



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

Estudio del gen APETALA2 como marcador molecular para identificación de especies de la familia *Orchidaceae* en los géneros *Gongora*, *Restrepia*, *Epidendrum*.

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

AUTOR: Henry David Solis Aguirre.

TUTOR: Marco Fernando Cerna Cevallos.

Quito-Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Henry David Solis Aguirre con documento de identificación N° 1724467251 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo 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,



Henry David Solis Aguirre
1724467251

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

Yo, Henry David Solis Aguirre con documento de identificación No.1724467251, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “ Estudio del gen *APETALA2* como marcador molecular para identificación de especies de la familia *Orchidaceae* en los géneros *Gongora*, *Restrepia*, *Epidendrum*.”, 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, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 1 de agosto del año 2023

Atentamente,



Henry David Solis Aguirre

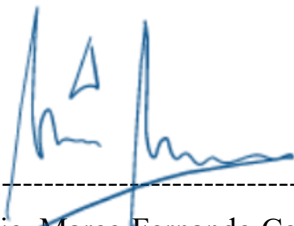
1724467251

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: ESTUDIO DEL GEN *APETALA2* COMO MARCADOR MOLECULAR PARA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE LA FAMILIA *ORCHIDACEAE* EN LOS GÉNEROS *GONGORA*, *RESTREPIA*, *EPIDEMDRUM*, realizado por Henry David Solis Aguirre con documento de identificación N°1724467251, 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

El trabajo realizado se lo dedico en primer lugar a Dios, que ha sido mi guía para alcanzar una más de mis metas, en segundo lugar, a mi esposa y compañera de vida, quien ha estado conmigo en los buenos y malos momentos que se nos han presentado y ha sido mi apoyo e inspiración para continuar luchando por nuestro futuro, además se los dedico a mis suegros, mis padres, mis hermanos, y a mi cuñada quienes me han ayudado de muchas maneras para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida y que en algún momento sabré devolverles todo lo que han hecho por mí.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana por abrirme sus puertas para continuar con mi formación profesional.

Le agradezco al Dr. Marco Cerna PhD por ser un ejemplo a seguir, por su confianza para servirle de apoyo en las diversas actividades asignadas y que ha sido un placer cumplir tratando de jamás decepcionarlo, y todas las oportunidades de crecer no solo en conocimiento, sino también como ser humano.

Agradezco también a mis profesores que han sabido compartir su conocimiento de la mejor manera, también agradecer a los laboratorios de Ciencias de la vida por su acogida y su gran talento humano.

Un agradecimiento muy especial la Ing. Elizabeth Yugsi, Ing. Erika Paredez Mg, por su instrucción y amistad, que me ha servido de mucho en todas las actividades realizadas bajo su tutela.

Además, los #AEP que me han acompañado a lo largo de toda la carrera y con los que hemos podido compartir esta bonita experiencia.

Resumen

La familia *Orchidaceae* comprende una extensa familia de plantas cuyo sello distintivo es la forma particular de sus flores en donde el gen *Apetala 2* (*AP2*) es un regulador directo de esta característica. Siendo las orquídeas especímenes que se encuentran bajo amenaza, las técnicas moleculares representan herramientas de gran impacto para la conservación de la biodiversidad al permitir la identificación rápida y certera a nivel de especie de cualquier ejemplar. Es así como el presente estudio tiene como objetivo plasmar la utilidad del gen *AP2* como un marcador molecular para la identificación de orquídeas con enfoque en especies endémicas del Ecuador como son: *Gongora*, *Restrepia* y *Epidendrum*. Para ello se llevó a cabo el diseño de los cebadores correspondientes a partir de la secuencia completa de *AP2* de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* con el fin de realizar los respectivos ensayos de *PCR* y culminar con la secuenciación. Los resultados obtenidos verificaron la funcionalidad de los cebadores diseñados *in silico*, al permitir la amplificación de bandas de 1500 pb aproximadamente con el primer juego de cebadores y de 500 pb con el segundo juego de cebadores, ambas en la especie *Epidendrum nocturnum*. No se observaron productos de *PCR* en los géneros *Restrepia*, *Gongora* y en otras especies del Género *Epidendrum*. Se concluye que el gen *AP2* podría ser considerado como marcador molecular, donde el diseño de cebadores es una tarea crucial que garantiza una adecuada identificación.

Palabras clave: *Apetala 2*, orquídeas, cebadores, *PCR*, gen

Abstract

Orchidaceae family comprises a large family of plants whose distinctive feature is its particular flowers shapes where *Apetala 2* gene is known as a straight regulator. Being orchids species threatened, molecular techniques represent tools of great impact in the field of biodiversity conservation as rapid identification at species level is possible and can be done. The aim of the present study consists in demonstrating the *Apetala 2* utility as molecular marker in order to identify types of orchids focusing on Ecuadorian endemic species: *Gongora*, *Restrepia* and *Epidendrum*. To accomplish this objective primer design was conducted from *Ap2* complete sequence of *Arabidopsis Thaliana* to perform PCR and sequencing assays. Results verified the functionality of in silico PCR primers design owing to amplification of roughly 2000bp-sized band with the first set of primers, as well as 500bp-sized band with the second set of primers, both of them in *Epidendrum nocturnum* species. PCR products were not observed in *Gongora* and *Restrepia* genus, likewise other *Epidendrum* species. In conclusion *Apetala 2* could be considered as molecular marker where primer design is critical to accurately guarantee correct identification.

Keywords: *Apetala 2*, orchid, primers, PCR, gene

Índice de contenidos

Contenido

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introducción..... | 1 |
| 2 | Fundamentación teórica | 4 |
| 2.1 | Aspectos generales de la familia <i>Orchidaceae</i> | 4 |
| 2.1.1 | Familia <i>Orchidaceae</i> en Ecuador. | 5 |
| 2.1.2 | Género <i>Góngora</i> | 6 |
| 2.1.3 | Género <i>Restrepia</i> | 7 |
| 2.1.4 | Género <i>Epidendrum</i> | 8 |
| 2.2 | Identificación de especies de la familia <i>Orchidaceae</i> | 9 |
| 2.2.1 | Identificación morfológica | 9 |
| 2.2.2 | Identificación por técnicas moleculares | 10 |
| 2.3 | Gen <i>Apetala 2 (Ap2)</i> | 11 |
| 2.3.1 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 12 |
| 2.3.2 | Función del gen <i>Ap2</i> | 12 |
| 2.3.3 | Estudios de <i>Ap2</i> en orquídeas..... | 13 |
| 2.4 | Técnica de amplificación por PCR. | 13 |
| 2.5 | Secuenciación | 14 |
| 3 | Materiales y métodos | 15 |
| 3.1 | Diseño de cebadores | 15 |
| 3.2 | Extracción de ADN por el método de <i>Doyle & Doyle</i> 1987..... | 15 |
| 3.3 | Extracción de ADN mediante Kit <i>Platinum Direct Universal PCR Master Mix</i> | 17 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3.4 | PCR con <i>Platinum Direct Universal PCR Master Mix</i> | 18 |
| 3.5 | Secuenciación <i>Sanger</i> | 18 |
| 4 | Resultados y discusión. | 20 |
| 4.1 | Diseño y verificación <i>in silico</i> de cebadores | 20 |
| 4.2 | Extracción de ADN..... | 21 |
| 4.3 | Amplificación por PCR con <i>Platinum Direct Universal PCR Master Mix</i> | 22 |
| 4.4 | Secuenciación | 27 |
| 5 | Conclusiones y recomendaciones | 29 |
| 5.1 | Conclusiones..... | 29 |
| 5.2 | Recomendaciones | 29 |
| 6 | Bibliografía..... | 30 |
| 7 | Anexos..... | 39 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.- <i>Gongora bufonia</i> :..... | 6 |
| Figura 2.- <i>Restrepia brachypus</i> | 7 |
| Figura 3 Flores del género <i>Epidendrum</i> :..... | 8 |
| Figura 4.- Detalle gráfico del proceso descrito para la extracción de ADN vegetal. | 17 |
| Figura 5.- Detalle gráfico de la extracción de ADN por <i>Kit Platinum Direct Universal PCR Master Mix</i> | 18 |
| Figura 6.- Localización de hibridación de los cebadores seleccionados..... | 21 |
| Figura 7.- Electroforesis del control positivo con los cebadores AP2-1..... | 23 |
| Figura 8.- Electroforesis realizada para los cebadores AP2-2..... | 24 |
| Figura 9.- Electroforesis del gradiente de AP2-1 | 25 |
| Figura 10.- Electroforesis de las muestras de <i>Epidendrum nocturnum</i> con AP2-1 | 26 |
| Figura 11.- Electroforesis del gradiente de PCR con los cebadores AP2-2 en la especie <i>Epidendrum nocturnum</i> | 27 |
| Figura 12.- Ensayo de secuenciación de Ap2-1 del control positivo <i>Brassica rapa</i> | 28 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1.-Lista de cebadores seleccionados y parámetros obtenidos de la herramienta <i>OligoAnalyzer</i> | 20 |
| Tabla 2.- Evaluación de la integridad de ADN de <i>Epidendrum nocturnum</i> | 22 |
| Tabla 3: Evaluación de integridad de <i>Brassica rapa</i> (Control positivo) | 22 |

Índice de anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 2.- Extracción por el método de Doyle & Doyle 1987 | 39 |
| Anexo 3.- Extracción de ADN por el método del kit Platinum Direct Universal PCR Master Mix. | 40 |
| Anexo 4.- PCR convencional | 40 |
| Anexo 5.- Programación del termociclador para PCR convencional | 41 |

1 Introducción

Las orquídeas comprenden un grupo extenso de plantas con flores, se las puede encontrar alrededor de todo el planeta, sobre todo en las zonas tropicales en donde se encuentra la mayor diversidad, entre 25000 a 35000 especies dentro de 750 a 850 géneros (OssenbaCh & Rudolf, 2021). Tienen un alto valor ornamental a causa de sus flores llamativas y características, también han tenido aplicaciones en la industria cosmética, perfumería y farmacéutica (Sut et al., 2017). Debido a la forma particular de sus flores, es la segunda familia más grande después de la *Asteraceae*, es por ello que en la identificación de las especies es común encontrarse con nuevas especies o variaciones de una misma especie (Chase et al., 2015).

A causa de los diferentes pisos climáticos que tiene el Ecuador se puede apreciar la gran diversidad de géneros a ser estudiados para una mejor identificación de las especies, además de las 4187 especies de orquídeas registradas en nuestro país, 1707 son endémicas, y pueden encontrarse entre los 300 a 3000 m s.n.m. concentrándose la mayor parte en la base de las montañas andinas, sin embargo, a pesar de la riqueza ecológica que representan las orquídeas, estas se ven afectadas por la reducción de los ecosistemas nativos debido a la tala de bosques y principalmente por incendios en las montañas para la expansión agrícola, perdiéndose así la oportunidad de encontrar variantes o nuevas especies (Mites et al., 2022).

