



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

## **“FILOGENIA MOLECULAR DE LAS ORQUÍDEAS DEL GÉNERO *Dracula* EN EL ECUADOR, UTILIZANDO ITS COMO MARCADOR MOLECULAR”**

**Trabajo de titulación**

**Tipo: Proyecto Técnico**

**Presentado para optar el grado académico de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTORA: MARIELA MICAELA MORENO PALACIOS**

**TUTOR: DR. CELSO RECALDE MORENO**

**Riobamba – Ecuador  
2018**

**©2018, Mariela Micaela Moreno Palacios**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El proyecto técnico: “**Filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* en el Ecuador, utilizando ITS como marcador molecular**”, de responsabilidad de la señorita Mariela Micaela Moreno Palacios, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr – Celso Guillermo Recalde Moreno  
**DIRECTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing – Cristina Gabriela Calderón Tapia  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Mariela Micaela Moreno Palacios soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este proyecto y el patrimonio intelectual de este trabajo de titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

MARIELA MICAELA MORENO PALACIOS

## **DEDICATORIA**

“A veces sentimos que lo que hacemos es solo una gota en un océano. Pero el océano sería menos sin esa gota que falta”. Madre Teresa de Calcuta

A Dios por darme la vida y permitirme culminar esta etapa de mi vida con las personas que más quiero en el mundo. A mis padres Marcelo Moreno e Hilda Palacios mi pilar fundamental quienes día a día me dan la fuerza de seguir adelante, cumplir mis sueños y nunca rendirme por alcanzar las metas que me propongo en la vida. En especial a mi mami quien es mi mejor amiga, mi confidente y mi apoyo incondicional en todo momento, la que día a día luchó para solventar los gastos económicos que se requerían para alcanzar este logro profesional en mi vida y el inicio de una nueva etapa. Y mis hermanos Daniel y Melina por apoyarme a lo largo de este camino.

Mariela

## AGRADECIMIENTO

Al Ingeniero Patricio Orozco quien me apoyó al inicio de esta gran idea y el que me impulsó ir al Jardín Botánico Quito donde tuve la oportunidad de conocer al Lic. Luis Baquero, a quien agradezco inmensamente el apoyo a lo largo de la realización de mi tesis y todo su conocimiento compartido en cuanto a las orquídeas del género *Dracula*.

A la Universidad Politécnica Salesiana establecimiento que me abrió las puertas para poder ocupar el laboratorio de Biología Molecular de la misma, agradezco a todo el personal de los laboratorios y en especial al profesor Dr. Marco Cerna Ph.D quien me dio la apertura y confianza de ocupar dicho laboratorio de tan prestigioso establecimiento y quien me brindo ayuda y capacitación a lo largo de este proyecto.

Estoy muy agradecida con el Ing. Byron Fuertes quien estuvo conmigo día a día en el laboratorio desde muy temprano en la mañana, transmitiéndome su conocimiento y ayudándome en la parte experimental de mi tesis.

Agradezco a todos los tesisistas biotecnólogos de la UPS quienes estuvieron conmigo enseñándome y con los que hoy comparto una grata amistad.

A mi tutor Dr. Celso Recalde y miembro de tesis Ing. Cristina Calderón quienes me han dado la confianza de consultarles cualquier inquietud que ha surgido en este tiempo y los que desde un inicio me apoyaron totalmente en la realización de este proyecto. A mis amigos, profesores, familia y todas las personas que estuvieron conmigo en todo este camino para cumplir esta meta muchas gracias de corazón.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	15
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....</b>	<b>17</b>
1.1 Familia Orchidaceae .....	17
1.2 Taxonomía de Orchidaceae .....	19
1.3 Orquídeas Epífitas.....	20
1.4 Género <i>Dracula</i> .....	22
1.5 Polinización .....	26
1.6 Marcadores Moleculares .....	28
1.6.1 <i>Marcadores Moleculares en Orquídeas</i> .....	28
1.6.2 <i>El Espaciador Transcrito Interno (ITS) como marcador filogenético</i> .....	29
1.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa .....	31
1.8 Gel de Electroforesis .....	32
1.9 Secuenciación.....	33
1.9.1 <i>Secuenciación de Sanger</i> .....	33
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>34</b>
2.1 Metodología .....	34
2.2 Población de Estudio.....	34
2.3 Tamaño de la muestra.....	34
2.4 Técnicas de recolección de los datos.....	35
2.4.1 <i>Toma de Muestras</i> .....	35
2.5 Técnicas Moleculares .....	35
2.5.1 <i>Extracción de AND</i> .....	36
2.5.2 <i>Marcadores Moleculares</i> .....	37
2.5.3 <i>Amplificación por PCR</i> .....	37
2.5.4 <i>Electroforesis</i> .....	37
2.5.5 <i>Secuenciación</i> .....	38
2.5.6 <i>Análisis Filogenético</i> .....	39
<b>CAPÍTULO III</b>	

<b>3.</b>	<b>MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Técnicas Moleculares .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Extracción de ADN</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Amplificación</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.3</b>	<b><i>Secuenciación</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.4</b>	<b><i>Análisis Filogenético</i>.....</b>	<b>48</b>
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>53</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b> Porcentaje de Nombres incluidos para la Familia Orchidaceae .....	17
<b>Figura 2-1</b> Subfamilias de la familia Orchidaceae.....	18
<b>Figura 3-1</b> Orquídea epífita <i>Dracula iricolor</i> .....	19
<b>Figura 4-1</b> Descripción morfológica de <i>Dracula hirtzii</i> .....	22
<b>Figura 5-1</b> Polinización de la orquídea <i>Dracula lafleurii</i> .....	23
<b>Figura 6-1</b> Presentación esquemática de la estructura universal del ADNr región en las plantas .....	25
<b>Figura 7-1</b> Presentación esquemática del principio de reacción en cadena de la polimerasa .....	33
<b>Figura 1-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	27
<b>Figura 2-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	27
<b>Figura 3-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	28
<b>Figura 4-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	28
<b>Figura 5-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	28
<b>Figura 6-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	29
<b>Figura 7-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	29
<b>Figura 8-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra... ..	30
<b>Figura 9-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	30
<b>Figura 10-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	31
<b>Figura 11-3</b> Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra.....	32
<b>Figura 12-3</b> Árbol Filogenético Neighbor-Joining concatenado de ITS-matK y bootstrap de 1000 réplicas con 3 secciones divididas dentro del género, el cual incluye a la especie externa dentro de la	

clasificación.....	49
<b>Figura 13-3</b> Árbol filogenético Maximum Composite Likelihood de la región ITS mediante el método Tamura-Nei y bootstrap de 1000 réplicas, en el que no incluye a la especie de out group dentro del género.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b> Clasificación subgenérica actual del género <i>Dracula</i> .....	25
<b>Tabla 1-2</b> Primers ITS utilizados para la amplificación de regiones cloroplásticas de ADN....	39
<b>Tabla 1-3</b> Porcentaje de compatibilidad de especies del GENBANK.....	47

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografías 1-2</b> Toma de 30 mg aproximadamente de la hoja.....	37
<b>Fotografías 2-2</b> Muestra pulverizada .....	37
<b>Fotografías 3-2</b> Muestras centrifugadas.....	37
<b>Fotografías 4-2</b> Gel solidificado .....	38
<b>Fotografías 5-2</b> Colocación de 4 $\mu$ L de Blue sobre el Parafilm.....	38
<b>Fotografías 6-2</b> Carga de los pocillos con 4 $\mu$ L de producto PCR y 4 $\mu$ L de Blue en la cámara .....	38

## **INDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A** Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN

**ANEXO B** Proceso de Extracción de ADN

**ANEXO C** Equipos utilizados en el proyecto

**ANEXO D** Condiciones de temperatura en el termociclador

**ANEXO E** Especies recolectadas

## RESUMEN

El objetivo fue establecer la filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* en el Ecuador, utilizando el Espaciador Transcrito Interno (ITS) como marcador molecular; para lo cual se recolectaron 54 de las 55 especies descritas en el país en un total de 108 muestras de coleccionistas y orquidearios ubicados en las provincias de Carchi y Pichincha. El análisis molecular se efectuó para abordar problemas de clasificación de este género e híbridos artificiales confundidos como nuevas especies, la extracción de ADN se lo hizo mediante el protocolo químico de Doyle & Doyle, posteriormente se amplificaron las muestras con el marcador molecular ITS1 para la cadena Forward e ITS4 para la cadena Reverse, en electroforesis horizontal mediante la técnica de Reacción en cadena de polimerasa (PCR) convencional para su posterior secuenciación en Macrogen. La generación de cladogramas se trabajó con el software MEGA 7. Se tomaron dos especies del género *Masdevallia* y la especie *Diodonopsis erinacea* como grupos externos para el enraizamiento del árbol. La utilización del marcador ITS nos deja más claro el entender la evolución del género y de varias especies dentro de él, la formación de clados y la ausencia de híbridos, sin embargo, ya que es un marcador universal puede generar errores en los cladogramas los cuales exhibieron varias secciones de rama subdivididas y al ser este el primer estudio que aplica ITS en este tipo de orquídeas, no se puede comparar resultados con cladogramas definidos por este marcador. Se recomienda investigar nuevas regiones de ADN cloroplástico y nuclear para poder resolver la controversia que presenta la clasificación desactualizada del género.

**Palabras clave:** <BIOTECNOLOGÍA>, <BIOLOGÍA MOLECULAR>, <ORQUIDEA (*Dracula*)>, <ESPACIADOR TRANSCRITO INTERNO (ITS)>, <REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)>, <CLADOGRAMA>.

## SUMMARY

The objective was to establish the molecular phylogeny of the *Dracula* orchids kind in Ecuador, by using the Internal Transcribed Spacer (ITS) as a molecular marker; for which it has been recollect 54 or 55 species described in the country in a total of 108 samples from collectors and orchidariums located in the Carchi and Pichincha province. The molecular analysis was made to avoid any classification problems for these gender and artificial hybrids confuse with new species, the extraction of the DNA was made by a chemical protocol of Doyle & Doyle, subsequently the molecular marker samples the ITS1 for the Forward chain and the ITS4 for the reverse chain were amplified, in horizontal electrophoresis through the polymerase chain reaction technique (PCR) conventional for its further sequencing in Macrogen, the generation of cladograms were made with the MEGA 7 software. Two kind of species were taken, the *Masdevallia* and *Diodopnopsis erinacea* species as external groups for rooting the tree. The used of the marker ITS leave a more clear understanding of the evolution of this gender and many others species inside of it, the formation of clades and the absence of hybrids, despite this, as a universal marker it could generate mistakes on the cladograms the ones that show many sections of subdivided ranges and to be this the first study to apply the ITS on these type of orchids, the results cannot be compare with the defined cladograms by this marker. Its recommend to investigate new regions of chloroplastic and nuclear DNA to resolve the controversy that presents the outdated classification of the gender.

**Key words:** <BIOTECHNOLOGY>, <MOLECULAR BIOLOGY>, <ORCHID (*Dracula*)>, <INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS)>, <POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)>, <CLADOGRAMA>.

## INTRODUCCIÓN

Las orquídeas conforman una de las familias más grandes de angiospermas y también una de las más fascinantes por su diversidad y especialización en la estructura que poseen. Una clasificación satisfactoria de las orquídeas en tribus y subtribus aún no está disponible, debido al descubrimiento de nuevas especies a lo largo de los años y por ende su desactualización filogenética (Dressler, 1981).

La mayoría de las especies de orquídeas del género *Dracula* son distintas y se identifican fácilmente por la apariencia que tiene cada flor. Sin embargo, algunos complejos de especies o especies variables causan bastante confusión y debate sobre lo que son. Se sospecha que algunos taxones anteriormente descritos recolectados en la naturaleza son híbridos naturales (Luer, 1993).

A lo largo de los años, se han seguido describiendo nuevas especies de *Dracula*, y con ello han surgido una serie de dificultades taxonómicas que podrían abordarse a través de un análisis filogenético molecular. Primero, muchas especies nombradas son solo mínimamente distinguibles de otras especies y en realidad puede representar una variación natural dentro de un complejo de especie. En segundo lugar, se sospecha que las especies de *Dracula* se cruzan libremente en colecciones mixtas ex-situ, produciendo así híbridos artificiales. El estado taxonómico de algunas especies, incluidas las plantas recolectadas en el medio silvestre, han sido cuestionadas ya que estas plantas simplemente pueden ser híbridos. En tercer lugar, con la aplicación de técnicas filogenéticas moleculares, ahora es posible volver a examinar y revisar el sistema actual de clasificación subgenérica para crear uno que refleje mejor los patrones de evolución. Idealmente, esto se haría de tal manera que permita la identificación de flores o caracteres vegetativos que son diagnósticos para especies estrechamente relacionadas entre sí (Meyer & Cameron, 2009).

Los nuevos estudios e investigaciones que se han realizado con orquídeas presentan nuevos retos en la identificación y clasificación de las especies. Debido al comportamiento en su polinización, las orquídeas tienen una gran variación genética y por esto muchas veces es difícil definir su posición taxonómica con los marcadores morfológicos tradicionales. Con los avances en la biología molecular, ahora se usan técnicas nuevas que facilita la clasificación de las especies basándose en el ADN de las plantas. Aplicando marcadores moleculares se pueden identificar características específicas de cada especie, y se pueden definir relaciones genéticas entre especies (Aguilar, 2003).

