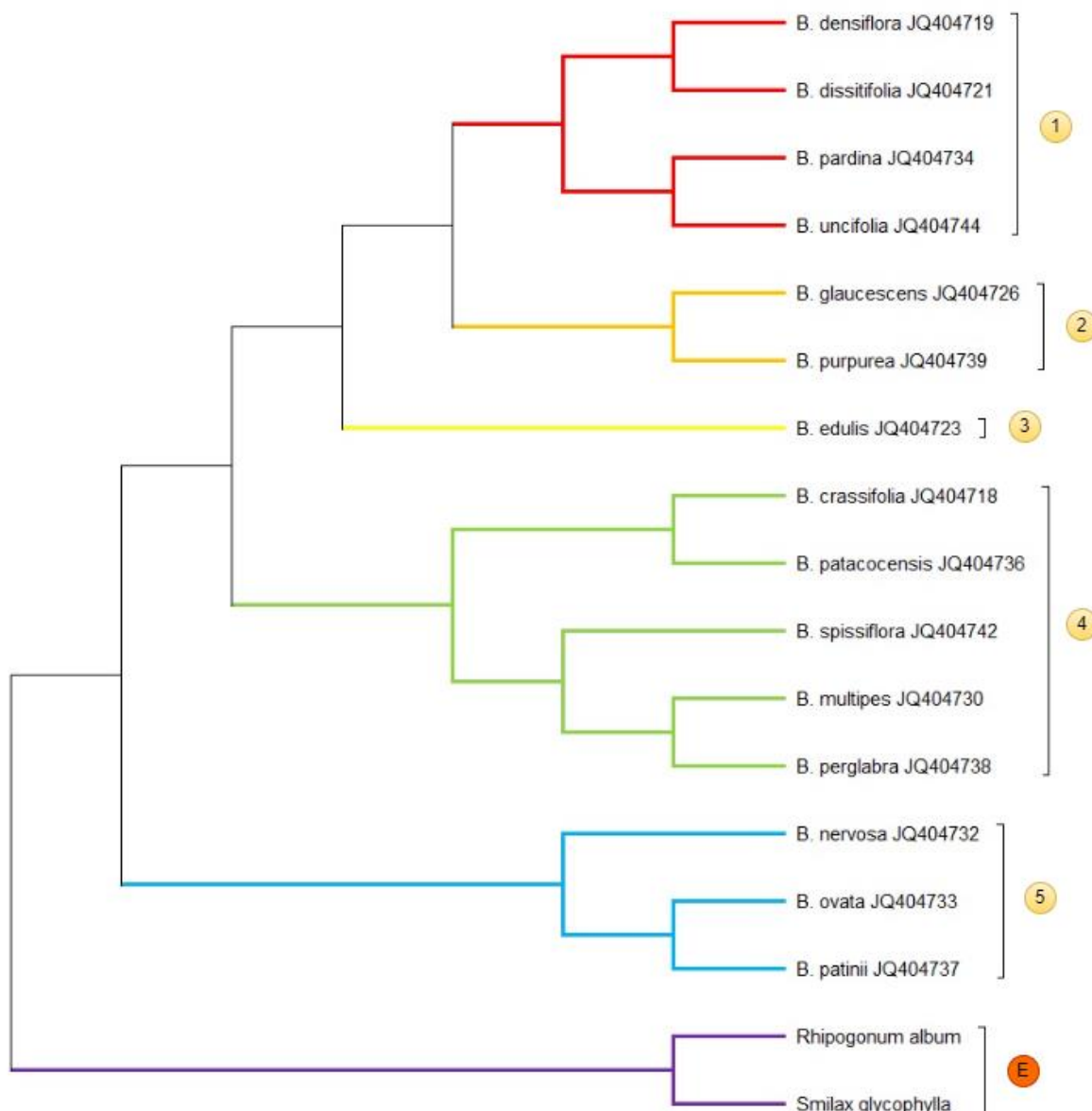


Figura 12 Árbol filogenético del género *Bomarea* de la región *rbcL* conformado por 5 grupos y el grupo externo *Rhipogonum album* y *Smilax glycyphylla*.