Dentro de los diversos estudios realizados sobre orquídeas, la tarea más complicada es la identificación de las especies, si bien es cierto existen rasgos muy marcados entre géneros como: *Gongora*, *Restrepia*, *Epidendrum*. La diferenciación entre especies se puede realizar de manera tradicional por medio de la morfología y características citológicas, donde se ha podido relacionar a las especies sin tomar en cuenta las condiciones ambientales y de desarrollo, lo que no permite una identificación de especies de manera eficaz, es por ello que con el desarrollo de técnicas moleculares se puede mejorar la separación de los niveles de filogenia y taxonomía e

incluso se puede precisar la tendencia evolutiva. Una de las técnicas utilizadas para encontrar las variaciones genéticas de las especies es la PCR convencional empleando marcadores moleculares como *matK*, *rpoC1*, y *yfc1* (Hossain et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente la característica más representativa de las orquídeas es la forma peculiar de sus flores, por lo que se necesita esperar el tiempo de floración para poder identificar las especies (Salemme, 2013), sin embargo, la morfología de las flores está ligada a un gen regulador que controla el desarrollo de los órganos florales, en especial la formación de los sépalos y pétalos, donde se observa la influencia de un gen homeótico denominado *Apetala 2* (*Ap2*) (Sharma et al., 2020a). El gen juega un papel fundamental para la identificación de especies, ya que contiene regiones conservadas y zonas variables donde se ha analizado la expresión génica de los órganos florales para encontrar el origen de la diversidad de formas que tienen las flores (Zeng et al., 2021).

En adición, Cardona (2017) y Yang (2017), coinciden en que los primeros hallazgos de la importancia del gen *Ap2* se realizaron en *Arabidopsis thaliana*, de la cual es una de las pocas especies que se tiene la secuencia del genoma completo, por lo que se toma como modelo para realizar diversos análisis moleculares enfocados a los órganos florales (Zeng et al., 2021). En la familia *Orchidaceae* únicamente se han realizado estudios donde se obtienen segmentos de las pruebas de expresión génica, que son secuencias únicamente de exones, pero no se tiene una secuencia completa de la cual se pueda extraer segmentos que puedan ser utilizados como marcadores moleculares para identificar especies por la técnica de BARCODE (Zeng et al., 2021).

Según estudios en orquídeas realizados por Yang (2015) y Zeng (2021) de las especies *Cymbidium ensifolium* y *Dendrobium officinale* respectivamente, se mencionan que ensayos de

expresión génica junto con la determinación de factores de transcripción permiten encontrar información sobre el gen regulador que da forma a las flores, por lo que ambos autores coinciden en que a partir del conocimiento del gen *Ap2* en *A. thaliana* como modelo vegetal, se obtiene secuencias de cDNA homólogas al gen, demostrándose la existencia de regiones conservadas en las dos especies de orquídeas.

De esta manera el objetivo del presente trabajo fue estudiar el gen *Apetala 2* como marcador molecular para usarlo en la identificación de especies en los géneros *Gongora*, *Restrepia*, *Epidendrum* de la familia *Orchidaceae* buscando variaciones genéticas entre ellas, para lo cual fue necesario iniciar con el diseño de cebadores *in silico* usando la herramienta BLAST de la biblioteca NCBI, posteriormente se comprobó la amplificación del gen *Ap2* en especies de los géneros antes mencionados, y finalmente se obtuvo las secuencias del gen para observar su variabilidad y usarlas como base de datos para su identificación.

2 Fundamentación teórica

2.1 Aspectos generales de la familia *Orchidaceae*.

La familia *Orchidaceae* es un grupo de especies vegetales considerada la segunda más grande después de *Asteraceae* (Chase, 2015), perteneciente a las angiospermas monocotiledóneas. Esta familia se encuentra distribuida alrededor del mundo y se considera que ha tenido una mayor evolución comparada con otras especies vegetales. La etimología del nombre de la familia proviene del griego “orchids” que significa testículo, debido a que presenta una forma tuberculosa o de bulbos (Sut, 2017).

Se considera que contiene entre 25,000 a 30,000 especies que se clasifican en 900 géneros repartidos alrededor de todo el planeta con excepción de los polos y desiertos, por lo general crecen en zonas tropicales y subtropicales. Cabe destacar que, a partir de los respectivos estudios de ADN, se ha podido determinar que las orquídeas han existido desde hace 74 a 84 millones de años, y han pasado por diversos procesos evolutivos que han ido desarrollando para adaptarse a los diferentes entornos, lo cual ha llevado a que las orquídeas crezcan de manera epífita (70%), geófitas (25%), saprófitas y lithiófitas (5 %) (Hossain, 2013).

Las orquídeas son usadas en su mayoría como plantas ornamentales por sus flores complejas y elegantes (Eray, 2020), indudablemente se han convertido en un artículo de colección cotizado por altas sumas de dinero, también juegan un papel fundamental en la medicina herbal, considerando que sus primeros usos fueron con este propósito (Musharof, 2011).

Una de las razones y la más llamativa por la que las orquídeas han alcanzado un nivel alto de atención (como planta ornamental o sujeto de estudio), es la forma peculiar y diversa de la morfología floral que tienen estas plantas. Debido a la evolución, sus flores han sido modificadas adquiriendo diferentes características, por ejemplo, en su mayoría las orquídeas

presentan inflorescencias como racimos, sin embargo, hay especies que presentan una flor solitaria (*Paphiopedilum*). Las inflorescencias varían en función del género y la especie, en orquídeas terrestres la inflorescencia es terminal (con sus excepciones) y en la mayoría de las epífitas son laterales (De, 2020). Van Doorn, (2021) describe que las orquídeas tienen flores simétricas bilaterales, presentan tres sépalos y tres pétalos dispuestos en dos apéndices espirales coloreados en forma de hojas, dichos apéndices pueden ser llamados tépalos; el pétalo central de mayor tamaño es llamado labelo y tiene la función de servir como pista de aterrizaje para insectos, además la flor tiene fusionada el androceo y el gineceo en una sola estructura llamada columna.

2.1.1 Familia *Orchidaceae* en Ecuador.

Ecuador al tener las cuatro regiones es favorecido con zonas que proveen de condiciones adecuadas para el crecimiento de las orquídeas, a pesar de ser un país pequeño contiene una gran diversidad de pisos climáticos que van desde los 1000 a los 3500 m s. n. m. (Quijia, 2023). La mayor diversidad de las especies de orquídeas se concentra en los bosques de la región andina, un factor adicional que ha ayudado a su propagación es la influencia que tiene las corrientes oceánicas cálidas de “El Niño” y corrientes frías de “Humboldt”, además de un fuerte régimen de lluvias lo que ha logrado proporcionar el entorno ideal para el crecimiento de las orquídeas en Ecuador, ya que existen alrededor de 4187 especies registradas donde 1707 son endémicas (Mites, 2022).

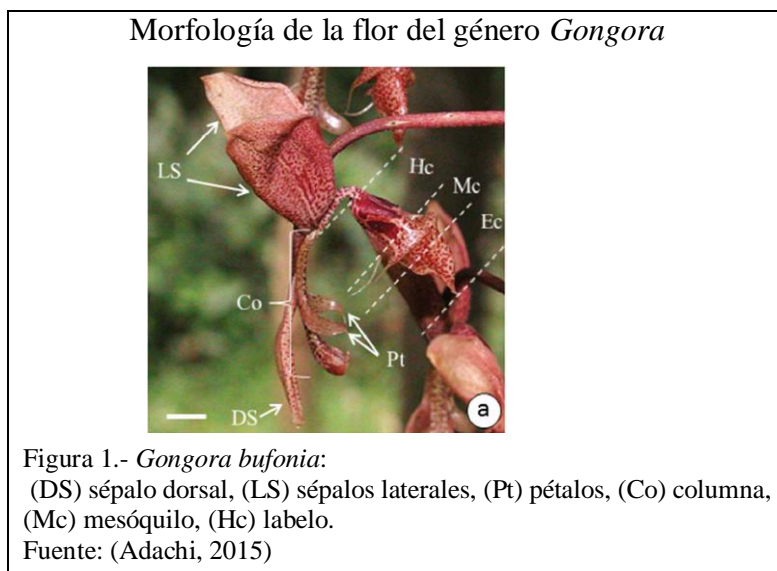
La recolección de especies silvestres en Ecuador para uso comercial local e internacional es una de las mayores invitaciones a la conservación de esta familia vegetal (Quijia, 2023), ya que debido a la actividad agrícola, ganadera y junto con la expansión de ciudades y pueblos se destruyen los ecosistemas nativos por la deforestación e incendios, adicionalmente la relación

ecológica de las orquídeas con los microorganismos y polinizadores limita en muchos casos su desarrollo y supervivencia (Mites, 2022).

2.1.2 Género *Góngora*

Las orquídeas del género *Góngora* habitan en ambientes neotropicales de manera epífita, y posee un mecanismo especializado de polinización, produciendo químicos volátiles con el fin de atraer a los polinizadores, dichos químicos tienen una fuerte fragancia que se puede percibir en las mañanas, lo cual indica el momento del día en el que los polinizadores tienen su mayor actividad (Hetherington, 2015). El género *Gongora* puede ser observado a una altura entre 600 a 1800 m s. n. m. en particular en bosques de zonas montañosas (Hernández, 2022).

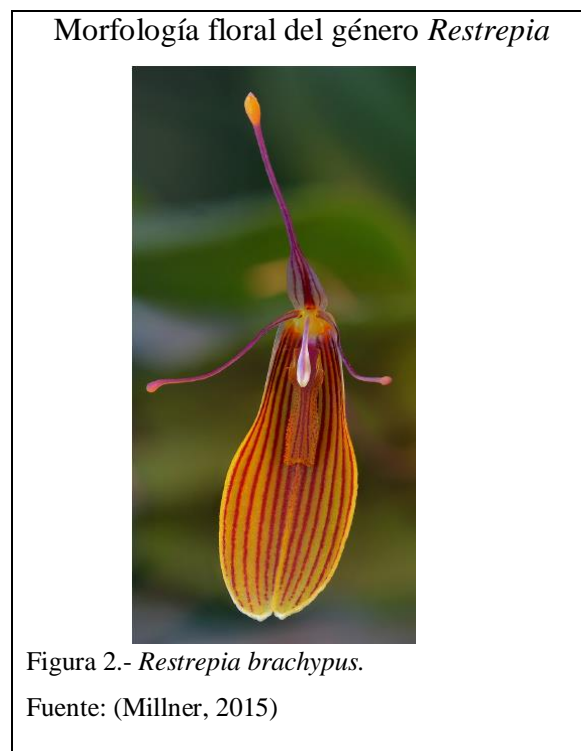
Tienen un pseudo bulbo relacionado con un nuevo brote, donde se forman las inflorescencias péndulas basales, sus flores presentan hermafroditismo y el labelo tiene una articulación en la parte baja de la columna, además el estigma cuenta con una ranura estrecha detrás del rostelo, lo que se puede apreciar en la Figura 1. El tiempo de floración no sobrepasa los 6 días (Hernández Ramírez, 2022).



2.1.3 Género *Restrepia*

El género *Restrepia* es un grupo pequeño de orquídeas, que comprende 61 especies pertenecientes a la subfamilia *Pleurothallidinae*, se las puede encontrar en América central, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, ya que su crecimiento se produce en sectores elevados entre 1000 a 3000 m s. n. m. en zonas de bosques lluviosos en las montañas. Se ha reportado que en Ecuador las plantas epífitas corresponden al 30% de las plantas vasculares, donde las especies del género *Restrepia* abarcan gran parte de la diversidad de las epífitas (Millner, 2020).