El presente proyecto se desarrolla en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) ubicada en la ciudad de Quito, con quienes de manera conjunta se trabajó para la toma de muestras de las especies y con el primer estudio del marcador molecular ITS para la realización de esta filogenia en orquídeas del Ecuador.



Con la realización de este proyecto se pretende esclarecer la gran confusión en cuanto a la clasificación desactualizada del género y la discusión que existe al involucrar híbridos artificiales con nuevas especies, es importante conocer la flora que posee el país para poder aplicar planes de conservación y protección que van de la mano con el desarrollo sustentable y sostenible.

## **OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Establecer la filogenia molecular de las orquídeas del género *Dracula* en el Ecuador, utilizando ITS como marcador molecular.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aplicar ITS como marcador nuclear para la amplificación de las especies de orquídeas *Dracula* extraídas, mediante la técnica de PCR.
- Secuenciar los fragmentos específicos de ADN amplificados de las especies extraídas.
- Interpretar el cladograma generado de las especies de *Dracula*, mediante el software MEGA 7.

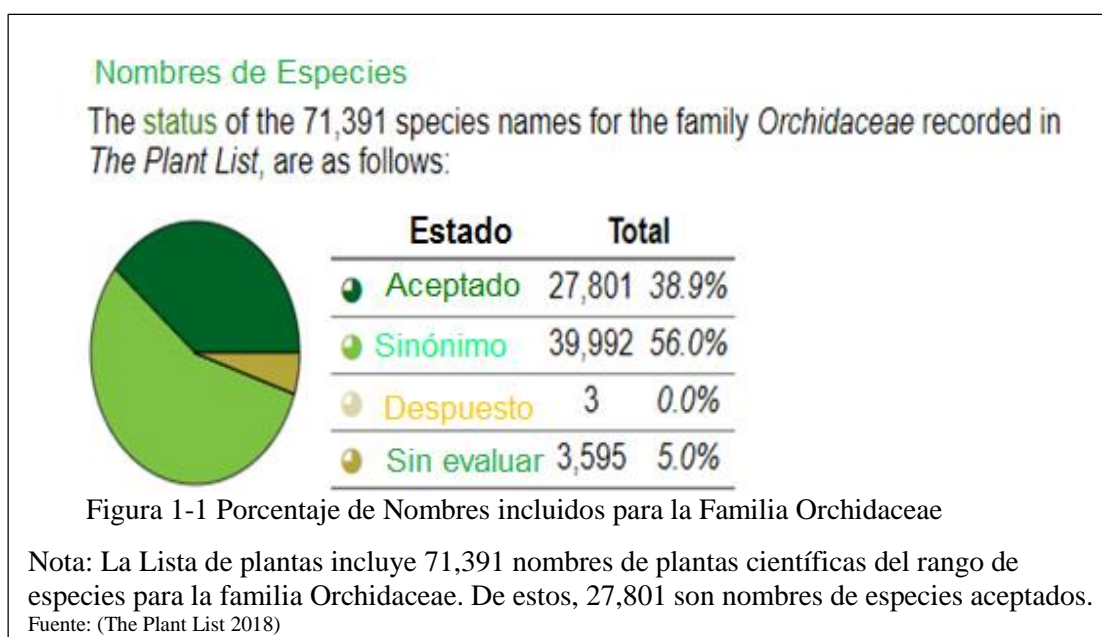
# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1 Familia Orchidaceae

Las orquídeas son plantas muy famosas en el mundo. Estas plantas pertenecen a la familia Orchidaceae que tiene más de 25000 especies reconocidas y miles de híbridos creados por el hombre. Ellas han fascinado al mundo durante siglos y han sido consideradas como flores místicas; aunque algunos pueblos primitivos también la han utilizado con fines medicinales. En la antigua Grecia se le atribuían propiedades curativas, afrodisíacas y eran vistas como un símbolo de virilidad. Debido a su belleza y al elevado coste que alcanzan las orquídeas actualmente, son motivo de cultivo por particulares e industriales como flor cortada y como planta ornamental, por ello tiene una importancia económica a nivel mundial (Ajú, 2009). La mayoría de las especies son epífitas y con sus raíces muy engrosadas.

Dicha familia es una de las dos más grandes de plantas con flores, las nuevas especies se han descrito a un ritmo de aproximadamente 500 por año. Ahora reconocemos 899 géneros en Orchidaceae según The Plant List (2018), y nuevos géneros de orquídeas están siendo descritos en una tasa de alrededor de 13 por año (el promedio de 10 años; Schuiteman, 2004), pero la gran mayoría de estos son segregantes de especies de otros géneros y no se basan en taxones recientemente descubiertos. (Ver Figura. 1) Estos géneros de la familia anteriormente mencionada están organizados en 70 subtribus, 22 tribus y cinco subfamilias basadas principalmente en el número de anteras y posición (Chase, 2005).



Desde la última clasificación de Orchidaceae (Chase, 2005), se han detallado casi 150 nuevos géneros, algunos están relacionados con géneros que son polifiléticos. Muchas descripciones de nuevos géneros ahora incluyen análisis moleculares utilizando ADN para demostrar su necesidad, mientras que, en décadas anteriores, la morfología era la base generalmente aceptada para la descripción de nuevos taxa. Más especies recientemente descritas también están siendo publicadas en estudios en los que la evidencia de ADN para su distintivo está incluida (Chase, 2005).

Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes (raramente anuales), terrestres o epífitas, ocasionalmente trepadoras, algunas veces saprófitas o, raramente, micoheterotróficas. Con respecto a las orquídeas epífitas, se dice que pueden llegar a ser eternas. De hecho, en la naturaleza, su supervivencia está ligada a la vida del árbol que las sostiene. Se conocen plantas recolectadas a mediados del Siglo XIX que todavía están creciendo y floreciendo en muchas colecciones (Cáceres, 2012).

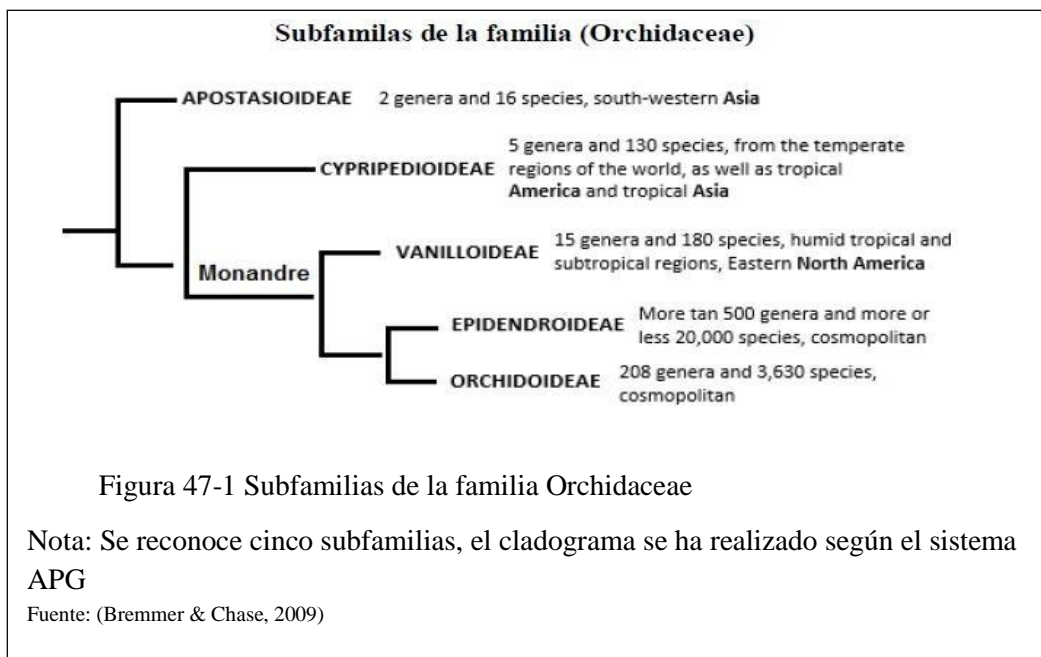
Fueron conocidas y apreciadas por los seres humanos desde la antigüedad. Existen escritos chinos de 1500 años de antigüedad donde se hace referencia al cultivo de las orquídeas. En la antigua Grecia se le atribuían propiedades curativas y afrodisíacas. Los Aztecas utilizaban una orquídea -la vainilla- para enriquecer una bebida espesa hecha a base de Cacao, destinada a los nobles y a los guerreros y era conocida con el nombre de xocoatl, por lo que se puede entender que las orquídeas han existido desde el inicio de la vida misma, y han sido utilizadas por diferentes culturas a lo largo de la historia para varias funciones (Cáceres, 2012).

Ecuador está declarado como el país de las orquídeas mediante el Acuerdo Ministerial (2013), somos poseedores del tesoro de más de 17.058 especies de plantas vasculares, como lo señala el Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica. Ecuador posee cuatro de las cinco subfamilias de orquídeas existentes a escala mundial, las mismas que se desarrollan en ambientes tropicales, subtropicales y en zonas conservadas, templadas o frías de un total de 4032 las especies que hasta el momento han sido clasificadas y publicadas, de las cuales 1714 son endémicas, a más de las 400 que aún se encuentran en proceso de estudio y descripción (Ministerio de Turismo, 2013).

## 1.2 Taxonomía de Orchidaceae

La familia Orchidaceae está colocada en la clase Liliopsida, siendo el clado basal del orden Asparagales (APG, 1998; Chase, 2004). La taxonomía del grupo ha sido enfocada desde varios ángulos, sin embargo (Dressler, 1981) coloca a las orquídeas en una sola familia que divide en seis subfamilias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Orchioideae*, *Spiranθοideae*, *Epidendroideae* y *Vandoideae*; las dos últimas subfamilias involucran a más de la mitad de las especies que integran a la familia (Leopardi Verde, 2008).

La propuesta actualmente aceptada es la de Chase (2005), agrupa a las orquídeas en sólo una familia (Ver Figura. 2): Orchidaceae, que divide en varias subfamilias: *Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Vanillioideae*, *Orchidoideae* y *Epidendroideae*; este sistema de clasificación guarda muchas similitudes con las propuestas de Dressler y Garay (Chase, 2005); sin embargo, cambia el rango de la subfamilia, con lo que reconoce muchos caracteres que separan a este grupo de forma radical y sustenta la inclusión de las *Apostasia Blume* y *Neuwiedia Blume* de forma definitiva dentro de la familia (Orchidaceae) a quienes pertenece el género *Dracula* (Leopardi Verde, 2008).



### 1.3 Orquídeas Epífitas

El término epífito proviene del griego epi=arriba y phyton=planta, lo que literalmente nos indica que son plantas que crecen encima de otras. Vivir sobre otras plantas trae una serie de complicaciones y una forma de adaptación; primero entender que no hay suelo, es decir que no hay sustrato en el que se encuentren los nutrimentos y la humedad necesarios para llevar a cabo las funciones vitales, es una gran desventaja en lo que a captación de agua y minerales se refiere. Para lo cual las orquídeas epífitas han desarrollado modificaciones morfológicas, anatómicas, fisiológicas y han transformado sus flores e inflorescencias para favorecer su éxito reproductivo, captar, absorber y almacenar el agua (Ceja, et al., 2008).

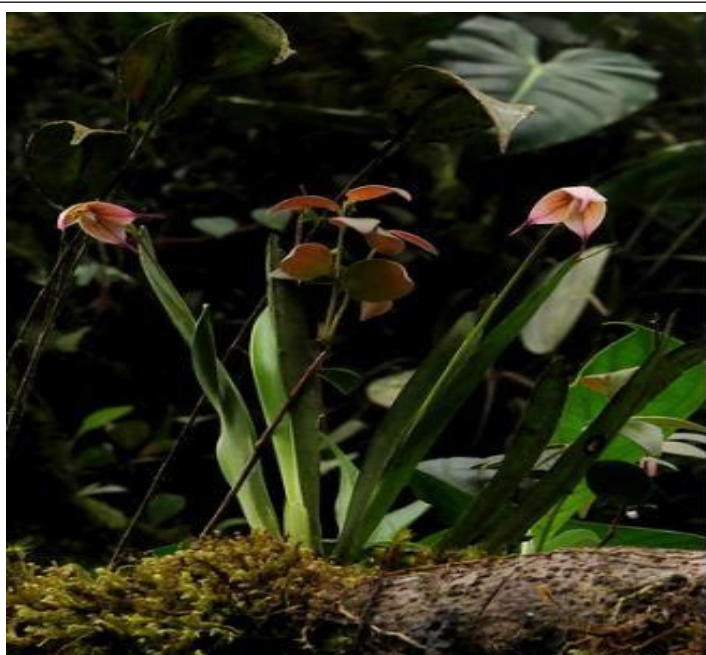


Figura 95-1 Orquídea epífita *Dracula iricolor*

Nota: Orquídea ubicada entre 1900 y 2600 msnm en Ecuador

Autor: (Haelterman, 2013)

Las plantas son fundamentales para los distintos ecosistemas que se presentan en el planeta Tierra, ya que desde los más imponentes árboles hasta las más delicadas hierbas forman la base de todas las comunidades biológicas conocidas. Un componente importante dentro de algunas de estas comunidades son las epífitas (Ver Figura 3-1.), las cuales, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrollen, pueden presentar una gran diversidad de formas. Dichas orquídeas desempeñan un papel muy importante en la dinámica de las comunidades ya que, al estratificarse verticalmente, desde los troncos de los árboles hasta las copas del dosel, ofrecen una gran variedad de nichos y recursos que son aprovechados por diversos grupos de animales, contribuyendo al incremento de la biodiversidad de las comunidades donde se encuentran (Ceja,

et al., 2008).