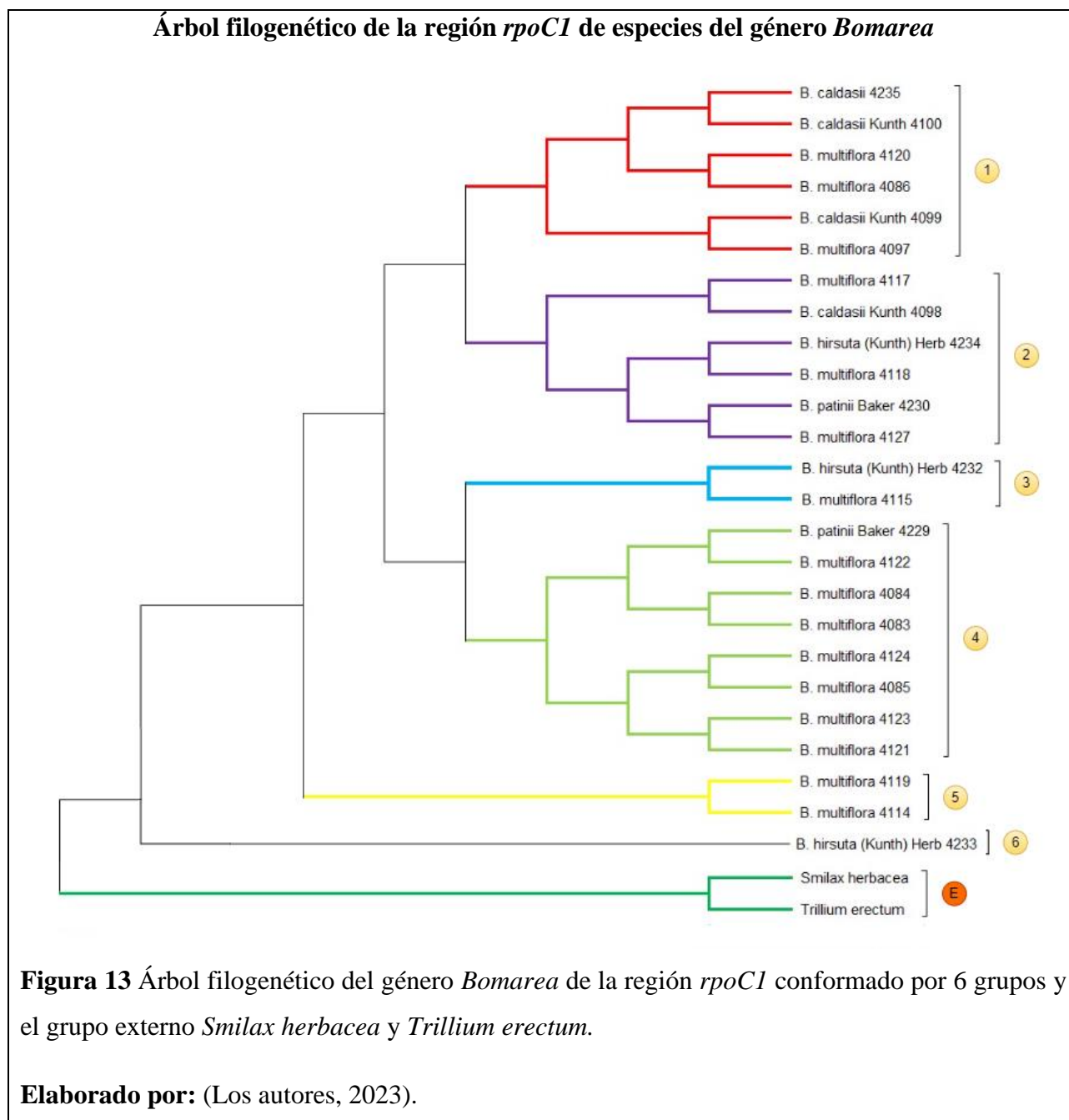
Elaborado por: (Los autores, 2023).

En el caso de *rbcL*, se realizó la construcción del árbol utilizando 15 secuencias procesadas y utilizando un grupo externo constituido por 2 especies, *Rhipogonum álbum* y *Smilax glycyphyphylla*, ambas pertenecientes a familias que se encuentran dentro del orden Liliales. Su grupo más grande es el 4 con 5 especies, seguido del grupo 1 que contiene 4 especies. Por otra parte, su grupo más pequeño es el 3 y es también el que mayor distancia filogenética presenta.

Se puede observar que aquellos grupos en los cuales han evolucionado a partir de varios ancestros en común son 1 y 2, además de ser grupos hermanos entre ellos. Al igual que el árbol anterior, los grupos

obtenidos comparten un ancestro en común. Pese a que se han realizado investigaciones de filogenia utilizando el marcador *rbcL*, para el género *Bomarea*, estas utilizan un número mínimo de especies del género, por lo cual no es posible realizar comparaciones concisas respecto al árbol resultante.

4.3.3 Análisis filogenético del gen *rpoC1*



Para *rpoC1*, se utilizaron 25 secuencias, y se utilizaron un grupo externo de 2 especies, *Smilax herbácea* y *Trillium erectum* pertenecientes a familias del orden Liliales. El grupo más grande es el 4 contando con 8 especies, y va seguido de los grupos 1 y 2 con seis especies, su grupo más pequeño es el 6 y de igual manera es el que presenta mayor distancia filogenética y todas partiendo de un ancestro en común. Para el caso del árbol de *rpoC1*, es posible guiarse de otras investigaciones como la realizada por (Sánchez, 2020), en la cual la autora realiza la implementación del marcador *rpoC1*

para la creación de un árbol filogenético, permitiéndonos comprobar similitudes, como por ejemplo la agrupación en clados de las especies pertenecientes a *B. multiflora*.

De las 3 regiones utilizadas en la filogenia, se puede evidenciar que aquella en la que se generó el mayor número de grupos es la región *matK*, formando 7 grupos, lo que indicaría que el uso de este marcador, permite una mayor discriminación entre especies. Sin embargo, los otros dos modelos de árboles filogenéticos presentan características importantes que contribuyen con información de la evolución de las especies del género *Bomarea*, por lo cual se analizó las similitudes entre grupos. Este resultado, sería plausible, ya que el marcador *matK*, es uno de los principales marcadores moleculares para la identificación de especies vegetales (Londoño, 2021).

4.3.4 Comparación filogenia *matK* - *rbcL*

Entre estos dos marcadores se generaron las siguientes similitudes, en los grupos:

- Tanto en el árbol de *matK* como en el de *rbcL* se encuentran *B. Uncifolia* y *B. Dissitifolia* en el grupo 1.
- En el árbol de *matK* *B. multipes* y *B. crassifolia* se encuentran cercanos entre el grupo 1 y 2, mientras que en *rbcL* estas se encuentran juntas en el grupo 4.
- En el árbol de *matK* *B. patinii* y *B. nervosa* se encuentran cercanos entre el grupo 3 y 4, mientras que en *rbcL* se encuentran juntos en el grupo 5.
- En el árbol de *matK* *B. glaucescens*, *B. perglabra*, *B. patacocencis* y *B. purpurea* se encuentran juntos en el grupo 4, mientras que en *rbcL* *B. glaucescens* y *B. purpurea* se encuentran juntos en el grupo 2 y *B. perglabra* con *B. patacocencis* se encuentran juntos en el grupo 4.