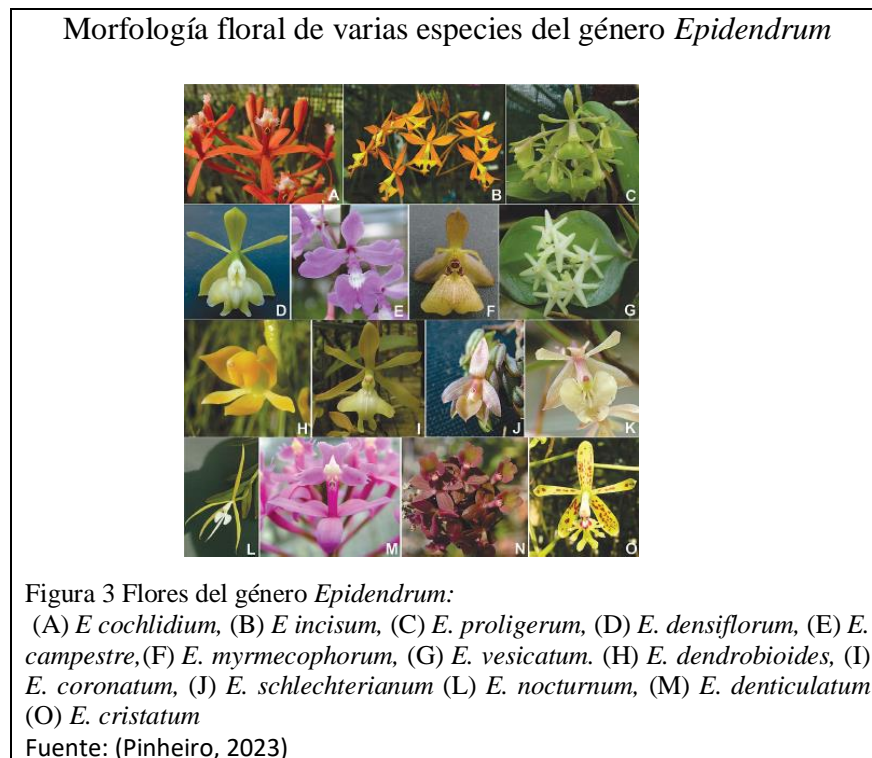
Las flores del género *Restrepia* tienen características donde se puede apreciar: un sépalo dorsal delgado y largo, 2 pétalos elongados como filamentos y con forma de bastón en el ápice conteniendo osmóforos con forma de espina, al pie de la columna se aprecia un callo a cada lado, la columna es delgada y contiene las anteras y el estigma, un pequeño labelo con una bifurcación, como se puede observar en la Figura 2 (Millner, 2016).



2.1.4 Género *Epidendrum*

Este género tiene su hábitat en las zonas neotropicales, le pertenecen 1500 especies y gracias a la diversidad morfológica el género *Epidendrum* se ha convertido en modelo de varios estudios sobre algunas incógnitas de la evolución, por ejemplo: selección de hábitat, biología reproductiva, mecanismos de polinización, especiación y aislamiento reproductivo (Pinheiro, 2023).

Las especies del Género *Epidendrum* se pueden encontrar en las tres regiones del Ecuador y crecen en alturas que van desde los 1000 a 3500 m s. n. m., son plantas epífitas que poseen inflorescencias con ramificaciones simpodiales, con una altura de 20-50 cm con la característica de un tallo tipo bastón, sus hojas tienen una textura dura y flexible, sus flores son verdosas e invertidas y sin fragancia, en la Figura 2 se puede apreciar la forma característica del género (Quijia et al., 2023).



2.2 Identificación de especies de la familia *Orchidaceae*

Dada la gran diversidad y adaptación que presentan las especies de la familia *Orchidaceae* se convierte en un arduo trabajo identificarlas, por lo que la segregación de especies se la realiza generalmente comparándolas entre géneros y no se basan en recientes taxones descubiertos. La identificación morfológica permite una separación entre géneros debido a diferencias marcadas, sin embargo, el problema radica en la dificultad para discernir si se trata de un nuevo género, especie o variación, es por ello que es necesario otras formas para identificarlas, por ejemplo, analizando el ADN de las orquídeas (Chase, 2015).

2.2.1 Identificación morfológica

Para la identificación de especies vegetales normalmente se toma en cuenta los aspectos morfológicos adquiridos a través de la evolución y el gran poder de adaptación que tienen las plantas, para ello se consideran varios aspectos como son: raíces, tallo, hojas, flores (si las posee), frutos (si las produce), lugar y condiciones ambientales de crecimiento, forma de obtención de nutrientes, etc. (Ormerod, 2016).

En el caso de las orquídeas, su gran diversidad se debe a la enorme diversificación de las flores, por lo que ha ganado mucha fama por su abundante abanico de fantásticas y extrañas variaciones. La evolución ha permitido que la familia *Orchidaceae* pueda sobrevivir a una infinidad de condiciones ambientales entre ellas: fotoperíodo (períodos de floración) y simbiosis con micorrizas (obtención de nutrientes), además esta evolución ha desencadenado que exista una relación entre la forma floral y el tipo de polinizador específico para cada género (Hsiao, 2011). Por lo tanto, estas son adaptaciones y estrategias que generan cambios morfológicos usados al momento de identificar especies (Li, 2022).

2.2.2 Identificación por técnicas moleculares

Con el avance de la tecnología se han adaptado diferentes técnicas que permiten realizar una identificación más clara de la taxonomía de las plantas, encontrando diferencias y similitudes entre individuos usando la huella genética de cada ser vivo (ADN), la cual se compara con una plantilla obtenida previamente de otro individuo muy bien identificado, ayudando a comprobar su identidad por el porcentaje de similitud entre las secuencias de ADN, a esta técnica se la denomina “código de barras” ADN Barcode, procedimiento que se realiza usando una secuencia de referencia (Coissac, 2016).

El ADN Barcode usa un fragmento de ADN estandarizado como una herramienta de identificación de especies, que permite una evaluación de la diversidad, historia de la vida, estudios ecológicos y análisis forenses, un ejemplo de ello se encuentra en el reino Plantae, donde se aplican códigos de barras de fragmentos representativos de regiones tales como: *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoCl*, *trnH-psb*, *ITS* y *ycf1* (Cheng, 2016). A pesar de los múltiples estudios existen problemas que limitan la técnica de ADN Barcode, ya que no todas las secuencias antes mencionadas sirven para todos los grupos de plantas, lo que perjudica su amplificación (PCR) y secuenciación (Choudhary et al., 2021).

Para identificar especies y realizar árboles filogenéticos es necesario seguir un proceso de amplificación de los fragmentos de ADN que se usarán como código de barras, para realizar la secuenciación respectiva y posterior a ello la alineación de los fragmentos secuenciados con genes de referencia, los cuales sirven como molde para verificar la identidad de los individuos analizados (Coissac, 2016).

2.3 Gen *Apetala 2* (*Ap2*)

La floración es un evento que ocurre en épocas específicas del año como la primavera, en la que los factores ambientales, estacionales y biológicos son adecuados para la activación de sistemas de regulación que modelan las flores según su especie, esto se debe a que la evolución y separación de las mismas se han ido acumulando en forma de variaciones genéticas que caracterizan a las familias vegetales, en donde se activan procesos regulatorios en lugar de una eliminación de regiones no utilizadas del gen, dichos mecanismos de regulación están ligados a grupos de genes altamente conservados encargados de codificar los denominados factores de transcripción (Debernardi, 2022).

La formación de las flores requiere que se establezcan cuatro tipos de órganos que se disponen de manera espiral, estos son: sépalos y pétalos que constituyen el perianto estéril, mientras que los estambres y carpelo corresponden a los órganos sexuales masculino y femenino, cada uno cumple funciones específicas para que la reproducción se lleve a cabo, estas características morfológicas de las flores corresponden a cada especie, y son controladas por un grupo de 3 tipos de genes homeóticos *APETALA 1* (*Ap1*), *APETALA 3* (*Ap3*) y *PISTILLATA* (*PI*) (Wollmann, 2010). Para realizar los análisis se toma como modelo a la especie *Arabidopsis thaliana*, de la cual se tiene la secuencia completa del gen (Shoesmith, 2021).

Se consideran también los genes comprendidos en un modelo de desarrollo floral llamado ABC, donde se puede tomar cada letra como una clase, por ejemplo, la clase A comprende a los genes *Ap1*, *SQUA* y *Ap2*, la clase B contiene *PI* y *Ap3* y en la clase C se encuentra el gen *AG*, con los cuales el funcionamiento de los factores de transcripción permite entender porque cada especie tiene un tipo de morfología floral específico (Sharma, 2020).

2.3.1 *Arabidopsis thaliana*

Esta especie está dentro de la familia *Brassicaceae*, y podemos disponer de la secuencia de su genoma desde el año 2000, es originaria de Europa y Asia central, puede adaptarse a diversas condiciones para su desarrollo llegando a crecer hasta los 4250 m s. n. m. y debido a ello ahora se la puede encontrar en casi todo el planeta (Koornneef, 2004). Con las secuencias de la especie *Arabidopsis thaliana* se han hecho pruebas para identificar las regiones de ADN que regulan y controlan el desarrollo de la planta en general (Cardona, 2017). A lo largo de la historia las plantas con flor (angiospermas) han evolucionado de tal manera que cada una tiene características especiales en sus flores, eso quiere decir que, al momento de la separación de las familias vegetales y la aparición de una nueva especie, se tiene modificaciones en el ADN en las cuales se van guardando patrones repetitivos que permiten diferenciar o emparejar a las especies (Yant, 2010).

Arabidopsis thaliana y el género *Brassica* se encuentran estrechamente relacionados entre sí, un ejemplo de ello es la especie *Brassica rapa*, que cuenta con copias de genes ortólogos para algunos de los genes de *Arabidopsis thaliana* (Akter et al., 2021). La especie *Brassica rapa* ha sido utilizada incluso en prácticas experimentales de centros educativos como colegios y universidades, siendo sustituto de *Arabidopsis thaliana* con el objetivo de estudiar el desarrollo vegetal (Woodward, 2018).

2.3.2 Función del gen *Ap2*

Los factores de transcripción juegan un papel fundamental para el correcto funcionamiento de las células, son los que regulan la expresión o silenciamiento de secciones de ADN, en donde el gen *Ap2* contiene la información necesaria para codificar una serie de dichos factores, es por ello, que este gen es considerado uno de los mayores representantes entre los genes encargados

del desarrollo de las estructuras florales, denominándose por esta razón como gen homeótico (Jofuku, 2005).

La única fuente completa de información del gen *Ap2* es la proporcionada por la especie *Arabidopsis thaliana*, de la cual se conoce que el gen se encuentra en el cromosoma 4 y es considerado como una super familia codificante de proteínas, en donde el gen tiene un tamaño de 3718 pb, siendo las regiones más conservadas del gen las que se encuentran representadas con una franja verde oscura tal como se observa en el Anexo 1, también, se identifica que las secciones que muestran una línea eran las que contenían la mayor variabilidad, (NCBI, 2023). Un hecho como tal, es que hasta la presente fecha no existe un único gen que pueda ser considerado como un candidato ideal a DNA barcode que sea invariable entre especies y diferente entre especies, por lo que estudios en este campo son de gran importancia con el fin de identificar nuevas alternativas a los locus ampliamente conocidos Barcodes universales *rbcL* y *matK* (Choudhary, 2021).

2.3.3 Estudios de *Ap2* en orquídeas

La importancia del gen *Ap2* en el modelamiento de las flores tienen como consecuencia los estudios de la presencia del gen en otras familias, tal es el caso de la familia *Orchidaceae* que tiene múltiples formas de flores característico de cada género, y además se han realizado estudios de expresión génica enfocados en los factores de transcripción responsables de regular y moldear los órganos florales, en dichos estudios se busca las secuencias homólogas del gen *Ap2* presente en *A. thaliana* en los géneros *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Oncidium*, y *Phalaenopsis* (Li, 2022).