Como menciona Ceja et al., (2008) estas especies, principalmente las de tipo roseta, acumulan grandes cantidades de agua entre sus hojas, proporcionando una vía alterna en la dinámica de este recurso dentro del bosque, además, la biomasa de las epífitas establecida en las ramas interiores de los árboles, alberga un alto contenido de nutrientes esenciales como fósforo y nitrógeno los cuales posteriormente son reciclados, brindando rutas alternas al ciclo de nutrientes y a la dinámica del agua en las comunidades.

En la mayoría de las orquídeas y en especial en aquellas especies que deben llegar a las altas ramas de la selva tropical para sobrevivir (llamadas orquídeas epífitas) como es el caso del género *Dracula*, los frutos maduros contienen un polvo compuesto de millones de semillas microscópicas que son dispersadas por el viento. Por ser tan pequeñas y ligeras, dichas semillas carecen de tejidos de reserva y en sus primeras etapas de vida, estas plantas viven en colaboración o simbiosis con un hongo que les provee de alimento hasta que la planta puede valerse por sí misma (McKendrick, 2000). Además, esta asociación entre la orquídea con el hongo se mantiene seguramente a lo largo de toda su vida (Gutiérrez, et al., 2014).

La distribución espacial de este tipo de orquídeas se relaciona con las condiciones microclimáticas del hábitat y las características propias del forofito sobre el que crecen. En términos generales los árboles de crecimiento lento, con una copa abierta y con cortezas estables y absorbentes resultan excelentes candidatos. Por lo que su distribución es variada desde selvas tropicales hasta bosques húmedos con diferentes latitudes (Ceja, et al., 2008).

Existe un acuerdo general de que la deforestación en los trópicos está causando un aumento en las tasas de extinción entre la biota tropical, pero hay poca concurrencia o datos escasos sobre las tasas de pérdida de biodiversidad. Entre esos taxones que se puede esperar que sufran pérdidas proporcionalmente mayores son especies de las Orchidaceae, uno de los principales componentes de biodiversidad de los bosques tropicales (Koopowitz, et al., 1993).

El tráfico de plantas silvestres es una de las mayores amenazas a la diversidad biológica, y las plantas epífitas son un grupo especialmente susceptible a esta actividad ya que proveen al mercado hortícola de una gran cantidad de especies principalmente orquídeas, las cuales son extraídas sin ningún tipo de control de las zonas donde habitan, generando desequilibrio en los ecosistemas e incluso la desaparición de algunas especies. Por ello es importante promover estrategias que permitan el uso racional de este recurso, apoyando la economía de las comunidades (Ceja, et al., 2008).

## 1.4 Género *Dracula*

La primera especie de *Dracula* descrita fue *Masdevallia chimaera* por el profesor Reichenbach en 1872 a partir de una colección en la Cordillera Occidental de Colombia por el intrépido viajero bohemio Benedict Roezl. Todas las especies de *Dracula* continuaron describiéndose en *Masdevallia* hasta 1978, cuando se propuso el género *Dracula* para acomodarlas. En ese momento, 51 transferencias se hicieron desde *Masdevallia* debido a los cortos ramicaules y largas colas (Luer, 1993).

La elevación de la sección al género *Dracula* fue propuesta en 1978. Las 100 especies de *Dracula* reconocidas en ese entonces se distribuyen en los bosques húmedos y montañosos de Perú y en los Neotrópicos occidentales del sur de México. Con mucho, la mayor concentración de especies ocurre en las laderas boscosas del noroeste de Ecuador y en la Cordillera Occidental y la Cordillera Central de Colombia (Luer, 1993).

*Dracula* Luer ('pequeño dragón' en latín) que pertenece a la subtribu *Pleurothallidinae*, se distribuye desde América Central a Sudamérica; en Ecuador se han descrito 55 especies. Las orquídeas *Dracula* son en su mayoría plantas epífitas que crecen preferentemente en bosques nubosos, donde se pueden encontrar entre 300 y 2800 metros de altura. Las flores de *Dracula* son clave para identificar especies, porque los caracteres vegetativos son típicamente muy similares para ser una ayuda en la identificación. Aunque no es común encontrar plantas *Dracula* con floración en el campo, se necesitan flores para identificar la mayoría de las especies (Baquero, et al., 2017).

Las especies de *Dracula* se pueden encontrar en muchas Provincias ecuatorianas. En los Andes, *Dracula* se encuentra en Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Bolívar, Azuay y Loja. En la costa región, algunas especies crecen en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo y El Oro. En las provincias amazónicas, *Dracula* se puede encontrar en Sucumbíos, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Baquero, et al., 2017).

Especies de *Dracula* difieren de forma considerable de las *Masdevallia*. Poseen hojas delgadamente coriáceas, pétalos bivalvados en el ápice y verrugosos entre las valvas (vs. agudos a dentados) y un labelo distintamente dividido en 2 partes, con un hipoquilo oblongo articulado al pie de la columna y un epiquilo redondo, cóncavo, con lamelas radiales, mientras que el labelo de *Masdevallia* es simple, ligulado a pandurado, a menudo con dos callos longitudinales en el disco. Reichenbach mismo supo de alguna forma que *Dracula* era distinta del resto del género *Masdevallia*, tanto que en 1873 creó la sección *Saccilabiatae* (con el labelo en forma de saco) para acomodar a su *Masdevallia nycterina* y, de allí en adelante, la mayoría de sus nuevas descripciones de especies que hoy pertenecen a *Dracula*. En 1925, en su monografía de *Masdevallia*, Kränzlin sustituyó (arbitrariamente) el nombre de *Saccilabiatae* por *Chimaeroideae*,

en referencia a la primera especie publicada de este grupo (Pupulin, et al., 2009).

*Dracula hirtzii*



Figura 141-1 Descripción morfológica de *Dracula hirtzii*

A=Hábito. B=Flor. C=Periantio seccionado. D=Pedicelo, ovario, columna y labelo, vista lateral.

E=Labelo, vista ventral. F=Labelo, vista de tres cuartos. G=Columna y ovario, vista ventral.

H=Capucha de la antera y polinario.

Fuente: (Pupulin, et al., 2009).



Un tallo (ramicaule) más corto que la hoja, cubierto por 2-3 vainas tubulares, glumáceas y algo sueltas. La hoja terminal es delgadamente coriácea, con una quilla central pronunciada en la parte inferior a lo largo de la vena media; en el ápice, es generalmente emarginata, con apículo diminuto que se extiende de la quilla media, mientras que la base se contrae gradualmente en un peciolo conduplicado y corto (Ver Figura 4-1). Las inflorescencias se producen lateralmente desde un annulus en el tallo; el pedúnculo es erecto o, más comúnmente, péndulo y lleva una sucesión de flores o raramente una flor solitaria o 2-3 flores que se abren simultáneamente (Pupulin, et al., 2009).

Las plantas de *Dracula* generalmente crecen epífiticamente en acumulaciones de humus musgoso rico en buen drenaje, lugares sombreados en bosques húmedos donde la humedad permanece alta y las temperaturas nocturnas se vuelven frías. Las inflorescencias de la mayoría de las especies descienden y emergen del sustrato suelto para producir flores a cierta distancia de la planta. La mayoría de las especies producen flores sucesivamente a lo largo de una flor en el pedúnculo, al año, pero algunas especies, generalmente producen una flor solo durante una época del año, las especies de *Dracula* se distinguen fácilmente de otros vegetativamente (Luer, 1993).

La mayoría de las especies de *Dracula* son distintas y se diferencian fácilmente cuando existe flor. Algunas especies o complejos variables de especies (por ejemplo *D.houteana* y *D.wallisi*), sin embargo, causan mucha confusión y debate sobre lo que son y dónde dibujar líneas. Algunas poblaciones de estas especies mal definidas podrían ser el resultado de la hibridación natural que es poco común. Se sospecha que algunos taxones anteriormente descritos recolectados en la naturaleza son híbridos naturales (Luer, 1993). La hibridación comercial se ha realizado solo en una escala limitada. El primer híbrido entre especies de *Dracula* era XD. *Jester* (*D. lotax* X *D. ploa*) creada en 1982.

La mayoría de las especies de *Dracula* son relativamente fáciles de cultivar si se pueden cumplir las condiciones adecuadas. Para obtener los mejores resultados, el entorno nativo debe duplicarse lo más cerca posible. La mayoría de las especies son sensibles a la humedad y la temperatura, por lo que no se mueven fácilmente a otro lugar o se muestran. Las especies con inflorescencia descendente se deben cultivar en cestas suspendidas de modo que se proporcione un espacio amplio libre de obstáculos en los lados y el fondo del contenedor para la emergencia de las inflorescencias. La elección del sustrato varía entre los productores para sus condiciones de crecimiento particulares. El riego debe ser frecuente a menos que se pueda proporcionar continuamente una humedad alta y fría. El medio debe estar relativamente suelto, no solo para permitir que la inflorescencia encuentre su camino al descender, sino también para proporcionar continuamente una humedad alta y fría (Luer, 1993).

Además de reconocer el género formalmente, Luer (1978) también desarrolló una clasificación

subgenérica para la especie en *Dracula* como un medio para organizar la especie en grupos lógicos. Subgéneros, secciones, subsecciones y series se definieron principalmente por características florales distintivas, así como morfología externa de los ovarios. Dentro de su sistema, Luer propuso tres subgéneros, dos de los cuales son esencialmente monoespecíficos (D. subgenus *Sodiroa* y D. subgenus *Xenosia*) y uno que contiene la mayor parte de las aproximadamente 120 especies nombradas hasta la fecha (D. subgenus *Dracula*) (Meyer & Cameron, 2009).

Dentro del subgénero *Dracula*, Luer delineó cinco secciones: *Dodsonia*, *Chestertonia*, *Cochliopsia*, *Andreettaea* y *Dracula*. Las primeras cuatro de estas secciones contienen solo ocho especies inusuales, mientras que D. section *Dracula*, en contraste, contiene más de 100 especies. Teniendo en cuenta su tamaño, D. sección *Dracula* se dividió aún más en D. subsección *Costatae* (plantas con ovarios con cresta) y D. subsección *Dracula* (todas las demás), esta última siendo separado en tres series: *Parviflorae* (plantas de flores pequeñas), *Grandiflorae-parvilabiatae* (plantas con flores grandes, pero etiqueta pequeña), y *Dracula* (plantas con flores grandes y etiquetas grandes) (Meyer & Cameron, 2009).

**Tabla 1-1** Clasificación subgenérica actual del género *Dracula*

Subgénero	Sección	Subsección	Series	Especies Representativas
<i>Xenosia</i>				
<i>Sodiroa</i>				<i>D.xenos</i>
<i>Dracula</i>	<i>Andreettaea</i>			<i>D.sodiroi</i>
	<i>Chestertonia</i>			<i>D.andreettae</i>
	<i>Cochliopsia</i>			<i>D.chestertonii</i>
	<i>Dodsonia</i>			<i>D.cochliops</i>
	<i>Dracula</i>	<i>Costatae</i>		<i>D.dodsonii</i>
		<i>Dracula</i>	<i>Parviflorae</i>	<i>D.velutina</i>
			<i>Grandiflorae- parvilabiatae</i>	<i>D.gigas</i>
			<i>Dracula</i>	<i>D.wallisii</i>

Nota: Subgéneros, secciones, subsecciones y series se definieron principalmente por características florales distintivas, así como morfología externa de los ovarios.  
Fuente: (Luer, 1993).

En las últimas tres décadas, se han seguido describiendo nuevas especies de *Dracula*, y con ellos han surgido una cadena de dificultades taxonómicas que podrían abordarse a través de análisis filogenético molecular que aclare las dudas hipotéticas sobre estas especies (Meyer & Cameron, 2009).

## 1.5 Polinización

Las orquídeas del género *Dracula* han sido sospechosas por mucho tiempo de ser imitaciones de hongos. Tienen un labelo ahuecado que generalmente está alineado con crestas paralelas o radiantes que se asemeja a la tapa y las branquias de un hongo invertido, sépalos de manchas oscuras en una luz fondo, largas colas, y a veces un olor a hongos. Estas características sugieren que las flores atraen saprófago o méfago insectos que accidentalmente actúan como polinizadores en ellas (Endara, et al., 2010).

Las flores usan señales olfativas y visuales para comunicarse con los polinizadores. Desenredar las contribuciones relativas y las sinergias potenciales entre las señales sigue siendo un desafío. Comprender los sesgos perceptivos explotados por el mimetismo floral ilumina la evolución de estas señales. Los mecanismos por los cuales las plantas en general atraen a los polinizadores pueden ser diversos y a menudo multimodales, particularmente en sistemas engañosos. Las orquídeas *Dracula* no son ninguna excepción, con señales visuales y olfativas que contribuyen al éxito total en atraer visitantes. Los personajes que definen el género *Dracula*, un labelo en forma de champiñón, "agallado" y un cáliz con estampado llamativo, mejoran la atracción del polinizador explotando los sesgos perceptuales visuales y quimiosensores de las moscas drosófilicas (Policha, et al., 2016).