4.3.5 Comparación filogenia *matK* – *rpoC1*

- En el árbol de *matK* *B. hirsuta* aparece en una rama aislada del grupo 5, mientras que en *rpoC1* se encuentra de igual forma en un grupo aislado, encontrándose en el grupo 6.
- En el árbol de *matK* *B. multiflora* y *B. patinii* se encuentran juntas en el grupo 7, mientras que en *rpoC*, estas están juntas en el grupo 4.

4.3.6 Comparación filogenia *rbcL* – *rpoC1*

- En el análisis realizado entre los árboles de estos dos marcadores, no se encontraron similitudes. En base al análisis comparativo entre los 3 árboles filogenéticos generados, se asumiría que la región *matK* es la que presenta una mayor discriminación, seguida de *rpoC1* y finalmente *rbcL*, cabe destacar que la efectividad de los marcadores para la identificación entre distintas especies puede variar, además no se precisa de suficiente información para el género *Bomarea*, que permita realizar comparaciones más concisas (Mirzaei, 2021).

Las semejanzas entre los grupos obtenidos, se evaluaron de acuerdo con la distancia presente en los mismos, evidenciando el proceso evolutivo por las ramificaciones generadas, las cuales muestran ancestros en común, esta comparación nos permitió identificar las especies que se encuentran temporalmente asociadas y a su vez las especies que presenten mayor distancia filogenética, por lo que es posible observar cambios significativos en su genotipo (Verde & Saravia, 2023).

En base a lo antes mencionado, se podría afirmar que el gen *matK* y *rbcL*, son los marcadores que generan mayor información, respecto al género *Bomarea*, ya que estos han generado la mayor similitud entre los 3 marcadores en base a los arboles genéticos, otras investigaciones ya mencionadas como las de (Alzate, Quijano, et al., 2008), muestran que es *matK* es un marcador aceptable para la identificación de especies de *Bomarea*.

4.4 Georreferenciación

Las especies analizadas del género *Bomarea* fueron cargadas sus coordenadas de latitud y longitud al programa *DIVA GIS*, en donde fueron colocadas según su ubicación de colecta de cada especie gracias a la página web *Tropicos*. Todas las 20 especies estudiadas se encuentran distribuidas principalmente norte y centro de la región sierra del Ecuador.

Varias de estas especies se encuentran cerca de las elevaciones de la cordillera de los andes por lo tanto su principal distribución es Imbabura, Cayambe, Chimborazo, Cotopaxi, Tungurahua y algunas especies en la región oriental como Napo, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Loja al sur del Ecuador.

que las especies *B. edulis* se encuentran en la región costa del Ecuador este grupo se distribuyen por los bordes de la región interandina del Ecuador entre los 100-500 m.s.n.m.

Grupo 4 (verde). Este grupo está conformado por *B. nervosa*, *B. patinii*, *B. glaucescens*, *B. perglabra*, *B. patacocensis* y *B. purpurea*. Las especies de este grupo se distribuyen por todo el norte y en menor proporción de la región interandina del Ecuador entre los 2000-3500 m.s.n.m.

Grupo 5 (morado) y 6 (celeste). Este grupo está conformado por *B. hirsuta* (grupo 5); *B. ovata* y *B. spissiflora* (grupo 6). Las especies del grupo 5 se distribuyen por el nortoriente y región central occidental de la región interandina entre los 1900-3000 m.s.n.m y las especies del grupo 6 se encuentran en la amazonia entre los 1000-1800 m.s.n.m.

Grupo 7 (azul). Este grupo está conformado por *B. glaucescens*, *B. setacea*, *B. multiflora*, *B. linifolia* y *B. patinii*. Las especies de este grupo se distribuyen por la zona norte de la amazonia del Ecuador entre los 1800-3500 m.s.n.m.

5 Conclusiones

- Las 9 especies del género *Bomarea* se colectaron en su mayoría en las provincias de Pichincha y Tungurahua, las muestras recolectadas fueron procesadas en el laboratorio y conservadas en frío a -80 °C manteniendo su viabilidad.
- Se utilizaron 2 métodos para la extracción de ADN, con protocolo directo (kit comercial) *Platinum Direct PCR Universal Master Mix* y con protocolo modificado Doyle & Doyle, siendo el protocolo directo (kit comercial) el más efectivo para la obtención y purificación de ADN.
- Se amplificó la región *matK* y *ycf1* mediante la técnica de PCR para las especies del género *Bomarea* obtenido resultados positivos para la región *matK*, sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables para la región *ycf1*, por la inespecificidad de los primers utilizados en el momento de la amplificación, lo cual provocó que los fragmentos no llegaran a fijarse en la cadena principal, causando barridos en las bandas.
- Los árboles filogenéticos, generados mediante información obtenida de la base de datos *GENEBANK*, determinaron que el *matK* es el marcador que provee mayor información, al presentar el mayor número de clados, siendo el árbol filogenético que presenta la mayor capacidad de discriminación entre especies del género *Bomarea*.
- Al realizar la comparación entre los 3 árboles filogenéticos, se pudo notar que aquellos construidos con secuencias del gen *matK* y *rbcL*, presentan mayores similitudes entre sus clados, denotando que el uso de estos marcadores es viable para la diferenciación de especies de *Bomarea*.
- Se determinó mediante el análisis de filogenia que algunas especies se agrupaban acorde a su hábitat, mostrándose una mayor agrupación al norte de la región interandina.
- Mediante georreferenciación se pudo determinar la distribución y concentración de especies del género *Bomarea* en toda la región interandina del Ecuador, siendo las provincias de Imbabura, Cayambe, Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua donde se encuentra en mayor parte con una altitud que va desde los 1000 hasta los 3500 m.s.n.m.