2.4 Técnica de amplificación por PCR.

LA PCR es una técnica que ha permitido obtener copias de secciones específicas de ADN, simulando los mecanismos de replicación normal del ciclo celular, usando pares de pequeños

fragmentos de entre 18 a 25 nucleótidos llamados *primers* o cebadores, que se adhieren al ADN objetivo que se desea analizar, lo que da lugar al inicio de la replicación de una sección determinada, en la cual actúa una ADN polimerasa que puede realizar la unión de nucleótidos para formar la nueva cadena, este proceso se lo realiza por varias ocasiones o ciclos que dan como resultado múltiples copias del fragmento de interés, con los cuales se puede realizar múltiples análisis posteriores a la amplificación (Cheng et al., 2016).

2.5 Secuenciación

La secuenciación Sanger es una nueva reacción de amplificación, sin embargo, no se obtienen copias de los fragmentos deseados. La técnica se realiza colocando nucleótidos modificados denominados ddNTPs o dideoxinucleotidos trifosfatos, que cuentan con una molécula emisora de fluorescencia que va a ser detectada al momento de unirse a la cadena diana, cada emisión de luz genera picos de colores representativos para cada nucleótido, dando como resultado un electroferograma, donde se puede apreciar de qué manera se encuentran distribuidos los nucleótidos en la secuencia, obteniéndose así la información necesaria para compararla con secciones codificadas y almacenadas en bases de datos empleadas en análisis para el diagnóstico de enfermedades, filogenia, mutaciones de ADN, etc (Alcántara, 2021).

3 Materiales y métodos

3.1 Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se realiza una búsqueda del gen *Apetala 2* o *AP2* de la familia *Orchidaceae* en la biblioteca virtual NCBI (*National Center for Biothechnology information*), donde únicamente se encuentran secuencias de fragmentos parciales del mismo (NCBI, 2023). Al no disponer de una secuencia molde propia de esta familia se empleó como modelo la especie *Arabidopsis thaliana* (Krogan, 2012).

De acuerdo con Choudhary (2021) el correcto diseño de cebadores toma en cuenta además las siguientes características propias de un marcador de identificación molecular adecuado:

1. Ser universal y albergar suficiente información filogenética.
2. Las regiones que flanquean la secuencia variante deben ser regiones lo suficientemente conservadas.
3. No debe ser tan larga de manera que sea posible su amplificación y posterior secuenciación.

La secuencia completa del gen *AP2* se coloca en la herramienta *Primer3Plus*, de la cual se generan varios juegos de cebadores (Primer3Plus, 2023), los cuales son analizados para verificar la especificidad de ellos en la herramienta BLAST, y que cumplan con todos los parámetros de aceptación evaluados en la herramienta OligoAnalyzer, (2023).

3.2 Extracción de ADN por el método de *Doyle & Doyle* 1987.

En la segunda etapa se lleva a cabo la extracción de ADN del material vegetal por el método clásico de *Doyle & Doyle* 1987, el cual se describe en la Figura 4, donde: se corta con la base de una punta de micropipeta de 1000 uL una parte de la muestra del material vegetal (A) de aproximadamente 50 mg, y se coloca en un microtubo de 1.5 mL (B), se agrega 480 µL de *Buffer* de Lisis y se procede a triturar la muestra con ayuda de un taladro portátil para romper

la pared celular y liberar el material genético de la muestra, a continuación, se añade 75 uL de SDS al 10% y se mezcla por inversión de 5 a 8 veces (C), posteriormente se coloca en el termo bloque previamente calentado a 65°C por 10 minutos (D), se añade 94 uL de acetato de potasio y se homogeniza la muestra (E), para luego colocarlas en hielo durante 30 minutos (F). Posteriormente se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos (G) y se procede a transferir el sobrenadante a un nuevo tubo (H) y se adiciona 600 µL de fenol: cloroformo en proporciones (1:1) (I), se centrifuga nuevamente a las mismas condiciones (J), luego se transfiere a un nuevo tubo aproximadamente 200 uL (K) y se agrega 360 µL de isopropanol frío (L), se almacena a -20°C por 3 horas o se la deja toda una noche para condensar el ADN (M), luego se retira del congelador y se centrifuga a las mismas condiciones antes mencionadas (N), se elimina el líquido sobrenadante mediante inversión (O), como siguiente paso se realiza tres lavados con etanol al 70% (Q) y se centrifuga por 3 minutos a 12000 rpm (se repite por tres ocasiones los procesos N,O y Q), finalmente, en un termo bloque se evapora el alcohol restante y se resuspende el pellet que contiene el ADN en 30 µL de TE 1X (TrisCl 10mM y EDTA 1 mM) o en la misma cantidad de agua libre de nucleasas (R) y se almacena a -20°C (Cerde, 2013).

Esquema del proceso de extracción de ADN vegetal por el método de *Doyle & Doyle* (1987)

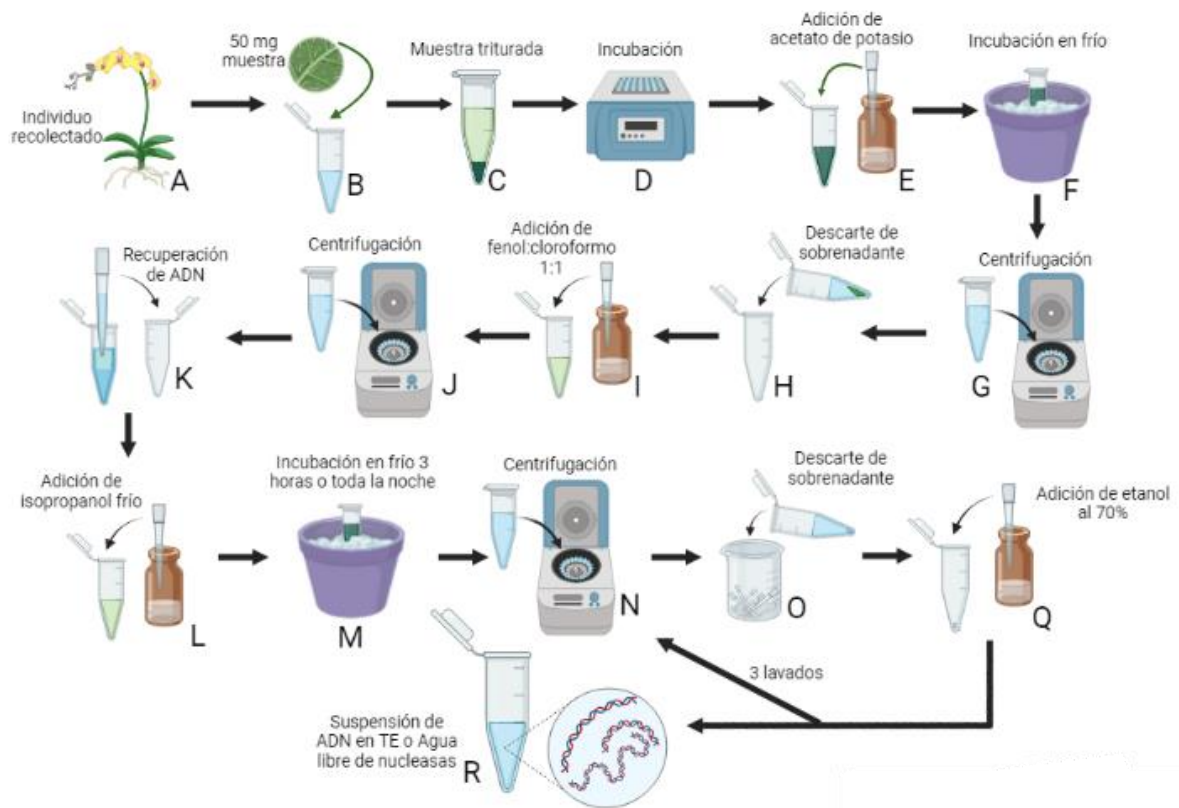
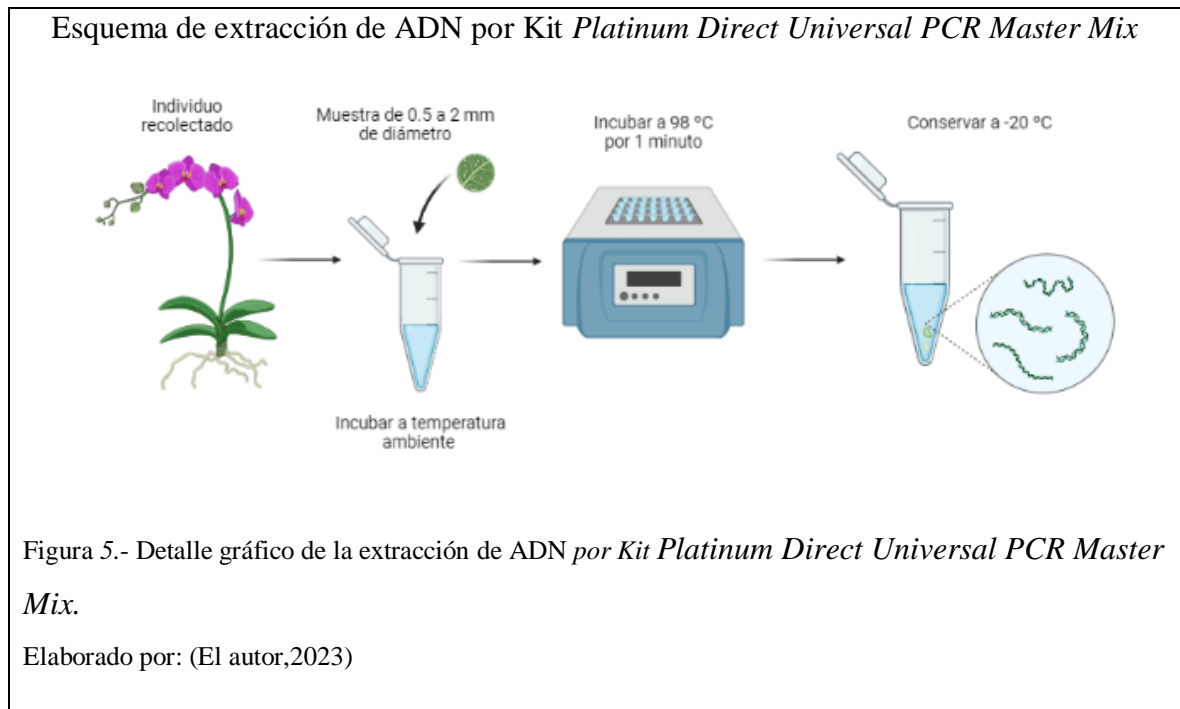


Figura 4.- Detalle gráfico del proceso descrito para la extracción de ADN vegetal.

Elaborado por: (El autor,2023)

3.3 Extracción de ADN mediante Kit *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*

En el método que describe el kit se muestra en la figura 5, donde se precalienta el termo bloque a 98°C, se toma 20 uL del buffer de lisis mezclado con 0.6 uL de proteinasa K en un micro tubo, se añade la muestra de un tamaño entre 0,5 -2 mm de diámetro y se incuba a temperatura ambiente durante al menos un minuto, se coloca el tubo en el termo bloque precalentado y se incuba por 1 minuto, finalmente se centrifuga el lisado y se conserva de 4 a -20 °C (Invitrogen, 2019).



3.4 PCR con *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*

Con el ADN extraído se amplifica la región AP2 mediante el uso del kit comercial *Platinum Direct PCR Universal Master Mix*, para ello se prueba diferentes concentraciones de la mezcla tomando en cuenta un volumen total de 25 uL. Para la amplificación se utiliza un termociclador convencional *MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler*, este se programa con las siguientes condiciones: una desnaturalización a 94°C por 2 minutos, una segunda desnaturalización a 94°C por 15 segundos, para la hibridación se coloca la temperatura de *annealing* de cada cebadores por 15 segundos y una elongación a 68°C por 25 segundos por 40 ciclos, al protocolo se añade otra elongación a 68°C por 1 minuto, finalmente se conserva a 4°C (Invitrogen, 2019).