Estas orquídeas presentan olores característicos poseen una ligera fragancia que recuerda a los hongos y son polinizadas generalmente por moscas de la familia *Drosophilidae* (Pupulin, et al., 2009). Los insectos que se encuentran dentro del orden díptero son relativamente pequeños y específicamente los que se localizan dentro del género *Zygothrica*, eliminan y depositan cargas de polen sobre las especies de *Dracula* (Policha, et al., 2016). Las moscas Zygothricas (Ver Figura 5-1) que son superficialmente similares a las moscas de la fruta, completan parte de su ciclo de vida en las superficies de hongos, donde se reproducen, ponen huevos y en algunos casos se alimentan de tejidos de hongos o levaduras (Policha, et al., 2016).

## POLINIZACIÓN

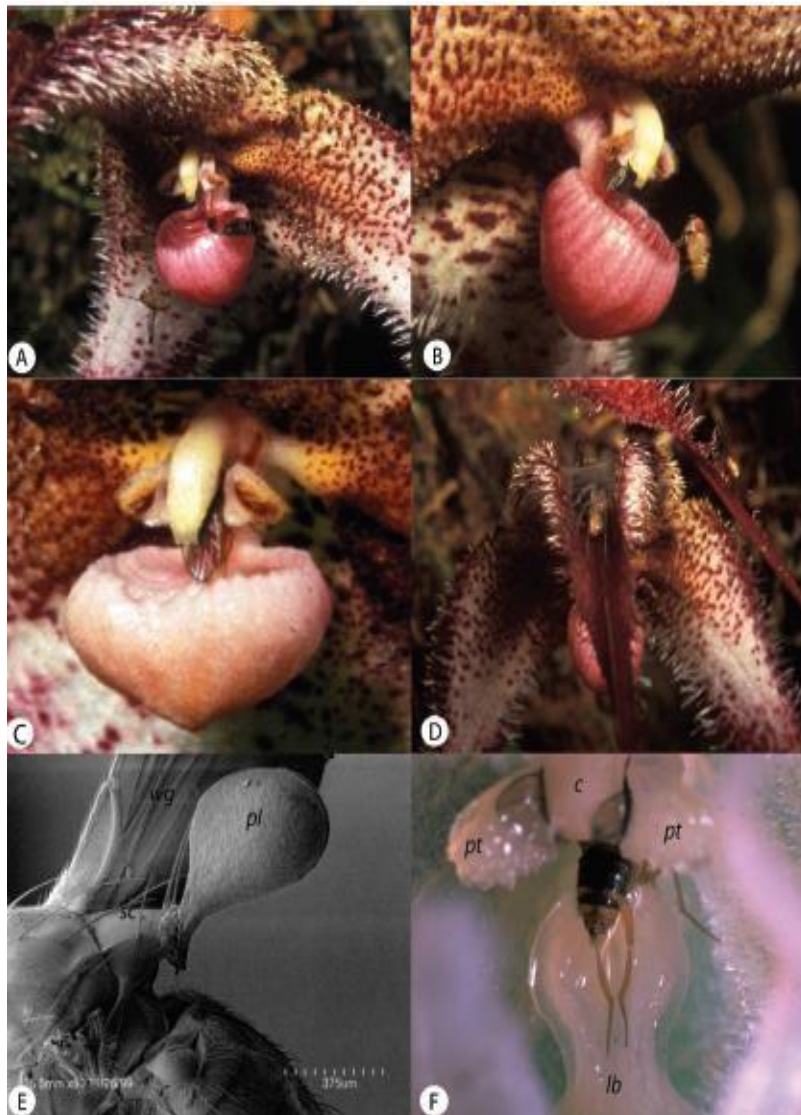


Figura 6-1 Polinización de la orquídea *Dracula lafleurii*

A=Comportamiento de lapeo y semaforización mostrado por los visitantes de *Dracula lafleurii* y comportamiento territorial en labelo; B=Comportamiento territorial de *Zygothrica* en el labio de *D. lafleurii*; C=Una araña que captura moscas en el sépalo dorsal de *D. lafleurii*; D=*Zygothrica* sp. entrando en la cámara columnar de *D. lafleurii*; E=SEM de la polinia de *D. lafleurii* unido al escutelo de *Zygothrica*; F=*Zygothrica* sp. Atrapado en la cámara columnar; c: columna, pt: pétalo, lb: labelo. Fuente: (Endara, et al., 2010).

## **1.6 Marcadores Moleculares**

Los marcadores moleculares son caracteres que se pueden usar directa o indirectamente para obtener información sobre la genética de caracteres de un organismo en estudio (Rosas, 2001). Se pueden detectar a diferentes niveles incluyendo morfológico, bioquímico y molecular. A diferencia de los demás marcadores moleculares no son afectados por el ambiente y no varían con la edad de la planta. Pueden ser regiones codificantes, aunque la mayoría de los polimorfismos ocurren en regiones no codificantes (Aguilar, 2003).

La biología molecular ha evolucionado incesantemente en el desarrollo de nuevas técnicas para el uso de diferentes tipos de marcadores moleculares, cada vez más complejos y específicos, en las ciencias biológicas. En términos generales, para el uso eficaz en estudios de biodiversidad se debe considerar: 1) la base genética del polimorfismo revelado, 2) los aspectos técnicos del método; y 3) las ventajas y limitaciones implícitas (Rosas, 2001).

En los últimos años el uso de marcadores moleculares se ha enfatizado para trabajos en botánica sistemática. Los marcadores moleculares se han aplicado en estudios filogenéticos para diversos géneros. En el Instituto de Ecología en México se utilizó el ADN ribosomal ITS (internal transcriber spacer) y el ADN trnL-F del cloroplasto en el género *Ceratozamia* (González & Vovides, 2002).

### ***1.6.1 Marcadores Moleculares en orquídeas***

Las orquídeas han presentado varios problemas para los taxónomos (Przeslawski, 1995). Debido a que no se han encontrado fósiles de orquídeas de más de 30000 años, nadie está seguro de su origen o linaje. Los problemas también se han encontrado dentro de la familia. Los análisis de ADN pueden responder a algunas de las preguntas difíciles de la taxonomía de las orquídeas.

El precursor de los análisis moleculares en orquídeas, Mark Chase, ha contribuido a la taxonomía de estas plantas por más de 10 años, utilizando marcadores moleculares en el gen *rbcL* del cloroplasto de la planta. Con el uso de análisis molecular se ha logrado corregir errores de identificación, comprobando la utilidad de la información en el área de la botánica. Un alto grado de correlación existe entre los análisis moleculares y no moleculares, apoyando las descripciones cladísticas (Przeslawski, 1995).

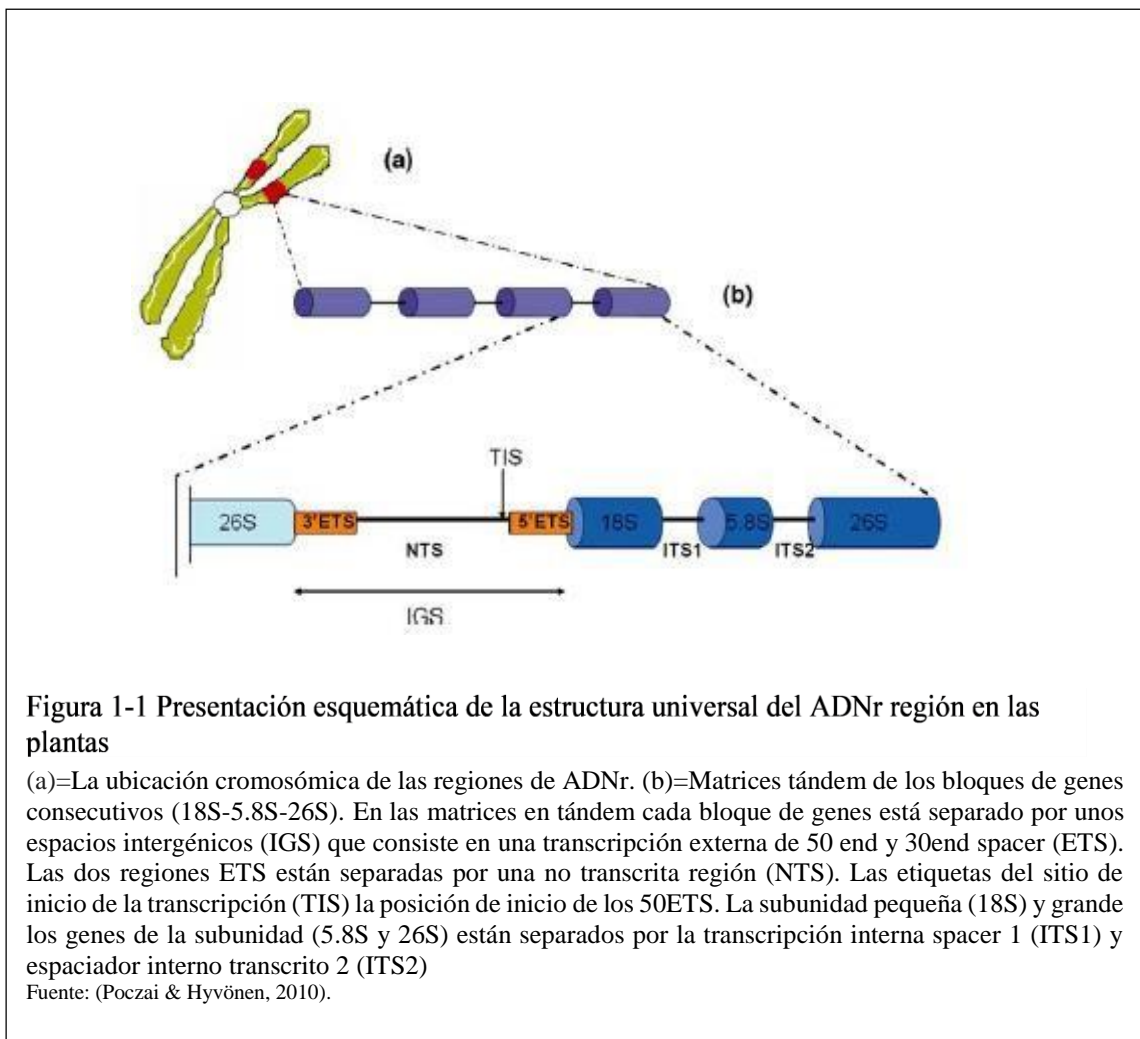
El análisis molecular resulta ser una herramienta valiosa en el cultivo de plantas. La selección basada en el ADN tiene ventajas sobre la selección convencional. Debido a que el ADN contenido en las células de un individuo es constante durante su desarrollo y disponibles en todo el tejido, análisis moleculares son posibles a edades tempranas de la planta. Las secuencias de ADN son constantes independientes de las condiciones ambientales permitiendo una selección eficiente cuando se buscan rasgos de tolerancia a temperatura y resistencia a enfermedades. Además de ser útil para la selección, el polimorfismo en el ADN puede ser usado para la identificación de especies/híbridos. La aplicación de estudios moleculares enfocados al cultivo de orquídeas muestra ser de utilidad debido al ciclo de vida largo de muchas de las especies. Los estudios moleculares concernientes a orquídeas proveen importante información de la estructura genómica de esta importante familia (Benner, 2004).

Los análisis de ADN se utilizan mayormente en el estudio de la filogenética de las orquídeas. (Dressler, 1981) utilizando sistemática molecular definieron un nombre genérico nuevo para el complejo “*Cattleya*” *skinneri*, *Guarianthe*. Se basaron en los análisis obtenidos mediante la comparación de secuencias de ADN. En el Royal Botanic Gardens, Kew, Pridgeon y Chase (2003) evaluaron la sub – tribu *Pleurothallidinae* para definir su filogenética, utilizando ITS. Según Norris y Whitten (2003), los límites genéricos y de sub – tribus han sido caóticos, pero sus delimitaciones en los grupos avanzados del Neotrópico están basadas en cladogramas obtenidos de análisis nucleares (ITS) y plástidos (*matK*, *trnL*, *F* y *atpB-rbcL*). Los estudios moleculares se han utilizado ampliamente en la familia *Orquidaceae* para definir cercanías genéticas entre sub – familias, tribus, sub – tribus, géneros y especies como lo demuestra Van Der Berg (2000) en su trabajo de análisis molecular utilizando ITS para *Laeliinae* (*Orquidaceae*) (Aguilar, 2003).

### ***1.6.2 El Espaciador Transcrito Interno (ITS) como marcador filogenético***

Los genes del ARN ribosomal (ARNr) y sus regiones espaciadoras se han utilizado ampliamente como fuente de información filogenética en toda la amplitud de la vida y sus diferentes formas. La popularidad del locus rDNA para filogenia podría ser atribuida a los fenómenos que sirven al mismo en función de todos los organismos de vida libre. Ellos tienen lo mismo o casi la misma estructura dentro de una amplia gama de taxones estructurados (Poczai & Hyvönen, 2010).

Las regiones de codificación, como el gen de la subunidad pequeña y grande, representan algunas de las secuencias más conservadoras en eucariotas, que es el resultado de una fuerte selección contra cualquier mutación. Las regiones espaciadoras del locus de rDNA (Ver Figura. 6) poseen información útil para la sistemática de plantas desde la especie hasta el nivel genérico. También se han utilizado en estudios de especiación y biogeografía, debido a la alta variabilidad de secuencia y divergencia. Hay tres regiones espaciales notables: los espaciadores transcritos externos (ETS) e internos (ITS) por sus siglas en inglés respectivamente y el espaciador intergénico (IGS) (Poczai & Hyvönen, 2010).