6 Recomendaciones

- Para su recolección se debe tomar en cuenta la edad de la planta ya que para la obtención de un ADN viable deben ser muestras frescas, con uso previo de reactivos que eviten la oxidación de las muestras vegetales, por otro lado la conservación de la muestra se debe realizar a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para evitar la degradación del material genético, como también se pueden emplear otro tipo de primers más específicos que permitan la comparación de árboles filogenéticos y así tener una separación más clara entre especies.
- Se recomiendan amplificar con primers más específicos las regiones *matK* y *ycf1* para la diferenciación de las especies del género *Bomarea*. Incluso se debe considerar las condiciones de cada marcador o gen a utilizar al momento de su manipulación ya que modificando dichos factores pueden influir en la eficiencia en la amplificación.
- Se sugiere realizar más estudios con el marcador *rpoC1* para la construcción de árboles filogenéticos, ya que esta región es general el cual no permite descartar especies del género *Bomarea* a diferencia de los marcadores moleculares *matK* y *rbcL* que son más discriminatorios.

7 Bibliografía

- Aagesen, L., & Sanso, A. (2003). The phylogeny of the Alstroemiaceae, based on morphology, *rps16* intron, and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany*, 28(1), 47–69.
- Alzate, F. (2007). Two new species of *Bomarea* (Alstroemiaceae) from Colombia. *Novon*, 17(2), 141–144. [https://doi.org/10.3417/1055-3177\(2007\)17\[141:TNSOBA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/1055-3177(2007)17[141:TNSOBA]2.0.CO;2)
- Alzate, F. (2016). *El género Bomarea (Alstroemiaceae) en la Flora de Colombia* (Issue 31). Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
- Alzate, F., Mort, M., & Ramirez, M. (2008). Phylogenetic analyses of *Bomarea* (Alstroemiaceae) based on combined analyses of nrDNA ITS, *psbA-trnH*, *rpoB-trnC* and *matK* sequences. *Taxon*, 57(3), 853–862. <https://doi.org/10.1002/tax.573014>
- Alzate, F., Quijano, M., & Morrone, J. (2008). Panbiogeographical analysis of the genus *Bomarea* (Alstroemiaceae). *Journal of Biogeography*, 35, 1250–1257. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01896.x>
- Amar, M. (2020). *ycf1-ndhF* genes, The most promising plastid genomic barcode, sheds light on phylogeny at low taxonomic levels in *Prunus persica*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(42), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00057-3>
- Arenas, N., Gutiérrez, A., Salazar, L., Polanco, J., & Gómez, A. (2009). Construcción de una filogenia molecular para las especies de los géneros *Klebsiella* y *Raoultella* basada en los genes ARNr 16S y ARN polimerasa subunidad. *Revista Ciencias de La Salud*, 7(2), 22–29.
- Camargo, M. (2012). Alstroemiaceae na Região Sul do Brasil. *Rodriguésia*, 63(4), 1117–1132. <https://doi.org/10.1590/s2175-78602012000400022>
- Chacón, J., de Assis, M., Meerow, A., & Renner, S. (2012). From East Gondwana to Central America: Historical biogeography of the Alstroemiaceae. *Journal of Biogeography*, 39(10), 1806–1818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02749.x>
- Chacón, J., Sousa, A., Baeza, C., & Renner, S. (2012). Ribosomal DNA distribution and a genus-wide phylogeny reveal patterns of chromosomal evolution in *Alstroemeria* (Alstroemiaceae). *American Journal of Botany*, 99(9), 1501–1512. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200104>
- Cheikh, M., Escudero, M., Ponger, L., Monnet, A., Arroyo, J., Nikolic, T., Bacchetta, G., Bagnoli, F., Dimopoulos, P., Leriche, A., Médail, F., Roig, A., Spanu, I., Vendramin, G., Hampe, A., & Fady, B. (2020). A comprehensive, genus-level time-calibrated phylogeny of the tree flora of Mediterranean Europe and an assessment of its vulnerability. *Botany Letters*, 167(2), 276–289. <https://doi.org/10.1080/23818107.2019.1684360>

- Cornwell, W., Pearse, W., Dalrymple, R., & Zanne, A. (2019). What we (don't) know about global plant diversity. *ECOGRAPHY*, *42*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/ecog.04481>
- Costello, M. (2020). Taxonomy as the key to life. *MEGATAXA*, *1*(2), 105–113.
- Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *NPunto*, *3*(30), 88–111.
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., Cheng, T., Guo, J., & Zhou, S. (2015). ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports*, *5*, 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep08348>
- Eguiarte, L., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Biología molecular* (R. Pont (ed.); Primera ed). CONABIO. <https://doi.org/10.47807/unison.52>
- Endara, A., & Ocaña, M. (2022). *Análisis molecular de las especies del ecuador del género Restrepia (Orchidaceae) y análisis filogenético de secuencias obtenidas de genbank*.
- Farooq, Q., Shakir, M., Ejaz, F., Zafar, T., Durrani, K., & Ullah, A. (2020). Role of DNA Barcoding in Plant Biodiversity Conservation. *Scholars International Journal of Biochemistry*, *03*(03), 48–52. <https://doi.org/10.36348/sijb.2020.v03i03.002>
- Fazekas, A., Burgess, K., Kesanakurti, P., Graham, S., Newmaster, S., Husband, B., Percy, D., Hajibabaei, M., & Barrett, S. (2008). Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLoS ONE*, *3*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
- Fernández, J. (2010). Potencial antioxidante de algunas especies del género *Bomarea*. *Primer Encuentro de Investigación Formativa*, *1*, 1–21.
- Garbiso, C., & Estrada, J. (2015). Sinopsis taxonómica de *Bomarea* Mirb . subgenero *Bomarea* (Alstroemeriaceae) para Venezuela. *Plantula*, *3*(1), 11–39.
- González, K. (2021). *Extracción de ADN e implementación de técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa para identificar Arroz, Soya y Maíz* [UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ]. <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>
- Grant, D., Brodnicke, O., Evankow, A., Ferreira, A., Fontes, J., Hansen, A., Jensen, M., Kalaycı, T., Leeper, A., Patil, S., Prati, S., Reunamo, A., Roberts, A., Shigdel, R., Tyukosova, V., Bendiksby, M., Blaalid, R., Costa, F., Hollingsworth, P., ... Ekrem, T. (2021). The Future of DNA Barcoding: Reflections from Early Career Researchers. *Diversity*, *13*(313), 1–11. <https://doi.org/10.3390/d13070313>