3.5 Secuenciación *Sanger*

Para la secuenciación se sigue el método estandarizado en el laboratorio de Ciencias de la vida, donde se purifican 2 uL de amplicones usando la misma cantidad de *ExoSAP*, se incuba 15 minutos a 37°C y luego por 15 minutos a 80°C, para la reacción de secuenciación se usa 8 uL de *BigDye reaction mix* con 2 uL de uno de los cebadores, 2 uL del amplicon y se completa con

agua libre de nucleasas hasta 20 uL de solución final, se usa el programa guardado en el termociclador, luego se purifica mezclando 10 uL de *BigDye xterminator*, 10 uL de producto de secuenciación, 45 uL de SAM y se completa con agua libre de nucleasas hasta llegar al volumen 65 uL, para finalizar se coloca en el vórtex por 30 minutos, se centrifuga la microplaca y se la coloca en el equipo *Sanger*. Después de que el equipo termina el proceso de secuenciación se obtiene un electroferograma, que indica el ordenamiento de los nucleótidos del fragmento analizado y después se realiza una limpieza en el programa *Mega* y para obtener las secuencias esperadas (Alcántara, 2021).

4 Resultados y discusiones.

4.1 Diseño y verificación *in silico* de cebadores

Se obtuvieron 10 pares de cebadores con el programa *Primer3plus* a partir de la secuencia consenso del gen *AP2* de *Arabidopsis thaliana*. Únicamente 3 de ellos cumplieron con los parámetros adecuados como se observa en la Tabla 1. Los cebadores fueron evaluados en el programa *OligoAnalyzer* acorde a los siguientes parámetros descritos por Chuang (2013): temperatura de *melting* (T_m) entre 55 y 65 °C, longitud de cebadores entre 16-18 nucleótidos, diferencia de temperatura de *melting* entre los cebadores *forward* y *reverse* no mayor a 5 °C, energía libre de Gibbs (ΔG) de *hairpins*, dímeros y heterodímeros mayor a -9 kcal/mol y por último T_m de *hairpins* no superior a la T_m de los cebadores candidatos.

Tabla 1.-Lista de cebadores seleccionados y parámetros obtenidos de la herramienta *OligoAnalyzer*.

| Nombre | Secuencia | T_m °C | Dímeros | Hairpins | | Heterodímeros |
|--------|-----------------------------|----------|---------------------|---------------------|----------|---------------------|
| | | | ΔG kcal/mol | ΔG kcal/mol | T_m °C | ΔG kcal/mol |
| AP2-1F | 5' CCCACTTGTCACCCATCAGT 3' | 57.1 | -2.94 | 1.03 | 3.5 | -6.37 |
| AP2-1R | 5' TCGGTGTCGAACAAACCCAA 3' | 57.1 | -6.76 | -1.07 | 41.4 | |
| Ap2-2F | 5' GGGAAAGCTCGAATGGGTCAA 3' | 57.4 | -6.76 | 0.19 | 22.2 | -7.48 |
| Ap2-2R | 5' ACCCTGAGCCGCATATCTTG 3' | 57.2 | -3.91 | 0.58 | 14.7 | |
| AP2-3F | 5' TGAGCTTGGGAAATTCGGCT 3' | 57.1 | -6.34 | -0.52 | 32 | -7.91 |
| AP2-3R | 5' GAAGCCATTTGTCTGCAGCC 3' | 57.2 | -10.24 | -0.23 | 21.8 | |

Elaborado por: (El autor, 2023)

Se realizaron ensayos *in silico* o también llamados ensayos de modelado por computadora, esto para verificar la efectividad de los cebadores que posteriormente serían probados de manera experimental, con lo que se evaluó si los 3 pares de cebadores previamente diseñados se alineaban o coincidían con la secuencia del gen *AP2* en *A. thaliana* (Figura 6) y en especies de la familia *Orquidaceae*, encontrándose un adecuado emparejamiento entre las secuencias del cebador y el gen *Apetala 2* (Awad, 2017).

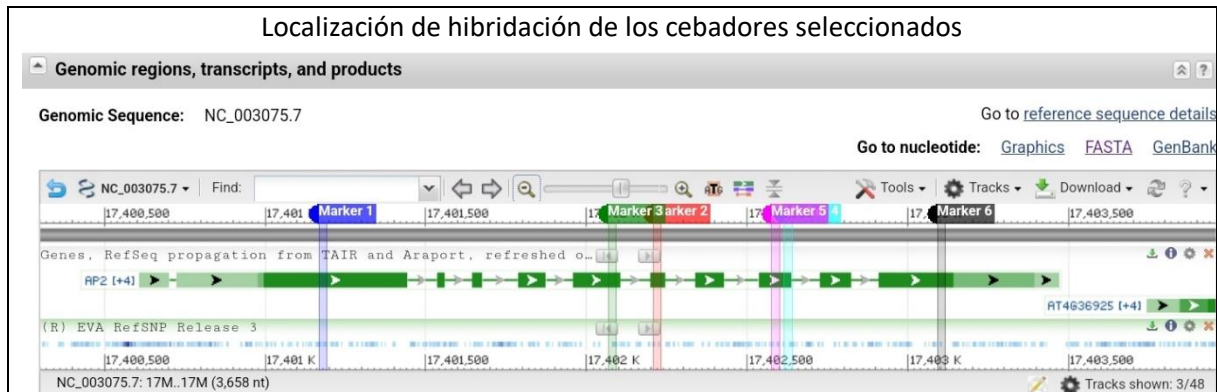


Figura 6.- Localización de hibridación de los cebadores seleccionados
 Verificación *in silico* del sitio de hibridación de los cebadores seleccionados con la secuencia del gen AP2, donde Marker1 corresponde a AP2-1F, Marker2 pertenecen a AP2-1R, Marker3 es Ap2-2F, Marker4 es AP2-2R y finalmente Marker5 y Marker6 representan a AP2-3F y Ap2-3R respectivamente. Donde F es forward y R es reverse
 Fuente: (NCBI, 2023)

Las investigaciones que incluyen el diseño de cebadores del gen *Apetala 2* se basan en su mayoría en secuencias exónicas, es decir están dirigidos a regiones codificantes del gen (Wu et al., 2022). Existe una escasez de información de la secuencia completa, por lo que su identificación y caracterización no ha sido ampliamente estudiada como la regulación de su expresión génica frente a varios factores (Wu et al., 2022). La variabilidad genética es un evento que garantiza la adaptación de una especie, por lo cual es crucial que cada par de cebadores delimiten las regiones más variables, demostrando así el potencial del gen como marcador molecular que podría ser candidato a *Barcoding* (Dong, 2015).

4.2 Extracción de ADN

A partir del método de *Doyle & Doyle* (1987) se obtuvieron 5 muestras de ADN de la especie *Epidendrum nocturnum*, y 4 muestras de ADN de la misma especie empleando el kit *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*. Con el mismo kit además se realizó la extracción de 5 muestras de *Brassica rapa*, especie que se usó como control positivo. La evaluación de concentración y calidad del ADN extraído se realizó en el equipo *Nanodrop*, donde se obtuvieron los valores que se muestran en la Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2.- Evaluación de la integridad de ADN de *Epidendrum nocturnum*.

| Método | Muestras | Concentración ng/uL | A260/A280 |
|------------------------------------|----------|------------------------|-----------|
| <i>Doyle & Doyle</i> (1987) | 1 | 213.62 | 2.011 |
| | 2 | 69.378 | 1.855 |
| | 3 | 99.918 | 2.68 |
| | 4 | 108.82 | 1.81 |
| | 5 | 44.01 | 1.793 |
| <i>Platinum Direct</i> | 1 | 170.4 | 1.26 |
| | 2 | 76.6 | 1.29 |
| | 3 | 122.8 | 1.27 |
| | 4 | 182.6 | 1.14 |

Elaborado por: (El autor, 2023)

Tabla 3: Evaluación de integridad de *Brassica rapa* (Control positivo)

| Muestras | Concentración ng/uL | A260/A280 |
|----------|------------------------|-----------|
| 1 | 296.4 | 1.40 |
| 2 | 165 | 1.22 |
| 3 | 218 | 1.33 |
| 4 | 178.2 | 1.37 |
| 5 | 246.5 | 1.31 |

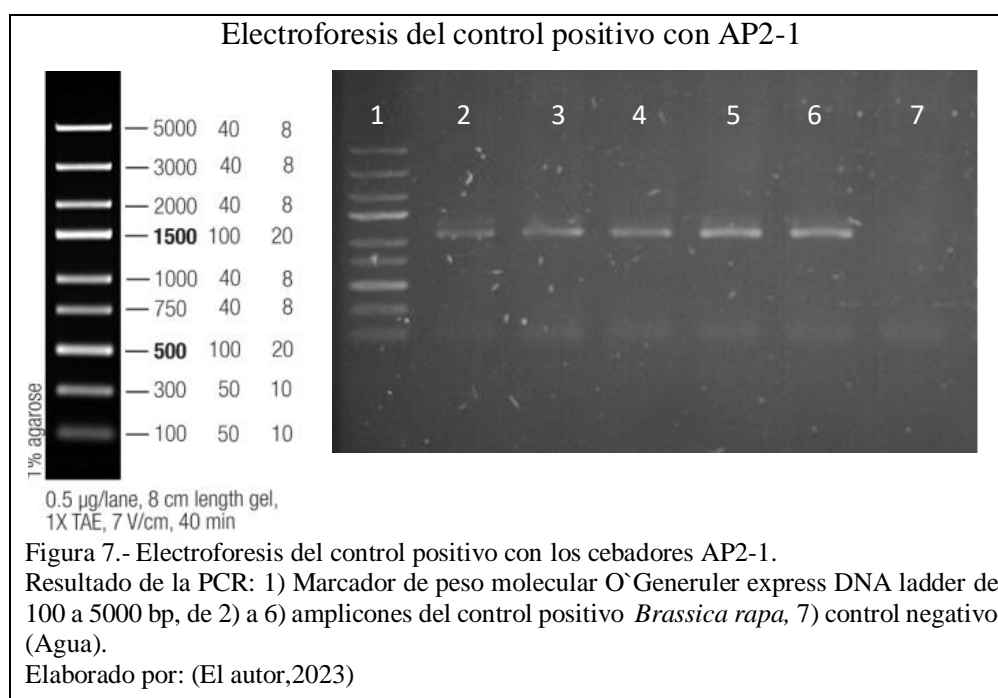
Elaborado por: (El autor, 2023)

Los valores obtenidos muestran una baja concentración de ADN con ambos métodos, en tanto que el ratio de absorbancia A260/A280 con el método *Doyle & Doyle* indica una buena calidad de ADN, lo que no ocurre con el método *Platinum Direct*, ya que según lo descrito por Aboul (2019), un ratio inferior a 1.8 sugiere contaminación por fenoles en las muestras, lo cual podría inhibir la reacción de PCR.