ITS está intercalado en el Región 16S-5.8S-26S que separa los elementos del ADNr locus. La región ITS consta de tres partes: la ITS1 e ITS2 y el exón 5.8S rDNA altamente conservado ubicado entre ellos. La longitud total de esta región varía entre 500 y 750 pb en angiospermas, mientras que en otras plantas de semillas pueden ser mucho más larga, hasta 1.500-3.500 pb. Ambos espaciadores se incorporan en el ribosoma maduro, pero se someten a una división específica durante la maduración de los ARNs ribosomales. La correcta estructura de orden superior de ambos espaciadores es importante para dirigir enzimas endonucleolíticas para sitios de corte adecuados. Aunque, la longitud de la secuencia de ITS2 es muy variable entre diferentes organismos, Hadjiolova et al. identificó dominios estructuralmente homólogos dentro de los mamíferos y *Saccharomyces cerevisiae* (Poczai & Hyvönen, 2010).

Además de varias ventajas, hay muchos inconvenientes para el uso de datos de ITS de ADNr en estudios evolutivos. Existen cientos o miles de copias ITS en una planta típica genoma. Inferir filogenia de familias multigenes como ITS puede conducir a resultados erróneos, porque hay variación entre las diferentes repeticiones presentes en un solo genoma eucariota. La evidencia ahora sugiere que esta variación entre las secuencias de ITS de un organismo se encuentra solo dentro de organismos que son híbridos o poliploides (Poczai & Hyvönen, 2010).

La secuencia ITS amplificada es un consenso de muchos objetivos compartiendo los mismos sitios de cebado en uno o varios loci usualmente ubicado en cromosomas separados. Esta secuencia de consenso utilizado como una fila de datos en el análisis filogenético es un fenotipo molecular a partir del cual el genotipo del organismo no siempre se puede inferir. ITS2 es un marcador muy adecuado con un amplio uso en análisis filogenéticos de bajo nivel, a medida que evoluciona su secuencia bastante rápido. Esta característica, hizo que la región sea útil para análisis a nivel genérico e infragenérico. La posibilidad de predecir estructura plegable ha mejorado el papel de ITS en estudios filogenéticos, ya que esto mejorará la alineación de la secuencia que puede basarse en estructuras secundarias (Poczai & Hyvönen, 2010).

La predicción exitosa de estructuras secundarias de ITS1 y para comparar estas secuencias entre géneros o familias es más difícil que en el caso de ITS2. ITS1 parece evolucionar más rápido, y tiene sitios menos conservados que ITS2. Sin embargo, hay algunos estudios que han utilizado ITS1 como predicción de estructura en análisis filogenéticos, siendo el del presente estudio el primero que utilice dicho marcador en el género de orquídeas *Dracula*. La reconstrucción del transcrito de ARN ITS1 secundario modelo de estructura no siempre es exitoso entre diferentes géneros de plantas (Poczai & Hyvönen, 2010).



## 1.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa

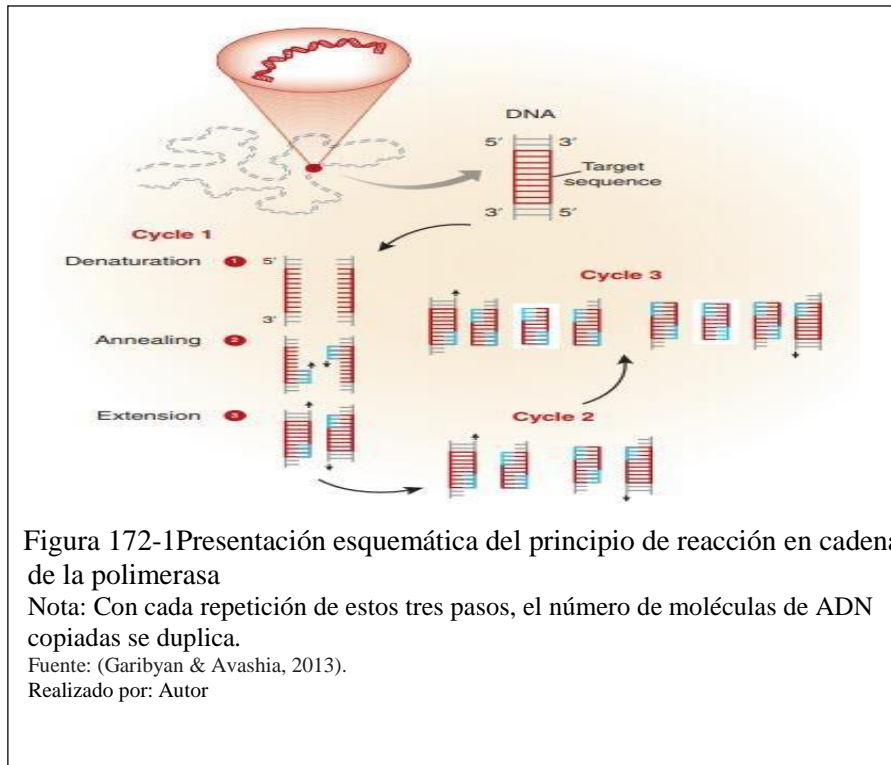
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una nueva e ingeniosa herramienta para la biología molecular que ha tenido un efecto importante en la investigación similar al descubrimiento de las enzimas de restricción y la transferencia. Es tan sensible que una sola molécula de ADN amplifica, se extraen rutinariamente genes de una sola copia de mezclas complejas de secuencias genómicas y se visualizan como bandas distintas en geles de agarosa (Innis, et al., 2012).

PCR puede realizarse utilizando ADN de origen de una variedad de tejidos y organismos, incluyendo sangre periférica, piel, cabello, saliva, y microbios. Solo se necesitan pequeñas cantidades de ADN para PCR generar suficientes copias para ser analizadas usando métodos convencionales de laboratorio (Ver Figura. 7). Cada ensayo de PCR requiere la presencia de ADN plantilla, cebadores, nucleótidos y ADN polimerasa. La ADN polimerasa es la enzima clave que une nucleótidos individuales juntos para formar el producto de PCR. Los nucleótidos incluyen las cuatro bases: adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C, G) que se encuentran en el ADN (Garibyan & Avashia, 2013).

Hay dos métodos principales para visualizar los productos de PCR:

1. Tinción del producto de ADN amplificado con una sustancia química colorante como el bromuro de etidio, que se intercala entre las dos cadenas del dúplex que fue el utilizado en este trabajo
2. El etiquetado de los cebadores de PCR o nucleótidos con colorantes fluorescentes (fluoróforos) antes a la amplificación por PCR (Garibyan & Avashia, 2013).

El método más ampliamente utilizado para analizar el producto de PCR es gel de agarosa electroforesis, que separa los productos de ADN sobre la base de tamaño y carga. La electroforesis en gel de agarosa es el más fácil método para visualizar y analizar el producto de PCR. Permite la determinación de la presencia y el tamaño de la PCR producto (Garibyan & Avashia, 2013).



## 1.8 Gel de Electroforesis

El desarrollo de la electroforesis en gel como método de separación y análisis del ADN ha sido una de las fuerzas que impulsa la revolución en la biología durante los últimos 20 años. En principio, la electroforesis en gel de ADN es conceptualmente fácil de entender y técnicamente fácil de ejecutar. En práctica, hay muchos pequeños detalles que afectan la precisión y reproducibilidad de los resultados (Magdeldin, 2012).

La electroforesis es la migración de partículas cargadas o moléculas en un campo eléctrico. Esto ocurre cuando las sustancias están en solución acuosa. La velocidad de la migración depende de la intensidad del campo eléctrico aplicado y de las cargas de las moléculas. Así, moléculas cargadas de forma diferente formarán zonas individuales mientras migran. Para mantener la difusión de las zonas a un mínimo, se lleva a cabo la electroforesis en un medio viscoso fluido o una matriz de gel. Por lo tanto, la velocidad de la migración también depende del tamaño de las moléculas. De esta manera, el fraccionamiento de una mezcla de sustancias se logra con una alta resolución (Westermeier, 1997).

El gel de agarosa es un polisacárido obtenido de algas rojas. El tamaño de poro depende de la concentración de agarosa (peso de agarosa por volumen). La agarosa se disuelve en agua hirviendo y forma un gel durante el enfriamiento. Durante este proceso, se construyen hélices dobles, que se unen lateralmente para formar filamentos relativamente gruesos. Este hecho

permite la preparación de geles con grandes tamaños de poros y alta estabilidad mecánica. Geles de agarosa se ejecutan en cama plana de diseño simple cámaras debajo de una capa de amortiguación para evitar el secado. La temperatura solo está controlada por las condiciones de funcionamiento aplicadas y los ácidos nucleicos se separan en condiciones nativas (Westermeier, 1997).

Por lo tanto, los geles de agarosa son simples, rápidos de preparar y muy apropiados en PCR (Chawla, 2004). Ellos son los medios más populares para la separación de ácidos nucleicos moderados y de gran tamaño y tienen un amplio rango de separación, pero un poder de resolución relativamente bajo, ya que las bandas que se formaron en los geles tienden a ser borrosos y separados. Esto es resultado del tamaño de poro o la molécula y no puede ser en gran parte revisado (Magdeldin, 2012).

## **1.9 Secuenciación**

Es el proceso que se le da al ADN posterior a la reacción de PCR con la finalidad de conocer la secuencia de bases nitrogenadas que forma la cadena de ADN. (Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano, 2015) Aunque originalmente existían otros métodos, no fue hasta 1977 cuando Sanger y otros colaboradores establecieron la estrategia que sería utilizada durante más de 2 décadas, y todavía en uso para ciertos casos, para cumplir con este objetivo (Garrigues, 2017).

### ***1.9.1 Secuenciación de Sanger***

Para este método resulta esencial disponer de un ADN de cadena simple (molde) y un iniciador, cebador o "primer" complementario de una región del ADN molde anterior a donde va a iniciarse la secuencia. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima ADN polimerasa I que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de ADN (Rodríguez, 2014).

Esta estrategia se basa en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple (que se utiliza como molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro 2'-deoxinucleótidos que componen la secuencia del ADN (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos últimos nucleótidos "especiales" o nucleótidos de parada, están diseñados para que carezcan del grupo 3'-OH, que permite la adición del nucleótido consecutivo, de forma que cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa se interrumpe la síntesis de la nueva hebra. Esto lleva a que se obtengan fragmentos secuenciados de diferente tamaño, según dónde se incorporen los dideoxinucleótidos (Garrigues, 2017).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Metodología

#### 2.2 Población de estudio

La población de estudio son 55 orquídeas del género *Dracula*, ubicadas en el Ecuador. Este género en particular conlleva una serie de dificultades taxonómicas debido a que en los últimos años se ha seguido descubriendo nuevas especies de *Dracula*, lo cual puede abordarse mediante un análisis filogenético molecular.

#### 2.3 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra son 54 especies tomando 2 muestras de cada una, dando un total de 108 muestras de orquídeas del género *Dracula*, identificadas por su morfología cada una de las especies obtenidas que se encuentran ubicadas en el Ecuador.

#### 2.4 Técnicas de recolección de los datos

##### 2.4.1 Toma de muestras

El material recolectado provino de 54 especies del género *Dracula* identificadas morfológicamente de las colecciones: “Jardín Botánico de Quito”, “Colección de Alberto Guerrero”, jardín botánico “Orquídeas de Sarina” de la ciudad de Quito y “Colección de Digna Chacón” y “Colección de Guadalupe Utreras” en la comunidad Huaca Carchi, dichas muestras de Carchi ya fueron recolectadas por el docente a cargo Dr. Marco Cerna PhD y los tesisistas respectivos de la UPS. Las muestras restantes se recolectaron en el mes de octubre y noviembre del 2017 en la ciudad de Quito (Latitud: 0°13'47" S; Longitud: 78°31'29" O y Altitud sobre el nivel del mar: 2854 m).

Las muestras genéticas de trozos de sus hojas obtenidas se rotularon e identificaron individualmente mediante una codificación simultánea asignada a cada especie obtenida, guardadas cada una de ellas en sobres de papel Kraft y estas a la vez en bolsas de cierre hermético con silica gel para evitar la humedad de las mismas. Al ser transportadas al laboratorio las muestras genéticas se conservaron a una temperatura de -20°C en el refrigerador TEMPLOW del laboratorio de la UPS.

#### 2.5 Técnicas moleculares

### 2.5.1 Extracción de ADN

Previo a la extracción de ADN de las muestras se preparó los reactivos pertinentes que posteriormente se utilizaron en el protocolo de extracción después descrito:

SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% se preparó pesando 10.5g de SDS (95%) en un vaso de precipitación en el cual se vertió 89.5 mL de agua millipore, agitando lentamente el contenido; reactivo utilizado como detergente iónico para romper enlaces no covalentes en las proteínas del ADN.

Cuando se terminaba el Fenol-Cloroformo en el laboratorio se utilizaba como reemplazo el cloroformo-alcohol isoamílico al 14%, el cual cumplía la misma función de desnaturalizar las proteínas contenidas.

El Buffer Lisis permitía la liberación de los ácidos nucleicos, éste se ajustaba su pH a 8 con la ayuda de HCl 1 molar.