- Haston, E., Richardson, J., Stevens, P., Chase, M., & Harris, D. (2009). The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: A linear sequence of the families in APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *161*(2), 128–131. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01000.x>
- Hofreiter, A. (2007). Biogeography and Ecology of the Alstroemeriaceae-Luzuriagaceae Clade in the High-Mountain Regions of Central and South America. *Harvard Papers in Botany*, *12*(2), 259–284. [https://doi.org/10.3100/1043-4534\(2007\)12\[259:baeota\]2.0.co;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2007)12[259:baeota]2.0.co;2)
- Hofreiter, A. (2008). A revision of *Bomarea* subgenus *Bomarea* s.str. section *Multiflorae* (Alstroemeriaceae). *Systematic Botany*, *33*(4), 661–684. <https://doi.org/10.1600/036364408786500172>
- Hofreiter, A., & Rodríguez, E. (2005). Distribution and phenology of *Bomarea* (Alstroemeriaceae) in the relict forests of northwestern Peru. *Revista Peruana de Biología*, *12*(2), 275–282.
- Horiike, T. (2016). An Introduction To Molecular Phylogenetic Analysis. *Reviews in Agricultural Science*, *4*, 36–45. <https://doi.org/10.7831/ras.4.36>
- Hoshino, Y. (2008). Advances in *Alstroemeria* Biotechnology. *Global Science Books*, *5*, 540–547.
- Iza, M. (2018). *Identificación molecular de especies de Orquídeas del género Dracula, mediante el sistema Barcode* [Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito]. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Japa, J. (2021). *Evaluar la deficiencia del control estatal ante los impactos ambientales negativos en áreas naturales protegidas del Ecuador y la aplicación del principio de responsabilidad ambiental* [Universidad Católica de Cuenca]. <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/9712>
- Jara, P., & Urrutia, J. (2022). Cytogenetics of Chilean Land Plants (Embryophyta): State-of-the-Art and Prospects. *Journal of Basic and Applied Genetics*, *33*(1), 9–25. <https://doi.org/10.35407/bag.2022.33.01.01>
- Jones, L., Twyford, A., Ford, C., Rich, T., Davies, H., Forrest, L., Hart, M., McHaffie, H., Brown, M., Hollingsworth, P., & de Vere, N. (2021). Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom. *Molecular Ecology Resources*, *21*(6), 2050–2062. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13388>
- Kar, P., Goyal, A., & Sen, A. (2015). Maturase K gene in plant DNA barcoding and phylogenetics. *Plant DNA Barcoding and Phylogenetics*, *1*, 79–90.
- Kim, J., Kim, H., Yoon, C., & Kim, J. (2016). The complete plastid genome sequence of *Bomarea edulis* (Alstroemeriaceae: Liliales). *Mitochondrial DNA*, *27*(3), 1869–1870.

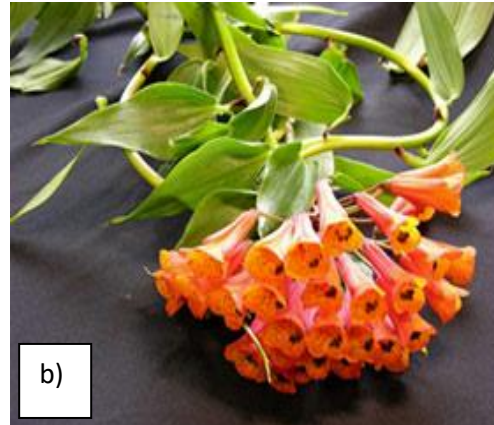
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.971264>

- Koch, A. (2016). Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Alstroemeriaceae. *Rodriguesia*, 67(5), 1201–1204. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201667518>
- Londoño, P. (2021). *Evaluación de marcadores moleculares de cloroplastos y nucleares, para su uso en identificación molecular de germoplasmas de orquídeas*. Universidad EAFIT.
- Martida, V., & Pharmawati, M. (2019). Comparison of DNA Yield from Different Plant Materials of *Plumeria* sp. (Apocynaceae). *Advances in Tropical Biodiversity and Environmental Sciences*, 3(1), 8–11. <https://doi.org/10.24843/atbes.2019.v03.i01.p03>
- Mazo, L., Gómez, A., Quintanilla, S., Bernal, J., & Ortiz, P. (2013). Extraction and amplification of DNA from orchid exsiccates conserved for more than half a century in a herbarium in Bogotá, Colombia. *Lankesteriana*, 12(2), 121–129. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11762>
- Mirzaei, S. (2021). Application of molecular markers in plant sciences; An overview. *Central Asian Journal of Plant Science Innovation*, 1(4), 192–200.
- Mohammad, A., Hoshino, Y., & Araki, H. (2015). Pollen morphology and its taxonomic significance in the genus *Bomarea* Mirb. (Alstroemeriaceae) – II. Subgenus *Bomarea*. *Acta Botanica Brasilica*, 29(4), 586–596. <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0186>
- Munjal, G., Hanmandlu, M., & Srivastava, S. (2019). Phylogenetics Algorithms and Applications. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, 904, 187–194.
- Nath, O., Fletcher, S., Hayward, A., Shaw, L., Agarwal, R., Furtado, A., Henry, R., & Mitter, N. (2022). A Comprehensive High-Quality DNA and RNA Extraction Protocol for a Range of Cultivars and Tissue Types of the Woody Crop Avocado. *Plants*, 11(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/plants11030242>
- Niizawa, C. (2020). Los códigos de barra moleculares como una herramienta para la identificación de plantas medicinales. *MENSAJE BIOQUÍMICO*, 44, 31–37. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/>
- Nyambura, R., & Ang, N. (2019). *Molecular and Morphological Identification of Plants Consumed by Yellow Baboons in Amboseli, Kenya*. University of Nairobi.
- PACBIO. (2020). *Preparing DNA for PacBio HiFi Sequencing - Extraction and Quality Control*.
- Parveen, S., Singh, H., Malik, S., Raghuvanshi, S., & Shashi, B. (2017). Evaluating five different Loci (*rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK* and ITS) for DNA Barcoding of Indian Orchids. *National Centre for Natural Products Research*, 1–27.