4.3 Amplificación por PCR con *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*

Para la verificación experimental del funcionamiento de los cebadores diseñados *in silico* se estandarizó el protocolo de PCR convencional, con el ADN de la especie *Brassica rapa* como control positivo, y agua libre de nucleasas como control negativo. Los ensayos de PCR del

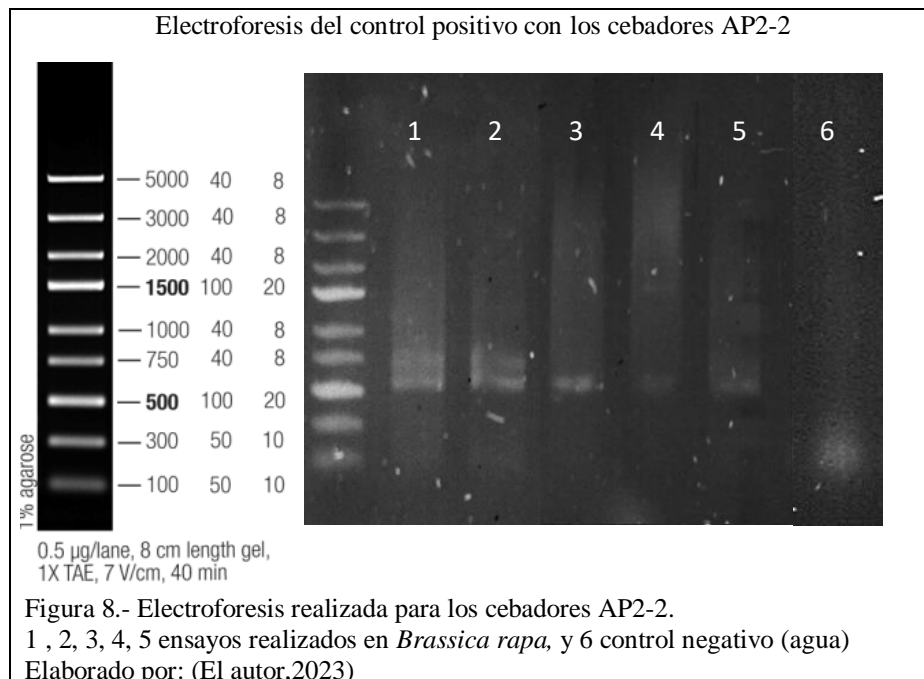
control positivo con los cebadores AP2-1 se realizaron con las 5 muestras de ADN de *Brassica rapa*, lográndose amplificar a la temperatura de hibridación de 58 °C reportada en el certificado de análisis de los cebadores (a pesar de la baja calidad de ADN de las 5 muestras), por lo que se comprobó la viabilidad de los mismos al obtenerse amplicones de un peso molecular entre los 1000 y 1500 pb, como se puede observar en la figura 7, posteriormente se realizaron 2 réplicas adicionales para comprobar la reproducibilidad del ensayo.



Para los cebadores AP2-2 se realizó el mismo procedimiento que con AP2-1, tomando en cuenta la temperatura de hibridación de 58.5 °C. Los resultados obtenidos muestran la viabilidad del segundo set de cebadores como se observa en la figura 8.

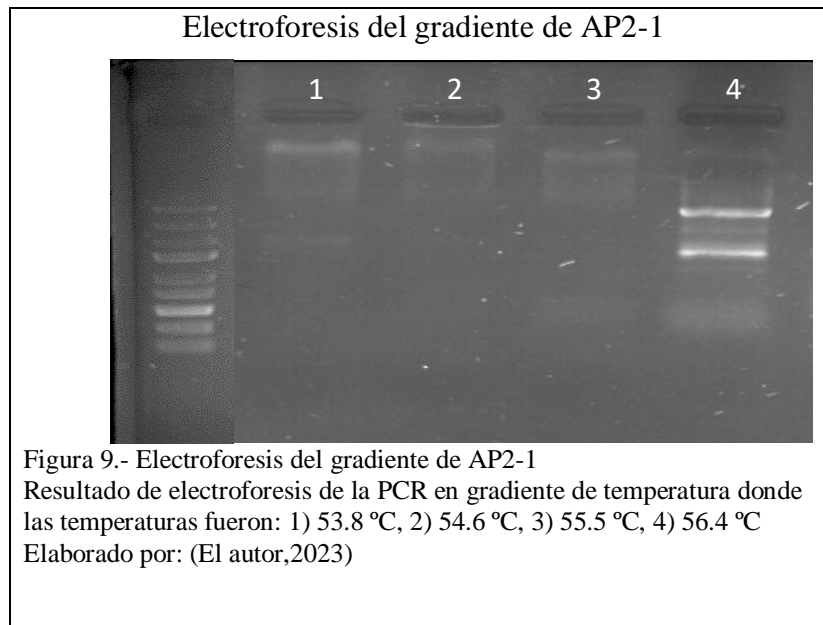
Con respecto a los cebadores AP2-3 se realizó el mismo proceso que con los juegos de cebadores anteriores, sin obtener la presencia de amplicones, por lo que no se procedió a realizar ensayos en orquídeas.

En la revisión de Woodward (2018) acerca de *Arabidopsis thaliana*, se menciona que la misma es nativa de Asia y Europa, por lo que, el acceso a un ejemplar de esta especie resulta ser un factor limitante, es por ello que se optó por una especie de fácil obtención y que esté emparentada con la planta modelo. De esta manera la especie *Brassica rapa*, comúnmente conocida como “nabo”, fue finalmente empleada como control positivo en su reemplazo.



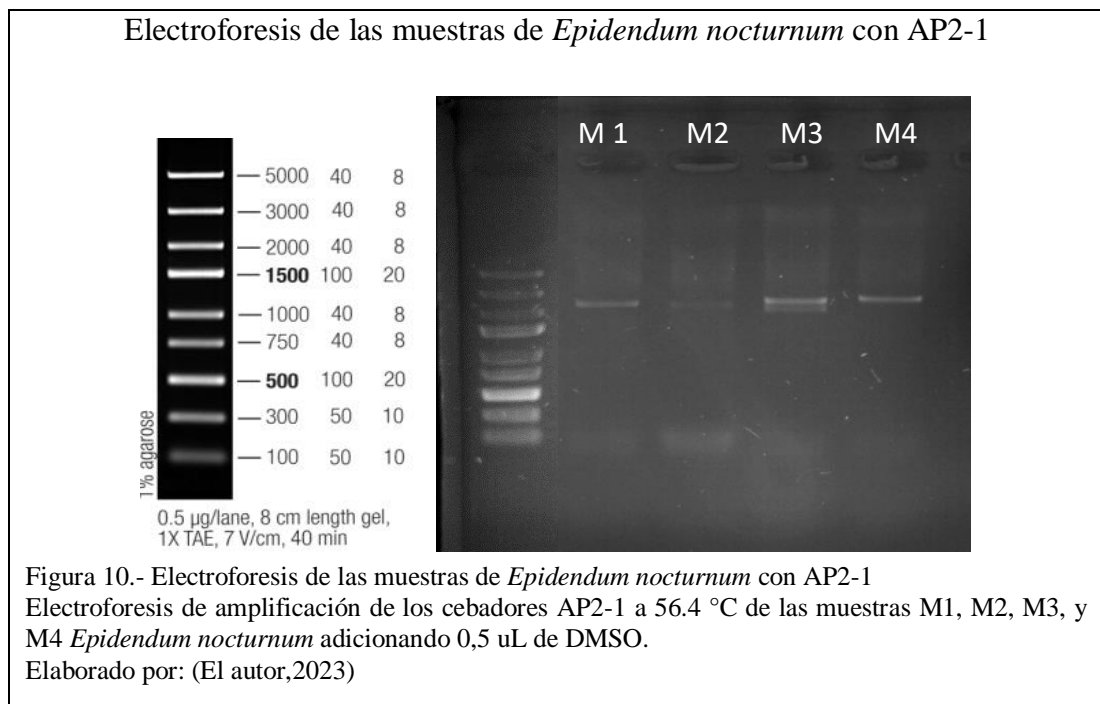
Se realizó el ensayo de PCR con la especie *Epidendrum nocturnum*. El volumen final de reacción fue de 25 uL, el cual contenía 12.5 uL de *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*, 0.5 uL del cebador AP2-1F, 0.5 uL del cebador AP2-1R, 1 uL de muestra de ADN y 10.5 uL de agua libre de nucleasas. Se llevó a cabo un gradiente de temperatura, tal como se observa en la Figura 9, en la cual se determinó que la temperatura de hibridación adecuada era de 56.4 °C, aunque se produjeron bandas inespecíficas. Para corregirlas, se realizó una nueva PCR a la misma temperatura de *annealing*, esta vez adicionando 0.5 uL de DMSO, tal como lo sugiere Granados (2022) en un ensayo de PCR para evitar la aparición de estas bandas, así como de dímeros de cebadores. Hardjasa (2010) y Gao (2019) mencionan que el DMSO tradicionalmente se usa

para mejorar la especificidad de la PCR e inhibir la formación de estructuras secundarias del ADN molde.



A partir de las muestras de ADN extraídas con el kit *Platinum Direct* (M1, M2, M3 y M4), se obtuvieron amplicones con los cebadores de AP2-1 en la especie *Epidendrum nocturnum* mostrando un peso de aproximadamente 2000 pb (Figura 10). El resultado concuerda con el estudio realizado por Sharma (2018) donde se reportan productos de PCR de tamaño similar a los obtenidos en este ensayo. En muestras de otras especies del género *Epidendrum* y en las muestras de los géneros *Restrepia* y *Gongora* procedentes del banco de ADN que se encuentra en los laboratorios de Ciencias de la vida (Anexo 6), no se logró replicar la amplificación, observándose únicamente dímeros de cebadores, con lo que se determina que las especies no cuentan con la misma sección de hibridación para los cebadores. Según Tezuka (2012) estos resultados son producto de la cantidad de polimorfismos que presentan las especies, debido a ello existen muchas regiones que no pueden ser reconocidas por los cebadores, ya que al usar genomas de referencia se asume que las regiones conservadas de la secuencia modelo tienen un alto porcentaje de identidad con los segmentos de estudio, por lo tanto, existen muy pocos

polimorfismos. Además, añade Tezuka (2012) que se debe tomar en cuenta que los cebadores diseñados deben hibridar en exones, ya que, los polimorfismos son menos frecuentes en regiones exónicas a comparación de regiones intrónicas.



Posteriormente se realizó el mismo procedimiento con los cebadores Ap2-2. La temperatura de hibridación fue de 56.9 °C, sin embargo, se observaron dímeros de cebadores (figura 11). Merck (2023) indica que la presencia de bandas de muy bajo peso molecular se relaciona con la alta concentración de cebadores, por lo que es necesario ajustar las concentraciones de los componentes de la máster mix.