Tampón Lisis se realizaba pesando 0,6055g de Tris, 0.74g de EDTA, 1,461g NaCl y aforado a 50 mL de Agua millipore, ajustando su pH a 8; éste se agregaba para romper las estructuras de membrana o pared celular.

El acetato de potasio(5M) se preparaba pesando 4,907g de Acetato de Potasio aforados a 100 mL de Agua millipore; el cual se usa para separar el ADN plásmido del ADN cromosómico.

Se trabajó en el laboratorio de biología molecular de la UPS desde las 7am con la extracción de ADN de las hojas proceso que empezó a realizarse desde el mes de octubre del 2017 con las diferentes especies del género *Dracula* que se lo hizo mediante el protocolo Doyle & Doyle (Doyle, 1987) modificado por (Massensini, 2013); se pulverizó la muestra de aproximadamente 30 mg con la ayuda de nitrógeno líquido dentro de un tubo eppendorf de 2mL, a este se le añadió 600 µL de tampón lisis con el que se agitó a la muestra para homogeneizar el contenido, por consiguiente se añadió 94 µL de SDS al 10% y se calentó la muestra en baño María a 65 °C durante 10 minutos exactos en un termo bloque; luego añadí 118 µL de Acetato de Potasio (5M), que se mezcló por inversión de 2 a 8 veces y se deja enfriar durante 5 minutos, al transcurrir el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos en la centrifuga Labnet, se procedió a diferenciar dos capas claramente, se toma 2mL de sobrenadante a un tubo nuevo previamente etiquetado, a continuación se añade 600 µL de Fenol-Cloroformo (1:1), se centrifugó los tubos durante 5 minutos a 12000 rpm, en este paso se tuvo mucho cuidado por la formación de dos capas en el que se transfirió 250 µL sólo de la primera capa formada a un microtubo nuevo en el cual se le añadió 360 µL de Isopropanol Frío, se mezcló por inversión como anteriormente se indicó y se dejó almacenado toda la noche a una temperatura de -20°C en la refrigeradora TEMFLOW. Transcurrido el tiempo establecido las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm a 3 minutos, se procedió a realizar los 3 lavados, añadiendo 400 µL de etanol al 70% y centrifugando cada vez

que se realizó un lavado, teniendo mucho cuidado en la formación de pellet al final del microtubo, para finalizar con el protocolo la muestra se colocó a 35°C en baño María durante 20 minutos, tiempo que variaba dependiendo si los microtubos estaban completamente secos sin alcohol en el termo bloque y se conservó el pellet obtenido en 30 µL de TE 1X a -20° C guardados en el congelador (Ver ANEXO B).

		
<p><b>Fotografía 1-2</b> Toma de 30 mg aproximadamente de la hoja.</p>	<p><b>Fotografía 2-1</b> Muestra pulverizada</p>	<p><b>Fotografía 3-2</b> Muestras centrifugadas.</p>

### 2.5.2 Marcadores Moleculares

Para este estudio se utilizó el marcador molecular ITS (18S-26S), actualmente ha sido muy utilizada como un marcador genético nuclear en diferentes poblaciones tanto de hongos como de plantas, el mismo posee una extensión de entre 500 a 750pb, estos espaciadores se incorporan al ribosoma, pero sufren una escisión específica en el momento de la maduración del ARN ribosómico (Poczai & Hyvönen, 2010).

### 2.5.3 Amplificación por PCR




Previo a la amplificación por PCR se preparó TBE 10X (54g de Tris, 27,5g de Ácido bórico y 2.93g de EDTA 0,5M) y TBE 1X (Diluido el TBE 10X) para 500 mL a un pH de 8, el cual se fue regulando con la ayuda de HCl 1 molar; estos sirven para inhibir nucleasas y como conductores eléctricos en la electroforesis.

Para el proceso de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se lo realizó diferentes días de la semana empezando desde el 22 de noviembre del 2017 en el que se amplificó diariamente 6 segmentos de ADN específicos, con el cual se trabajó en las regiones de ITS amplificando los cebadores ITS1 (Forward) el cual fue utilizado para la secuenciación y el ITS4 (Reverse), mediante la utilización de la Taq DNA Polymerase Recombinant previamente preparada este

proceso se lo hizo en el termociclador convencional (MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler). La replicación en el termociclador (Ver ANEXO D) como es exponencial dado que la PCR va operando por ciclos; cada ciclo implicó tres etapas: primero fue la desnaturalización a 94°C, en segundo fue la unión de los *primers* a 53°C y elongación a 72°C a un volumen total de 25 µL.

#### 2.5.4 Electroforesis

Los resultados obtenidos de las diferentes amplificaciones realizadas por PCR se reconocieron por la electroforesis horizontal, dicha técnica se utilizó para conocer la calidad, la cantidad y el tamaño molecular de las especies con las que estábamos trabajando; estos se cargaron junto con un tampón de carga en pocillos previamente moldeados, en donde una reacción se la analizó con 4µL de producto de PCR + 4 µL de Tampón de carga 6X, en un gel de agarosa (0.5 gr de gel de Agarosa en 50 ml de TBE 1X+ 5uL de SYBR Safe DNA gel stain de invitrogen (C28H28N2O3S2) al 1%; este gel se colocó en la cámara de electroforesis previamente armada y se programó a 90 V por 40 min, en este tiempo se genera una corriente eléctrica a fin de que las moléculas cargadas migren de un polo a otro, al finalizar este tiempo el gel se visualizó bajo luz UV del fotodocumentador (MicroBis DNR Bio-Imaging Systems).

		
<p><b>Fotografía 4-2</b> Gel solidificado</p>	<p><b>Fotografía 5-2</b> Colocación de 4 µL de Blue sobre el Parafilm</p>	<p><b>Fotografía 6-2</b> Carga de los pocillos con 4 µL de producto PCR y 4 µL de Blue en la cámara</p>

### 2.5.5 Secuenciación

Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados en Macrogen Inc. Corea del Sur quienes trabajan mediante el método de Sanger. Esta compañía purifica y realiza la reacción de secuenciado a partir de 20 µL del producto PCR. Los productos amplificados fueron diluidos, etiquetados y sellados con bomba al vacío para su envío a la compañía. Además del producto PCR es necesario enviarle los *primers* específicos correspondientes a cada marcador molecular. En todas las muestras con las que se trabajó, se secuenció sólo una cadena del ADN (forward), por lo que se envió solo el ITS1.

Tabla 2-2 Primers ITS utilizados para la amplificación de regiones cloroplásticas de ADN

Primers	Secuenciación (5´-´3)
ITS 1(F)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4(R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC

**Nota:** (F) Secuencia Forward y (R) Secuencia Reverse.

**Fuente:** (Moreno Mariela, 2018)

### 2.5.6 Análisis Filogenético

Las secuencias obtenidas fueron manualmente analizadas mediante el software libre Finch Tv DNA Sequencing para Windows creado por Geospiza (2012); en el cual se eliminó los picos de los inicios de la secuencia y aquellos donde las curvas estaban indefinidas por los pares de bases. Con FinchTV, podemos imprimir los datos, editarlos, exportar secuencias FASTA a un sin número de programas bioinformáticos y ver todos los detalles almacenados en sus archivos de secuencia.

Al conjunto de secuencias correspondientes al género *Dracula* en estudio, se le agregó 3 secuencias de orquídeas las cuales fueron utilizadas como outgroup para el enraizamiento del árbol filogenético que se realizó, siendo *Masdevallia picturata*, *Masdevallia yungasensis* y *Diodonopsis erinacea*, secuencias bajadas del GENBANK utilizadas para el proceso. La generación del árbol se realizó en el software libre MEGA 7 se alinearon bajo el sistema MUSCLE con los parámetros predeterminados, los árboles filogenéticos se construyeron con el método estadístico Neighbor-Joining y el método Test Maximun likelihood ambos bajo máxima verosimilitud y con 1000 réplicas.



## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Resultados

#### 3.2 Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas de cinco lugares lo que permitió la recolección de 54 especies del género descritas en el Ecuador recolectadas por duplicado dando un total de 108 muestras (Ver ANEXO E), las cuales fueron donadas por coleccionistas; en la ciudad de Quito se colectó 26 muestras del “Jardín Botánico Quito”, 35 muestras de la colección del señor Alberto Guerrero, 28 muestras del jardín botánico “Orquídeas de Sarina”; en el cantón Huaca de la provincia de Carchi se tomaron 9 especies de la colección de Digna Chacón y 9 especies de Sra. Guadalupe Utreras. Dichas muestras se empezaron a recolectar desde el mes de agosto del 2017 empezando por Huaca Carchi y terminando en el distrito metropolitano de Quito en noviembre del 2017.

#### 3.3 Técnicas moleculares

##### 3.3.1 *Extracción de ADN*

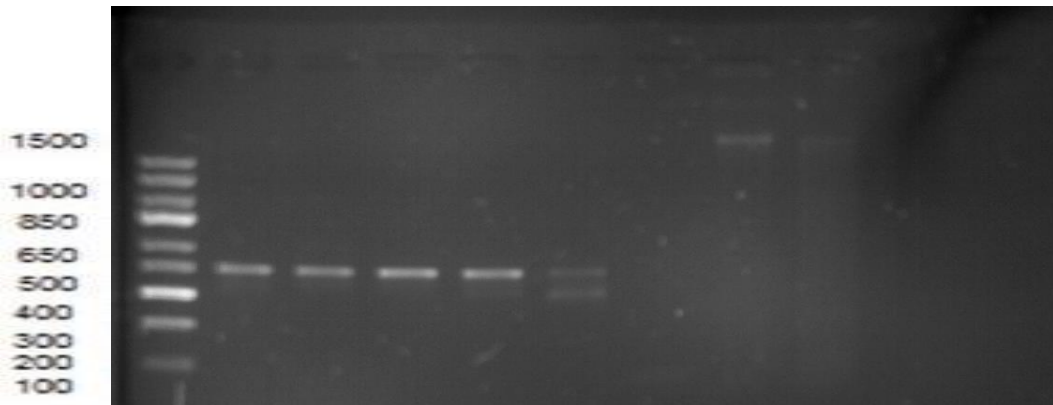
El protocolo de extracción utilizado en el presente trabajo obtuvo ADN de las muestras extraídas como Sánchez Callejas (2016) logrando obtener ADN para la realización de los análisis posteriores como la electroforesis horizontal, PCR y secuenciación, puesto que se trabajó con material fresco, que es fácil para romper las paredes celulares y obtener el ADN de una forma inmediata y segura.

##### 3.3.2 *Amplificación*

Se amplificó las muestras en un rango de 500 pb a todas las especies del género utilizando los cebadores ITS1 e ITS4, expresado el rango de amplificación por el marcador molecular (MM) en la columna del lado izquierdo de las gráficas y la codificación de las muestras explicada a que especie pertenece, en los carriles de cada uno de las figuras de electroforesis.

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE ITS

MM 3400 3401 3402 3403 3404

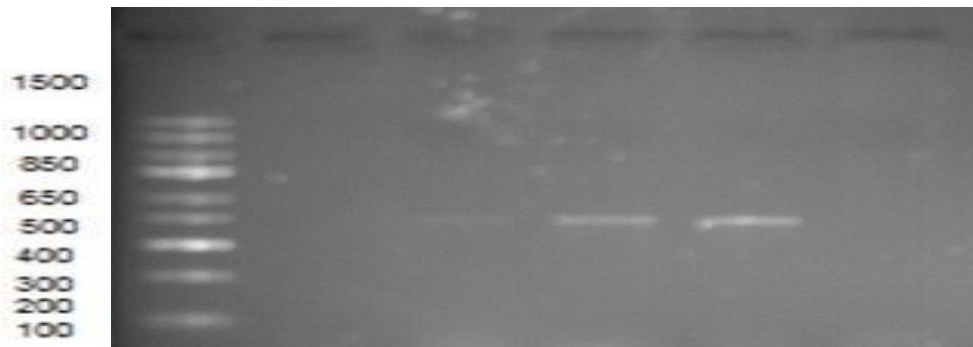


**Figura 1-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra, la muestra que salió con doble banda fue repetida.

Carriles: *D.simia*, *D.eythrochaete*, *D.vampira*, *D.sodiroi*, *D.fuliginosa*  
Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE

MM 3412 3413 3419



**Figura 2-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.erythrocodon*, *D.cordobae*, *D.gigas*  
Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE ITS

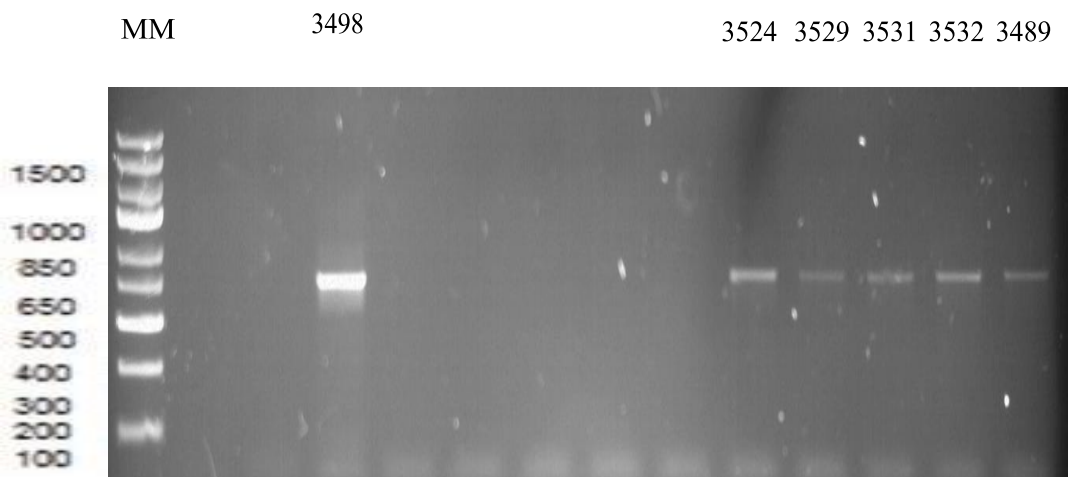


**Figura 3-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.psyche*, *D.felux*, *D.fuliginosa*, *D.erythrocodon*, *D.polyphemus*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE ITS