- Rocha, P. (2002). Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Revista Palmas*, 23(3), 9–17.
<http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/921>
- Sánchez, V. (2020). Estudio fitoquímico e identificación molecular de las especies del género Bomarea del norte de los Andes del Ecuador, mediante el sistema BARCODE. In *Universidad Politécnica Salesiana*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Sarmiento, G., Santos, E., Miranda, M., Pacheco, R., Scull, R., Gutiérrez, Y., & Delgado, R. (2020). Short Communication: Molecular barcode and morphology analysis of *Malva pseudolavatera* Webb & Berthel and *Malva sylvestris* L. from Ecuador. *Biodiversitas*, 21(8), 3554–3561.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d210818>
- Staton, J. (2015). Understanding phylogenies : Constructing and interpreting phylogenetic trees. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 13(1), 24–29.
- Tamay, D., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78.
- Tanabe, A., & Toju, H. (2013). Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A Benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants. *PLoS ONE*, 8(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076910>
- Thermo Scientific. (2019). *Direct PCR Phire and Phusion Kits & Master Mixes* .
- Tribble, C., Alzate, F., Gándara, E., Vartoumian, A., Gordon, J., Zenil, R., Specht, C., & Rothfels, C. (2022). *The rapid radiation of Bomarea (Alstroemeriaceae : Liliales), driven by the rise of the Andes*. 1–30.
- Velasco, R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 3(1), 14–18.
<http://revistabioteecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/bioteecnologia/article/viewFile/19/12>
- Verde, L., & Saravia, M. (2023). Dime dónde andas y te diré cómo eres, así funciona la evolución convergente. *Therya Ixmana*, 2(1), 12–14. https://doi.org/10.12933/therya_ixmana-23-282
- Yang, C., Lv, Q., & Zhang, A. (2020). Sixteen Years of DNA Barcoding in China: What Has Been Done? What Can Be Done? *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8(57), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00057>
- Zaman, W., Ye, J., Saqib, S., Liu, Y., Shan, Z., Hao, D., Chen, Z., & Xiao, P. (2021). Predicting

potential medicinal plants with phylogenetic topology: Inspiration from the research of traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 281(2020), 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114515>

Anexo 1 Colecta de las especies vegetales del género *Bomarea*.



Nota: a) Recolección del material vegetal, b) *Bomarea multiflora*, c) cápsulas.

Fuente: (Los autores, 2023).

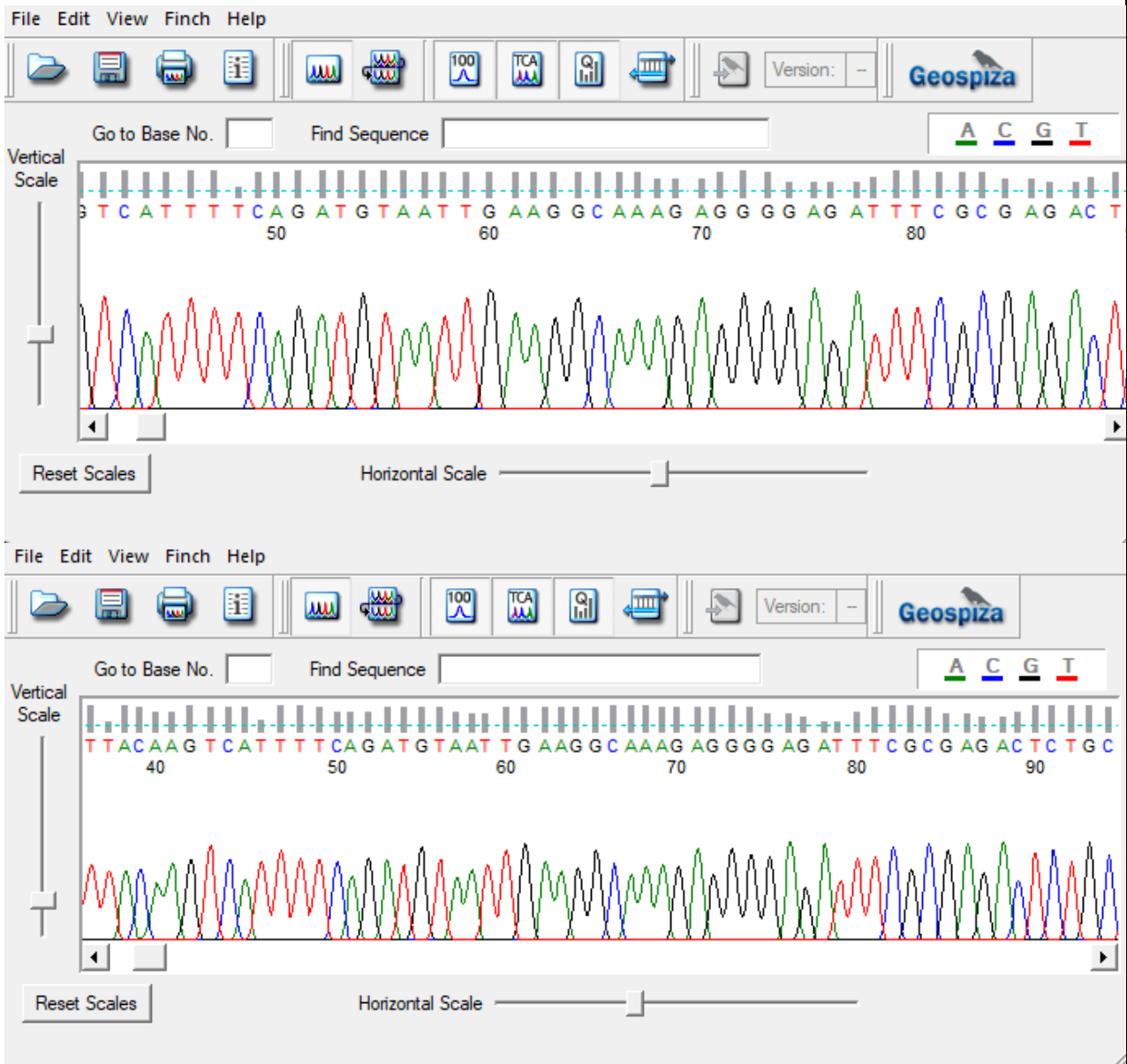
Anexo 2 Alineamiento de las secuencias de *rbcL*.