Electroforesis del gradiente de PCR con los cebadores AP2-2 en la especie *Epidendrum nocturnum*

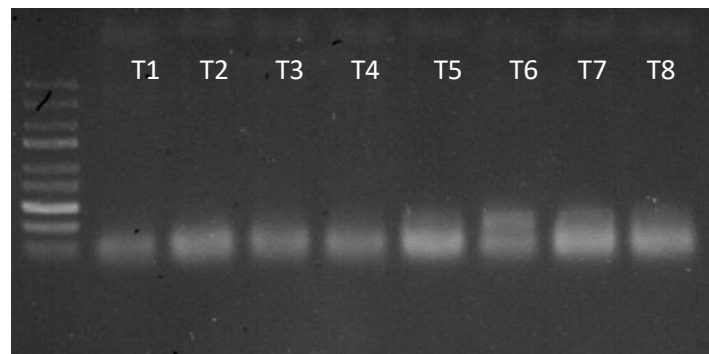


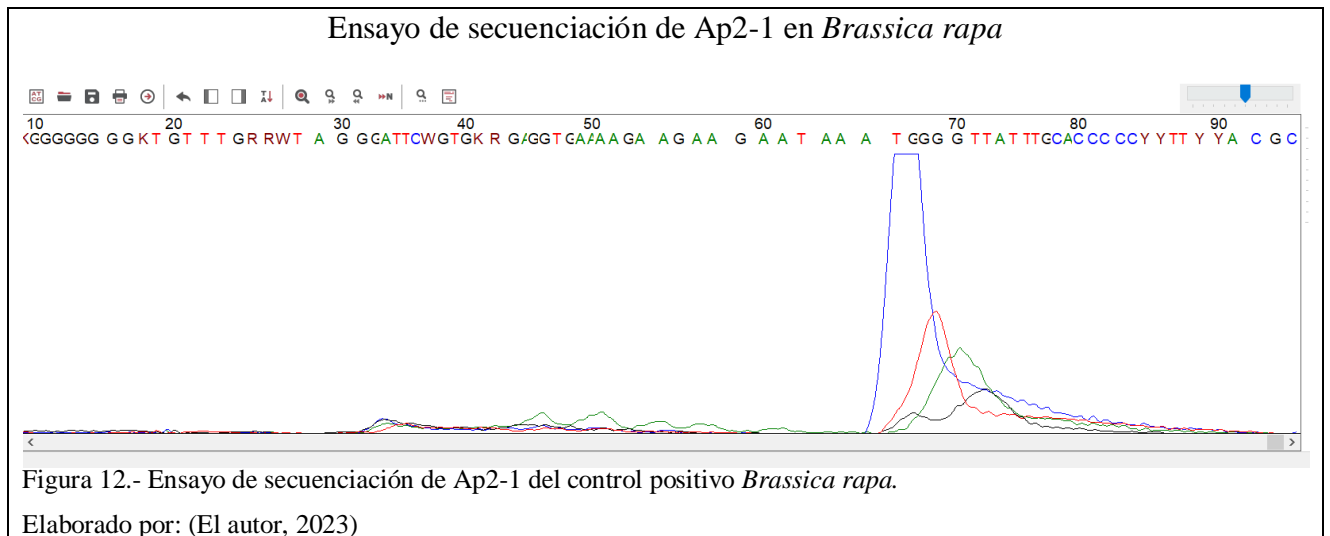
Figura 11.- Electroforesis del gradiente de PCR con los cebadores AP2-2 en la especie *Epidendrum nocturnum*
Electroforesis del gradiente de PCR para el segundo juego de cebadores (AP2-2) con la presencia de dímeros de cebadores donde las temperaturas fueron: T1= 47.4, T2=49.3, T3= 51.2 °C, T4= 53.1 °C, T5=55.0 °C, T6=56.9°C, T7=57.8 °C, T8= 59.5 °C.

Elaborado por: (El autor, 2023)

La amplificación tuvo lugar únicamente en la especie *E. nocturnum*, sin embargo, en las otras especies del género *Epidendrum* no hubo hibridación. En adición, para el género *Restrepia* y *Gongora* se realizó el mismo protocolo previamente descrito sin éxito, por lo que se requiere diseñar nuevos cebadores. Cheng (2016) menciona que en estudios en los que fue posible trabajar a partir de una secuencia consenso completa disponible en bases de datos como el *GenBank*, se diseñaron alrededor de 2 a 4 sets de cebadores, en tanto que, en el estudio realizado por Tezuka (2012) cuando se trataron de organismos parcialmente secuenciados el número de pares de cebadores diseñados aumentó.

4.4 Secuenciación

Se realizó un ensayo de secuenciación *Sanger* de uno de los amplicones del control positivo usando el nuevo kit adquirido por el laboratorio de Ciencias de la vida *BigDye Direct Cycler Sequencing kit*, se usó en primera instancia el control positivo debido a que al tratarse de un nuevo protocolo este no se encontraba estandarizado por los auxiliares del laboratorio de Ciencias de la vida, por lo que era probable que al hacer el ensayo directamente con las especies de orquídeas se terminen las muestras. Al realizar el ensayo de secuenciación antes mencionado se obtuvo una secuencia de mala calidad, como se muestra en la Figura 12, el mismo que no permitió la realización de posteriores análisis.



Para el correcto funcionamiento de *BigDye Direct Cycler Sequencing* kit es necesario rediseñar los cebadores, el rediseño debe incluir una cola con una secuencia de cebador universal conocida como M13, cuya secuencia se incluye en el protocolo del kit y que tiene como función garantizar una correcta hibridación y optimización la secuenciación (applied biosystems, 2011).

5 Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Los cebadores fueron diseñados a partir de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* con ayuda de las herramientas bioinformáticas *Primer3Plus* y *OligoAnalyzer*, así como también de la biblioteca NCBI, de donde se obtuvieron las secuencias correspondientes para el diseño de 3 juegos de cebadores, de los cuales se pudo verificar la funcionalidad de 2 de ellos.

Se logró la amplificación por PCR de un segmento de aproximadamente 2000pb del gen *AP2* con el primer juego de cebadores y otro segmento de alrededor de 500 pb con el segundo juego en la especie *Epidendrum nocturnum*, no se obtuvieron resultados en las especies de los géneros *Restrepia*, *Gongora* y otras de *Epidendrum*, lo cual podría deberse a polimorfismos en el gen *AP2*.

Se buscó cumplir con el objetivo, pero no se logró debido a los problemas con el nuevo kit de secuenciación con el que cuenta el laboratorio de Ciencias de la vida. Se obtuvo un electroferograma por el método *Sanger* con varias inconsistencias que no permitieron ningún análisis, debido a que el nuevo kit de secuenciación requería el uso de cebadores diseñados con una secuencia de nucleótidos especial denominada “cola M13”.

5.2 Recomendaciones

El número de cebadores sujetos a verificación experimental debe ser considerable, ya que al no existir una secuencia completa del gen *Apetala 2* en orquídeas, es necesario probar varios juegos de cebadores e inclusive combinaciones que permitan abarcar la mayor extensión del gen, en donde los cebadores se hibriden en regiones conservadas que delimiten regiones de alta variabilidad genética a fin de encontrar el par de cebadores ideal para localizar segmentos que puedan funcionar como marcadores moleculares.

Se debe probar un número mayor de juegos de cebadores, de manera que exista más probabilidades de encontrar cebadores que funcionen en la identificación de gran parte de la familia *Orchidaceae*, así como también considerar el uso de cebadores que abarquen posibles polimorfismos, como por el ejemplo los denominados cebadores degenerados.

Se debe verificar el protocolo del kit secuenciación para la adquisición de los cebadores recomendados por el proveedor de la casa comercial, así como también su correcta estandarización.

6 Bibliografía

- About-Maaty, N. A.-F., & Oraby, H. A.-S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Adachi, S., Rodrigues Machado, S., Guimaraes, E., & Adachi, S. (2015). Structural and ultrastructural characterization of the floral lip in *Gongora bufonia*. (*Orchidaceae*): understanding the slip-and-fall pollination mechanism. www.nrcresearchpress.com
- Akter, A., Itabashi, E., Kakizaki, T., Okazaki, K., Dennis, E. S., & Fujimoto, R. (2021). Genome Triplication Leads to Transcriptional Divergence of FLOWERING LOCUS C Genes During Vernalization in the genus *Brassica*. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.619417>
- Alcántara, H., González, M., Silva, R., Vilchis Landeros, L., & Huerta, C. (2021). Secuenciación de ADN por el método de terminación de la cadena de Sanger. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Applied biosystems. (2011). BigDye ® Direct Cycle Sequencing Kit PROTOCOL, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4458687>.
- Cardona, C. Z., York, N., & Garden, B. (2017). *APETALA2 un gen que forma flores y frutos*. 44–45.

- Cerda Granados, D. A., & Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*.
- Chase, M. W., Cameron, K. M., Freudenstein, J. V., Pridgeon, A. M., Salazar, G., Van Den Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). Invited Review An updated classification of *Orchidaceae*. <https://academic.oup.com/botlinnean/article/177/2/151/2416341>
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., & Zhou, S. (2016). Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for *ITS* regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, *16*(1), 138–149.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>
- Choudhary, P., Singh, B. N., Chakdar, H., & Saxena, A. K. (2021). DNA barcoding of phytopathogens for disease diagnostics and bio-surveillance. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 37, Issue 3). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03019-0>
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., & Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. In *Biotechnology Letters* (Vol. 35, Issue 10, pp. 1541–1549). <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Coissac, E., Hollingsworth, P. M., Lavergne, S., & Taberlet, P. (2016). From barcodes to genomes: Extending the concept of DNA barcoding. In *Molecular Ecology* (Vol. 25, Issue 7, pp. 1423–1428). Blackwell Publishing Ltd.
<https://doi.org/10.1111/mec.13549>
- De, L. (2020). Morphological diversity in orchids. www.botanyjournals.com.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24041.31849>

- Debernardi, J. M., Woods, D. P., Li, K., Li, C., & Dubcovsky, J. (2022). *MiR172-APETALA2*-like genes integrate vernalization and plant age to control flowering time in wheat. *PLoS Genetics*, *18*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010157>
- Dong, W., Xu, C., Li, C., Sun, J., Zuo, Y., Shi, S., Cheng, T., Guo, J., & Zhou, S. (2015). *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants. *Scientific Reports*, *5*, 8348. <https://doi.org/10.1038/srep08348>
- Eray Bozyel, M., & Merdamert-Bozyel, E. (2020). Ethnomedicinal uses of Orchidaceae Taxa in Turkish traditional medicine. In *International Research Journal of Biological Sciences* (Vol. 9, Issue 3). www.isca.me
- Gao, X., Sun, B., & Guan, Y. (2019). Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(6), 1211–1218. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1552-2>
- Granados Rodríguez, B. (2022). Detección de variantes del gen *HTT*. Ciclo formativo de grado superior de laboratorio clínico y biomédico.
- Hardjasa, A., Ling, M., Ma, K., & Yu, H. (2010). Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. In *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*.
- Hernández Ramírez, A. M. (2022). Biología reproductiva de *Gongora galeata* (*Orchidaceae*) en el centro de Veracruz, México. *Acta Botánica Mexicana*, *128*, 1–17. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2065>
- Hetherington Rauth, M. C., & Ramírez, S. R. (2015). Evolutionary Trends and Specialization in the Euglossine Bee-pollinated Orchid Genus *Gongora*. In *Annals*

- of the Missouri Botanical Garden (Vol. 100, Issue 4, pp. 271–299). Missouri Botanical Garden. <https://doi.org/10.3417/2014035>
- Hossain, M. M., Kant, R., Van, P. T., Winarto, B., Zeng, S., & Teixeira da Silva, J. A. (2013). The Application of Biotechnology to Orchids. In *Critical Reviews in Plant Sciences* (Vol. 32, Issue 2, pp. 69–139). <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.715984>
- Hsiao, Y. Y., Pan, Z. J., Hsu, C. C., Yang, Y. P., Hsu, Y. C., Chuang, Y. C., Shih, H. H., Chen, W. H., Tsai, W. C., & Chen, H. H. (2011). Research on orchid biology and biotechnology. In *Plant and Cell Physiology* (Vol. 52, Issue 9, pp. 1467–1486). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr100>
- Invitrogen. (2019). *Platinum™ Direct PCR Universal Master Mix. 44647100*, 2–3. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=331330398005>
- Jofuku, K. D., Omidyar, P. K., Gee, Z., & Okamoto, J. K. (2005). Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2*. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0409893102
- Koornneef, M., Alonso-Blanco, C., & Vreugdenhil, D. (2004). Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 55, pp. 141–172). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141605>
- Krogan, N. T., Hogan, K., & Long, J. A. (2012). *APETALA2* negatively regulates multiple floral organ identity genes in *Arabidopsis* by recruiting the co-repressor TOPLESS and the histone deacetylase HDA19. *Development* (Cambridge), *139*(22), 4180–4190. <https://doi.org/10.1242/dev.085407>