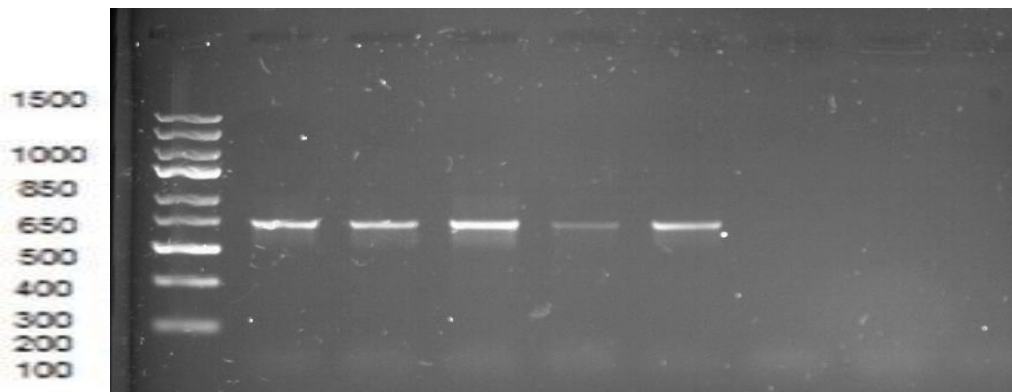
**Figura 4-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra, se diluyó la muestra de *D.levii* para la secuenciación por tener mucha concentración

Carriles: *D.levii*, *D.hirtzii*, *D.ubangina*, *D.tubeana*, *D.hirsuta*, *D.andreettae*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE

MM 3441 3485 3487 3442 3489



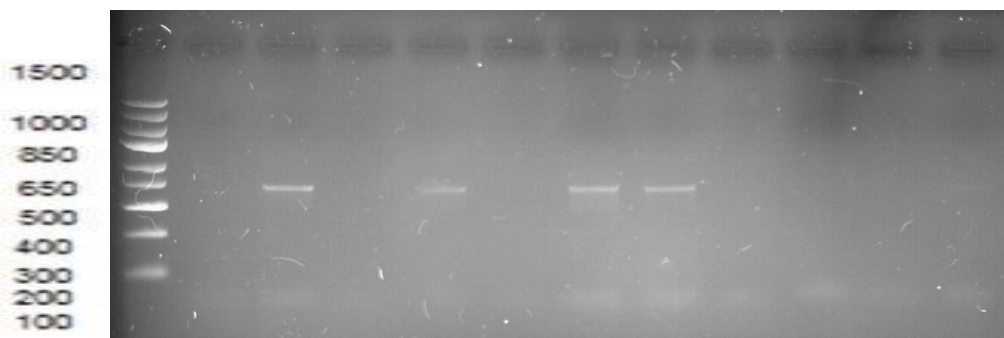
**Figura 5-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.vespetillio*, *D.terborchii*, *D.dalstroemii*, *D.dalessandroi*, *D.andreettae*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE ITS

MM 3615 3421 3603 3609

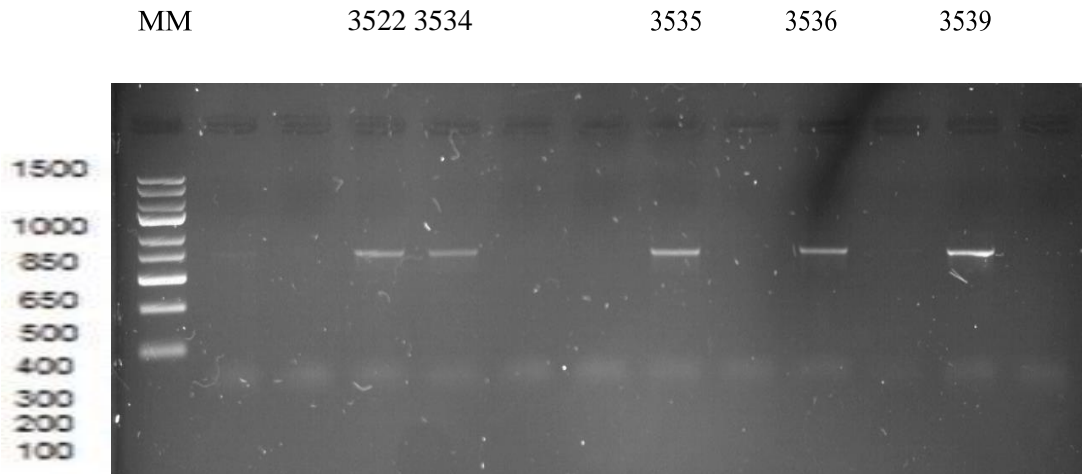


**Figura 6-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.papillosa*, *D.rezekiana*, *D.gastrophora*, *D.mendozae*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE

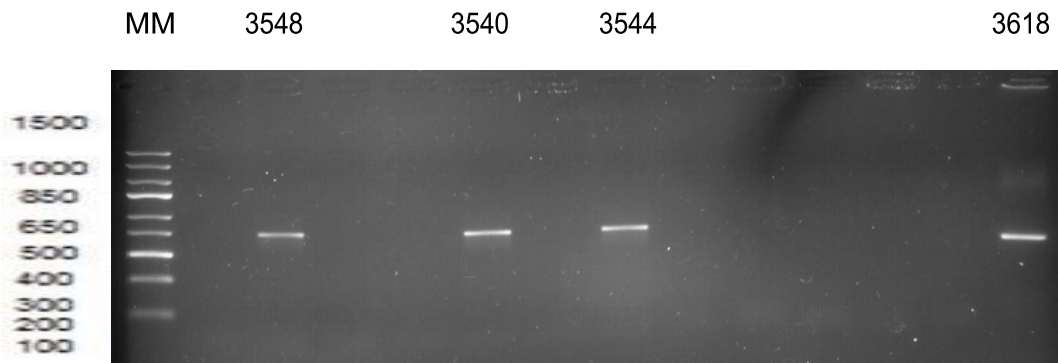


**Figura 7-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.pinasensis*, *D.woolwardiae*, *D.dodsonii*, *D.sibundoyensis*, *D.sijmii*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE

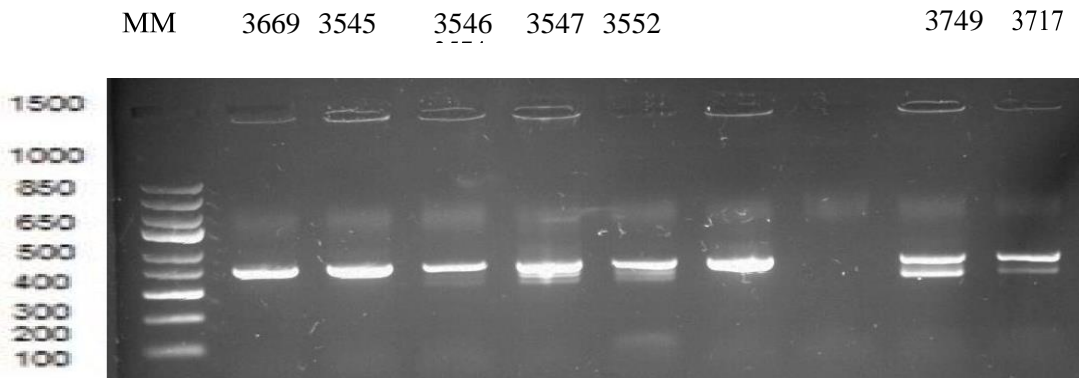


**Figura 8-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.lotax*, *D.kareniae*, *D.lindstroemii*, *D.trigonopetala*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

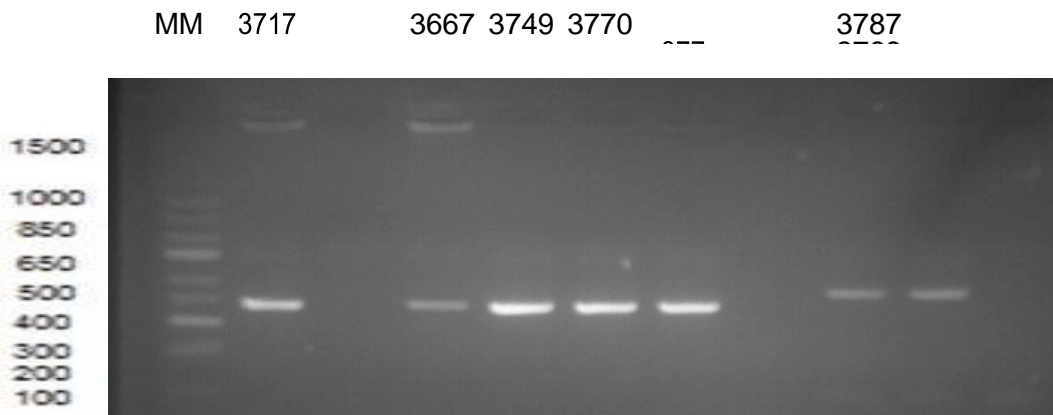
### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE



**Figura 9-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra, diluídas para la secuenciación y repetidas las muestras que tienen doble banda  
Carriles: *D.lafleurii*, *D.morleyi*, *D.hawleyi*, *D.venosa*, *D.chiroptera*, *D.deltoida*, *D.portillae*, *D.sibundoyensis*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

### GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE

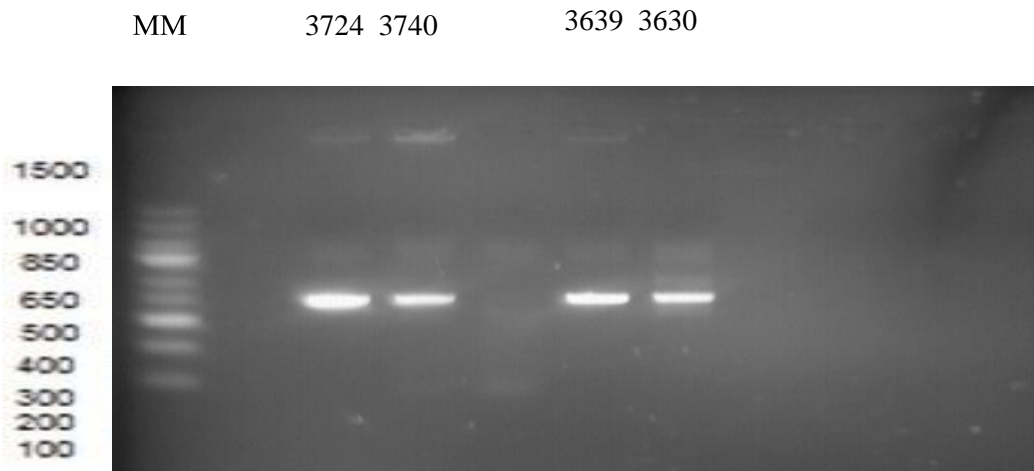


**Figura 10-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra

Carriles: *D.sibundoyensis*, *D.mopsus*, *D.portillae*, *D.iricolor*, *D.fafnir*, *D.mantissa*, *D.radiosa*

Fuente: (El Autor, 2018)

## GEL DE ELECTROFORESIS PRODUCTO PCR DE



**Figura 11-3** Productos de amplificación con el marcador ITS. Gel de agarosa al 1%. 4uL de muestra, estas muestras se diluyeron para la secuenciación

Carriles: *D.alcithoe*, *D.christineana*, *D.nigritella*, *D.polyphemus*

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

Para los productos de PCR mediante el servicio de Macrogen (Seoul-Korea) se realizó la purificación y secuenciación mediante el método Sanger, con la región ITS se enviaron 54 muestras y se obtuvo 52 secuencias de buena calidad, determinadas por el programa FinchTV al analizar los electroferogramas de ADN de cada una de las especies. Estas especies fueron analizadas con Genbank para verificar el porcentaje de compatibilidad con especies del mismo género y ver la similitud de las mismas con otras especies.

### 3.3.3 Secuenciación

Para los productos de PCR mediante el servicio de Macrogen (Seoul-Korea) se realizó la purificación y secuenciación mediante el método Sanger, con la región ITS1 se enviaron 54 muestras y se obtuvo 52 secuencias de buena calidad, determinadas por el programa FinchTV al analizar los electroferogramas de ADN de cada una de las especies. Estas especies fueron analizadas con Genbank para verificar el porcentaje de compatibilidad con especies del mismo género y ver la similitud de las mismas con otras especies, como lo indica la tabla siguiente.