The screenshot displays a sequence alignment tool interface. The main window shows 17 DNA sequences from the genus *Bomarea*, each with a unique accession number (e.g., JQ404718). The sequences are aligned and color-coded by nucleotide: Adenine (A) in blue, Cytosine (C) in red, Guanine (G) in green, and Thymine (T) in purple. The alignment shows high conservation across all sequences. The interface includes a menu bar (Data, Edit, Search, Alignment, Web, Sequencer, Display, Help) and a toolbar with various icons. At the bottom, there are controls for 'Site #', 'with'/'w/o gaps', and 'Selected genetic code: Standard'.

Nota: Alineamiento de las secuencias del género *Bomarea* de la página web *Tropicos* con sus grupos externos.

Fuente: (Los autores, 2023).

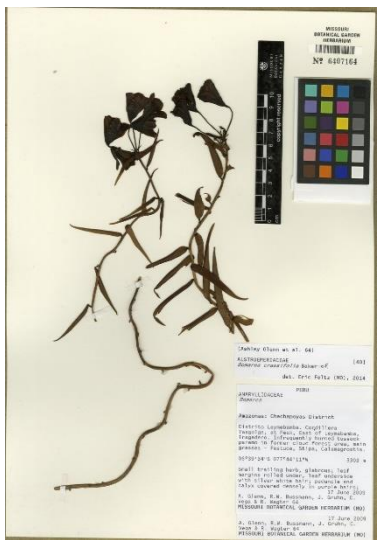
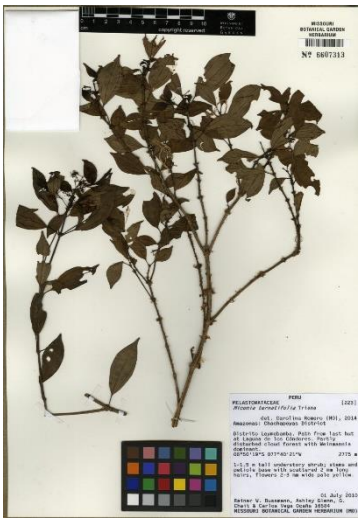
Anexo 5 Electroferograma de las secuencias del género *Bomarea*.


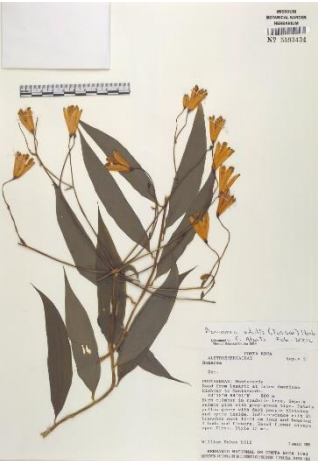






Nota: Electroferogramas de las secuencias obtenidas del género *Bomarea*.

Fuente: (Los autores, 2023).





Anexo 6 Repositorio de especies del género *Bomarea*

Especie	Ubicación	Latitud	Longitud
<i>Bomarea angulata</i> Benth.	Azuay Loja	-3166667	-78866667
<i>Bomarea crassifolia</i> Baker 	Loja Morona Santiago	-4.383.333	-79116667
		Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)	
<i>Bomarea densiflora</i> Herb. 	Azuay Bolivar Cañar Chimborazo Cotopaxi Imbabura Loja Morona Santiago	-1.750.000	-79.133.333
		-2.383.333	-78.916.667
		-0.583333	78.816667
		0.366667	-78.466.667
		-4.716.667	-79.433.333
Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)			
<i>Bomarea dissitifolia</i> Baker	Azuay Cañar Chimborazo Loja	-2.800.000	-78.633.333
		-2.700.000	-78.783.333
		-1.783.333	-78.416.667
		-4.083.333	-79.166.667