- Li, Y., Zhang, B., & Yu, H. (2022). Molecular genetic insights into orchid reproductive development. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 73, Issue 7, pp. 1841–1852). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erac016>
- Merck. (2023). RT-PCR / RT-qPCR Troubleshooting. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/troubleshooting>
- Millner, H. J., Bachman, S. P., & Baldwin, T. C. (2020). An assessment of the conservation status of *Restrepia* (*Orchidaceae*) reveals the threatened status of the genus. *Plant Ecology and Diversity*, *13*(2), 115–131. <https://doi.org/10.1080/17550874.2020.1735553>
- Millner, H. J., & Baldwin, T. C. (2016). Floral micromorphology of the genus *Restrepia* (*Orchidaceae*) and the potential consequences for pollination. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *225*, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2016.09.007>
- Millner, H. J., McCrea, A. R., & Baldwin, T. C. (2015). An investigation of self-incompatibility within the genus *Restrepia*. *American Journal of Botany*, *102*(3), 487–494. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400555>
- Mites, M., García-Mozo, H., Galán, C., & Oña, E. (2022). Analysis of the *Orchidaceae* Diversity in the Pululahua Reserve, Ecuador: Opportunities and Constraints as Regards the Biodiversity Conservation of the Cloud Mountain Forest. *Plants*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/plants11050698>

- Musharof Hossain, M. (2011). Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - An overview. In *Fitoterapia* (Vol. 82, Issue 2, pp. 102–140). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>
- NCBI. (2023). *AP2* Integrase-type DNA-binding superfamily protein [*Arabidopsis thaliana* (*thale cress*)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/829845>
- OligoAnalyzer. (2023). *OligoAnalyzer Tool* - Primer analysis and Tm Calculator / IDT. <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>
- Ormerod, P. (2016). Neotropical Orchid Miscellanea. *Harvard Papers in Botany*, 21(2), 231–245. <https://doi.org/10.3100/hpib.v21iss2.2016.n8>
- Pinheiro, F., & Cozzolino, S. (2023). *Epidendrum* (*Orchidaceae*) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics.
- Primer3Plus. (2023). *Primer3Plus* - Pick Primers. <https://www.primer3plus.com/>
- Quijia Lamiña, P. H., Baquero, L. E., Kane, M. E., & Zettler, L. W. (2023). Symbiotic Seed Germination and Seedling Development of *Epidendrum geminiflorum* Knuth from Ecuador. *Diversity*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/d15020236>
- Salemme, M. (2013). Genes involved in flower development of *Orchis italica* (*Orchidaceae*).
- Sharma, P., Singh, R., & Sehrawat, N. (2020a). A critical review on: Significance of floral homeotic *APETALA2* gene in plant system. In *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (Vol. 10, Issue 1, pp. 124–130). Open Science Publishers LLP Inc. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.101017>

- Sharma, P., Singh, R., & Sehrawat, N. (2020b). A critical review on: Significance of floral homeotic *APETALA2* gene in plant system. In *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (Vol. 10, Issue 1, pp. 124–130). Open Science Publishers LLP Inc. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2020.101017>
- Sharma, P., Watts, A., Kumar, V., Srinivasan, R., & Siwach, P. (2018). Cloning, characterization and expression analysis of *APETALA2* genes of *Brassica juncea* (L.) Czern. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 56).
- Shoesmith, J. R., Solomon, C. U., Yang, X., Wilkinson, L. G., Sheldrick, S., Eijden, E., Van, Couwenberg, S., Pugh, L. M., Eskan, M., Stephens, J., Barakate, A., Drea, S., Houston, K., Tucker, M. R., & McKim, S. M. (2021). *APETALA2* functions as a temporal factor together with *BLADE-ON-PETIOLE2* and *MADS29* to control flower and grain development in barley. *Development (Cambridge)*, *148*(5). <https://doi.org/10.1242/dev.194894>
- Sut, S., Maggi, F., & Dall'Acqua, S. (2017). Bioactive Secondary Metabolites from Orchids (*Orchidaceae*). In *Chemistry and Biodiversity* (Vol. 14, Issue 11). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700172>
- Tezuka, A., Matsushima, N., Nemoto, Y., Akashi, H. D., Kawata, M., & Makino, T. (2012). Comprehensive primer design for analysis of population genetics in non-sequenced organisms. *PLoS ONE*, *7*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032314>
- Van Doorn, W. G., & Ketsa, S. (2021). Pollination-Induced Changes in the Morphology and Physiology of *Dendrobium* Orchid Flowers Prior to Fertilization: The Roles of Ethylene and Auxin. In *Horticultural Reviews* (Vol. 48).

- Wollmann, H., Mica, E., Todesco, M., Long, J. A., & Weigel, D. (2010). On reconciling the interactions between *APETALA2*, miR172 and AGAMOUS with the ABC model of flower development. *Development*, *137*(21), 3633–3642. <https://doi.org/10.1242/dev.036673>
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2018). Biology in bloom: A primer on the arabidopsis thaliana model system. *Genetics*, *208*(4), 1337–1349. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300755>
- Wu, Y., Liu, J., Tang, Y., Zhao, D., & Tao, J. (2022). Age-Related Alterations in DNA Methylation and *APETALA2* (*AP2*) Levels in Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Phyton*, *91*(9), 2005–2016. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.021062>
- Yang, F. X., Zhu, G. F., Wang, Z., Liu, H. L., & Huang, D. (2015). A putative miR172-targeted *CeAPETALA2-like* gene is involved in floral patterning regulation of the orchid *Cymbidium ensifolium*. *Genetics and Molecular Research*, *14*(4), 12049–12061. <https://doi.org/10.4238/2015.October.5.18>
- Yang, F., Zhu, G., Wang, Z., Liu, H., Xu, Q., Huang, D., & Zhao, C. (2017). Integrated mRNA and microRNA transcriptome variations in the multi-tepal mutant provide insights into the floral patterning of the orchid *Cymbidium goeringii*. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3756-9>
- Yant, L., Mathieu, J., Dinh, T. T., Ott, F., Lanz, C., Wollmann, H., Chen, X., & Schmid, M. (2010). Orchestration of the floral transition and floral development in *Arabidopsis* by the bifunctional transcription factor *APETALA2*. *Plant Cell*, *22*(7), 2156–2170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.075606>

Zeng, D., Teixeira da Silva, J. A., Zhang, M., Yu, Z., Si, C., Zhao, C., Dai, G., He, C., & Duan, J. (2021). Genome-wide identification and analysis of the *Apetala2* (*Ap2*) transcription factor in *Dendrobium officinale*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/ijms22105221>

7 Anexos

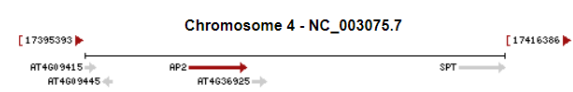
Secuencia y localización del gen AP2

Genomic context

Location: chromosome: 4 See AP2 in [Genome Data Viewer](#)

Exon count: 11

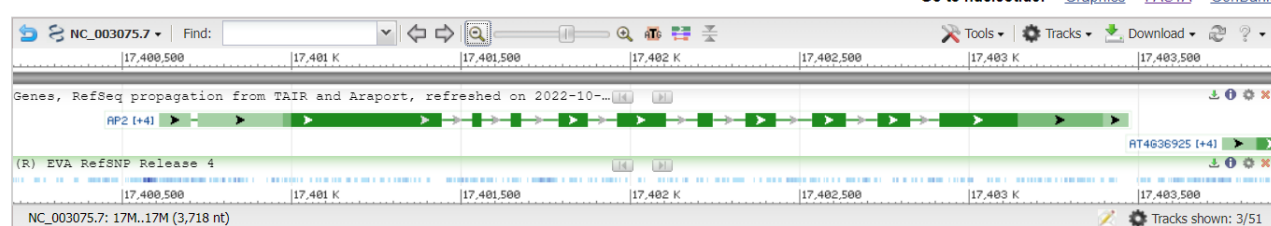
Sequence: Chromosome: 4; NC_003075.7 (17400610..17403469)



Genomic regions, transcripts, and products

Genomic Sequence: NC_003075.7 Go to [reference sequence details](#)

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)



Bibliography

Anexo 1 Secuencia y localización del gen AP2
Secuencia completa del gen AP2 y observación de las regiones más conservadas en las franjas de color verde oscuro
Fuente: (NCBI, 2023)

Extracción por el método de *Doyle & Doyle* 1987



Anexo 2.- Extracción por el método de *Doyle & Doyle* 1987
Toma de la muestra para extracción de ADN
Elaborado por: (El autor, 2023)

Extracción de ADN por el método del kit *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*

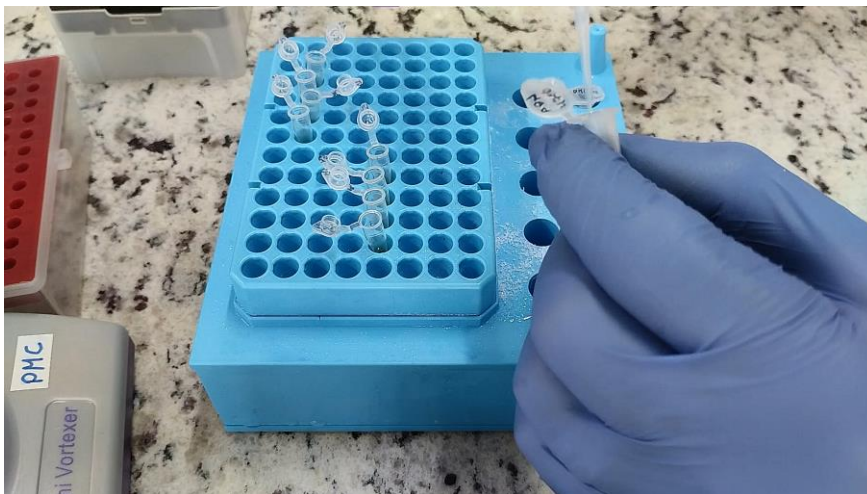


Anexo 3.- Extracción de ADN por el método del kit *Platinum Direct Universal PCR Master Mix*.

Toma de muestra vegetal para extracción de ADN.

Elaborado por: (El autor, 2023)

PCR convencional



Anexo 4.- PCR convencional

Mezcla maestra de los ensayos con *Epidendrum nocturnum*

Elaborado por: (El autor, 2023)

Programación del termociclador para PCR convencional.



Anexo 5.- Programación del termociclador para PCR convencional
Amplificación del gen *Ap2* en *Epidendrum nocturnum*.
Elaborado por: (El autor, 2023)

Anexo 6.- Lista de especies utilizadas para los ensayos de cada género identificados en el banco de ADN y que se encuentra almacenado en el laboratorio Ciencias de la vida.

| <i>Epidendrum</i> | <i>Restrepia</i> | <i>Gongora</i> |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 4491 <i>Epidendrum nocturnum</i> | 4452 <i>Restrepia antennifera</i> | 4295 <i>Gongora sanderiana</i> |
| 4606 <i>Epidendrum nocturnum</i> | 4453 <i>Restrepia cymbula</i> | 4400 <i>Gongora ecomuta</i> |
| 4474 <i>Epidendrum ibaguense</i> | 4457 <i>Restrepia Trichoglossa</i> | 4247 <i>Gongora atropurpurea</i> |
| 4727 <i>Epidendrum campestre</i> | 4543 <i>Restrepia elegans</i> | 4402 <i>Gongora inodesme</i> |
| 4501 <i>Epidendrum cochlidium</i> | 4449 <i>Restrepia dodsonii</i> | 4300 <i>Gongora superflua</i> |

Elaborado por: (El autor, 2023)