 <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	<p>Morona Santiago Napo Tungurahua Zamora Chinchi</p>	<p>-3.016.667 -0.466667 -1.350.000 -3.966.667</p>	<p>-78.583.333 - 77.716667 -78.116.667 -79.116.667</p>
<p><i>Bomarea edulis</i> (Tussac) Herb.</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	<p>Esmeraldas Los Ríos Pichincha</p>	<p>0.316667 -0.583333 -0.350000</p>	<p>-79.766.667 - 79.366667 - 79.366667</p>
<p><i>Bomarea glaucescens</i> (Kunth) Baker</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	<p>Azuay Chimborazo Cotopaxi Imbabura Napo Pichincha Tungurahua</p>	<p>-2.766.667 -1.533.333 -0.666667 0.300000 -0.950000 -0.266667 -1.183.333</p>	<p>-79.216.667 -78.883.333 - 78.500000 -78.366.667 - 78.383333 - 78.250000 -78.316.667</p>

<p><i>Bomarea hirsuta</i> (Kunth) Herb</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	Cañar	-2.566.667	-79.116.667
	Carchi	0.616667	-77.833.333
	Chimborazo	-1.966.667	-78.933.333
	Cotopaxi	-0.583333	-78.833333
	Imbabura	0.350000	-77.883.333
	Napo	-0.300000	-78.166667
	Pichincha Sucumbios	0.583333	-77.633.333
<p><i>Bomarea linifolia</i> (Kunth) Baker</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	Azuay	-3.183.333	-78.783.333
	Carchi	0.583333	-77.716.667
	Imbabura	-1.166.667	-78.266.667
	Napo Pichincha	-0.183333	-77.950000
<p><i>Bomarea multiflora</i> (L.f.) Mirb.</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	Azuay	-3.150.000	-78.800.000
	Bolívar	-1.366.667	-79.050.000
	Cañar	-2.483.333	-78.816.667
	Carchi	0.850000	-78.066.667
	Chimborazo	-1.816.667	-78.883.333
	Cotopaxi	-0.566667	-78.950000
	Imbabura	0.283333	-78.333.333
	Morona Santiago	-0.350000	-78.183333
	Napo	0.050000	-78.483.333
	Pichincha Tungurahua	-1.066.667	-78.400.000
<i>Bomarea multipes</i> Benth.	Azuay Loja	-4.083.333	-79.166.667
<p><i>Bomarea nervosa</i> (Herb.) Baker</p>	Loja	-4.383.333	-79.116.667
	Napo	-1.100.000	-78.300.000
		-4.383.333	-79.100.000

 <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	Zamora Chinchipe		
<p><i>Bomarea ovata</i> (Cav.) Mirb.</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	Pastaza	-1.450.000	-78.100.000
<p><i>Bomarea pardina</i> Herb.</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	Azuay Bolívar Cañar Carchi Cotopaxi El Oro Imbabura Loja Morona Santiago Napo Pastaza Pichincha Sucumbíos Zamora Chinchipe	-2.683.333 -1.716.667 -2.483.333 0.833333 -0.966667 -3.150.000 0.350000 -4.266.667 -3.216.667 -0.116667 -1.466.667 -0.016667	-79.466.667 -79.100.000 -79.083.333 -78.100.000 -79.100000 -79.133.333 -78.483.333 -79.166.667 -78.266.667 -77.600000 -78.100.000 -78.733333
<p><i>Bomarea patacoensis</i> Herb.</p>	N/A	-0.958197	-78.979830
<p><i>Bomarea patinii</i> Baker</p>	Carchi Cotopaxi Imbabura	0.866667 0.350000 -0.600000	-78.066.667 -78.483.333 -77.933333

 <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	<p>Napo Sucumbíos</p>	<p>0.483333</p>	<p>-77.533.333</p>
<p><i>Bomarea perglabra</i> Harling & Neuendorf</p>	<p>Cotopaxi</p>	<p>-0.966667</p>	<p>- 78.966667</p>
<p><i>Bomarea purpurea</i> (Ruiz & Pav.) Herb.</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	<p>Azuay Loja</p>	<p>-2.766.667</p>	<p>-78.616.667</p>
	<p>Morona Santiago</p>	<p>-3.983.333</p>	<p>-79.133.333</p>
	<p>Zamora Chinchipe</p>	<p>-3.000.000</p>	<p>-78.666.667</p>
	<p>Zamora Chinchipe</p>	<p>-3.966.667</p>	<p>-79.016.667</p>
<p><i>Bomarea setacea</i> (Ruiz & Pav.) Herb.</p>  <p>Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)</p>	<p>Azuay</p>	<p>-3.183.333</p>	<p>-78.783.333</p>
	<p>Bolívar</p>	<p>-1.366.667</p>	<p>-79.066.667</p>
	<p>Cañar</p>	<p>-2.600.000</p>	<p>-78.650.000</p>
	<p>Chimborazo</p>	<p>-1.966.667</p>	<p>-78.933.333</p>
	<p>Cotopaxi</p>	<p>-0.950000</p>	<p>- 78.966667</p>
	<p>Imbabura</p>	<p>-4.383.333</p>	<p>-79.116.667</p>
	<p>Loja</p>	<p>-3.000.000</p>	<p>-78.700.000</p>
	<p>Morona Santiago</p>	<p>-1.100.000</p>	<p>-78.316.667</p>
	<p>Napo Zamora Chinchipe</p>	<p>-3.583.333</p>	<p>-78.416.667</p>
<p><i>Bomarea spissiflora</i> Harling & Neuendorf</p> 	<p>Morona</p>	<p>-2.350.000</p>	<p>-78.066.667</p>
	<p>Santiago Pichincha Zamora Chinchipe</p>	<p>-0.200000</p>	<p>- 78.783333</p>

Fuente: (Tropicos Specimen Data, 2023)			
<i>Bomarea unciifolia</i> Herb.	Azuay	-2.816.667	-79.183.333
	Cañar	-2.666.667	-78.766.667
	Cotopaxi	-0.966667	- 78.933333
	Loja	-4.716.667	-79.416.667
	Morona	-3.000.000	-78.666.667
	Santiago Tungurahua	-1.433.333	-78.450.000

Elaborado por: (Tropicos Specimen Data, 2023)