**Tabla 3-3** Porcentaje de compatibilidad de especies del GENBANK

Gene	SUBJECT			SCORE		IDENTIDAD		
	LENGHT	START	END	BIT	RAW	MATCH	TOTAL	Pct. (%)
<i>Dracula sodiroi</i>	767	120	767	1146	620	640	649	99
<i>Dracula dodsonii</i>	771	121	769	1166	631	644	650	99
<i>Dracula tubeana</i>	767	127	767	1173	635	640	642	99
<i>Dracula simia</i>	762	122	755	1064	576	624	645	97
<i>Dracula erythrochaete</i>	771	123	769	1173	635	644	648	99
<i>Dracula vampira</i>	762	120	762	1160	628	639	644	99
<i>Dracula cordobae</i>	762	123	762	1166	631	638	641	99
<i>Dracula andreettae</i>	767	125	767	1166	631	640	644	99
<i>Dracula Polyphemus</i>	762	121	762	1155	625	639	645	99
<i>Dracula gigas</i>	767	125	767	1173	635	642	645	99
<i>Dracula rezekiana</i>	762	122	756	1133	613	632	640	99
<i>Dracula navarrorum</i>	664	41	662	1088	589	618	630	98
<i>Dracula fafnir</i>	764	121	762	1155	625	640	646	99
<i>Dracula fuligifera</i>	666	34	661	1035	560	619	644	96
<i>Dracula vesperilio</i>	762	124	762	1160	628	637	641	99
<i>Dracula radiosa</i>	760	132	557	462	250	369	427	86
<i>Dracula iricolor</i>	762	123	344	1166	631	638	641	99
<i>Dracula mopsus</i>	666	42	642	1083	586	597	602	99
<i>Dracula alcithoe</i>	664	41	662	1088	589	618	630	98
<i>Dracula lotax</i>	664	36	659	1107	599	620	629	99
<i>Dracula morleyi</i>	664	37	535	839	454	485	499	97
<i>Dracula dalstroemii</i>	668	51	660	957	518	581	612	95
<i>Dracula hitzii</i>	762	121	762	1175	636	641	643	99
<i>Dracula dalessandroi</i>	689	50	668	1011	503	638	611	98

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)



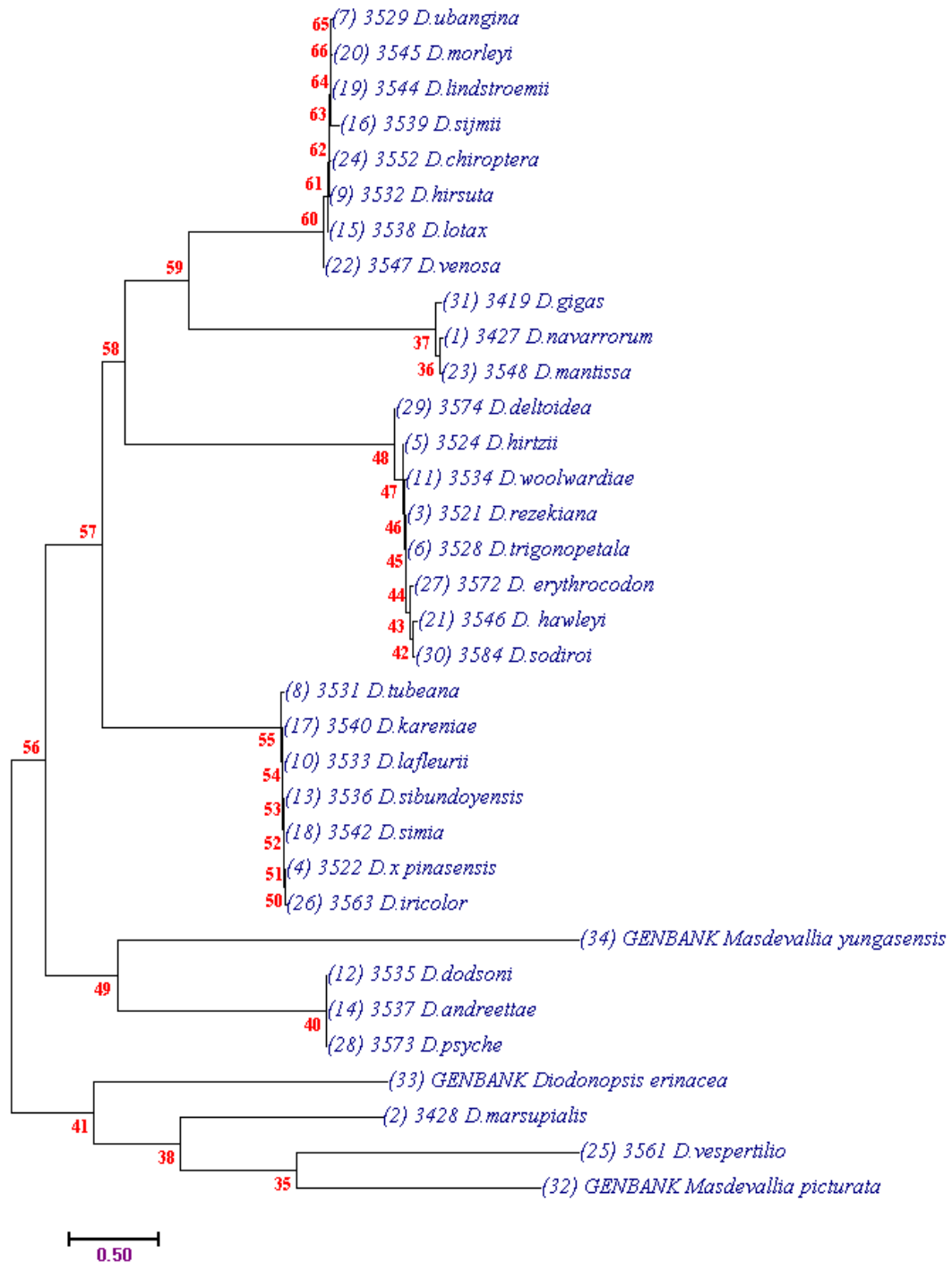
Al realizar la comparación de las muestras obtenidas con las secuencias del GenBank, se pudo determinar que en esta base de datos sólo existieron 24 especies del género *Dracula* para el marcador ITS con el cebador ITS1. No fue muy útil la comparación debido a que las secuencias obtenidas en este estudio son nuevas para esta base de datos, lo que en manera contribuye a la generación de información actualizada que debe ser guardada en estas bases de datos sobre nuevas especies descubiertas dentro del género *Dracula*, que aportan con información científica para futuras investigaciones.

### 3.3.4 Análisis Filogenético

Al generar el árbol filogenético de las muestras obtenidas se utilizó la herramienta Muscle y se empleó dos métodos para generar los cladogramas ver la Figura 19-3 este cladograma es de Relaciones evolutivas de los taxones, la historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de ramas internas, obteniendo un árbol no enraizado y aditivo, en el que las ramas que lo conforman indican el cambio evolutivo de las especies. Se muestra el árbol óptimo concatenado con secuencias matK (Iza, 2018) con la suma de la longitud de la rama =17.55603768. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 34 secuencias de nucleótidos de las dos regiones tomadas. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Las posiciones de los codones incluidas fueron 1st + 2nd + 3rd + Noncoding. Hubo un total de 280 posiciones en el conjunto de datos final. En dicho modelo la generación de secciones está presente dentro de todo el grupo, la presencia de 5 subdivisiones.

En este modelo las especies tomadas como out group como la que está dentro del clado 49 la cual es *Masdevallia yungasensis* se la relaciona con el subgrupo de la rama 40 compuesto por *D.dosoni*, *D.andreettae* y *D.psyche*, a la vez forman 2 subsecciones la rama 41 de la cual pertenece la especie tomada del Genbank *Diodonopsis erinacea* la cual se une en la rama 38 a *D.marsupialis* y *Masdevallia picturata*, con *D.vespertilio* estas especies se diferencian de las demás especies de *Dracula* al agruparse con las especies out group.

Árbol Filogenético Neighbor-Joining concatenado región matK-ITS del género *Dracula*



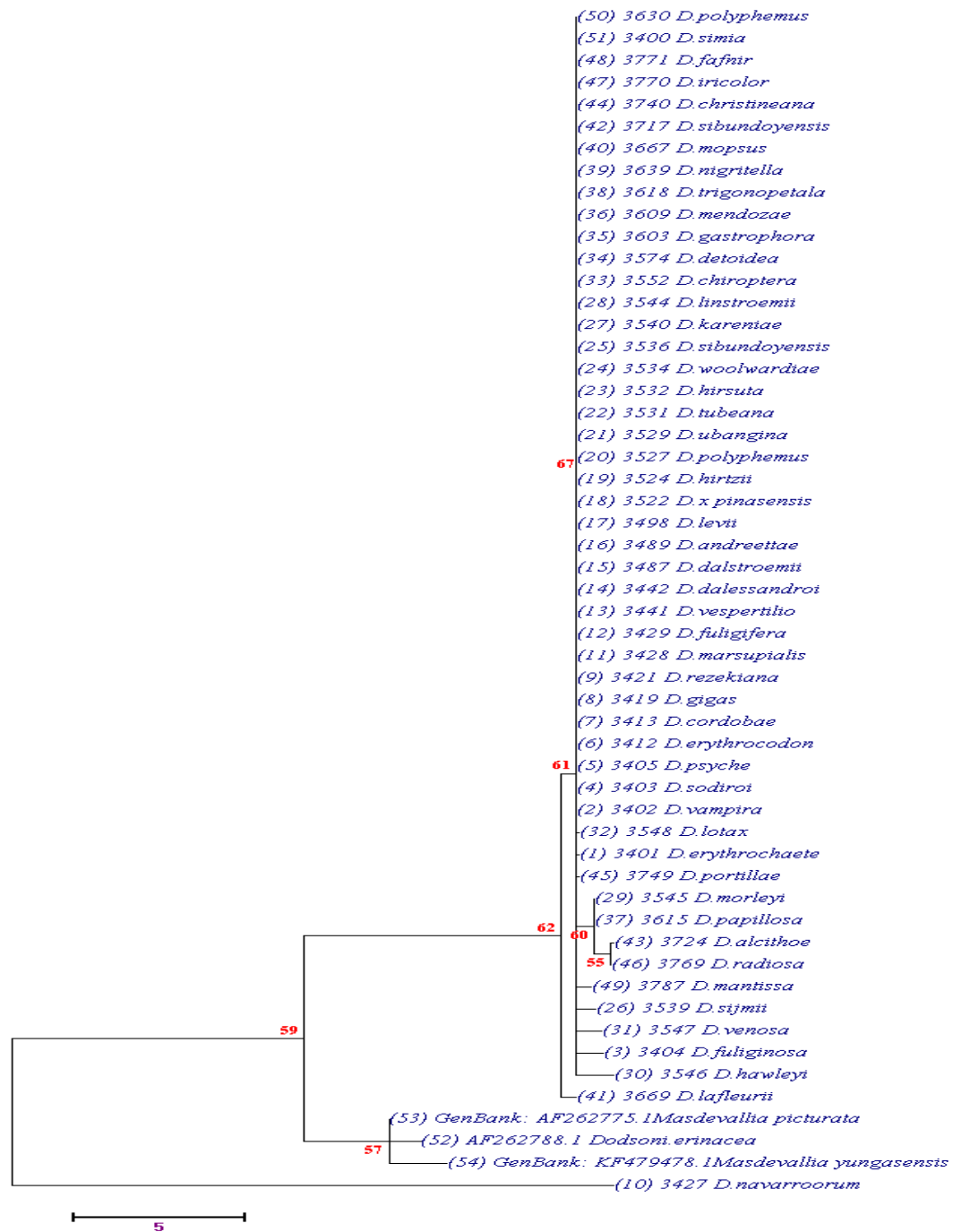
**Figura 12-3** Árbol Filogenético Neighbor-Joining de ITS-matK y bootstrap de 1000 réplicas con 5 secciones divididas dentro del género, el cual incluye a las especies out group, dentro de la sección 56 dentro del género

Fuente: Datos procesados con el software MEGA7 (Tamura et al., 2013).  
Realizado por: (Moreno Mariela, 2018)

El segundo modelo ver la Figura 20-3 La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo Tamura-Nei (Estimación del número de sustituciones de nucleótidos en la región de control del ADN mitocondrial). Se muestra el árbol con la mayor probabilidad de registro (-253.77). Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque Maximum Composite Likelihood (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud logaritmo superior. El árbol está dibujado a escala sólo con las especies amplificadas por el marcador ITS1, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 54 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 15 posiciones en el conjunto de datos final.

En este modelo todas las especies se unen a la rama 67 de la cual está unida a la rama 61 que conforma varias secciones en ella, la rama 59 aleja de todo el grupo de especies a *D.navarrorum* y agrupa a las especies tomadas como out group en una sola sección.

Árbol Filogenético Maximum Composite Likelihood región ITS del género *Dracula*



**Figura 13-3** Árbol filogenético Maximum Composite Likelihood de la región ITS mediante el método Tamura-Nei y bootstrap de 1000 réplicas, en el que no incluye a la especie *D. navarrorum* dentro del género.

Fuente: Datos procesados con el software MEGA7 (Tamura *et al.*, 2013).  
 Realizado por: (Moreno Mariela, 2018)

## **CONCLUSIONES:**

La presente investigación es la primera a nivel mundial que utiliza ITS como marcador nuclear en el género *Dracula*, al aplicar dicho marcador nuclear se obtuvo la amplificación positiva de las especies de orquídeas, efectuadas mediante la técnica de PCR convencional por electroforesis horizontal, lo cual nos indica que el marcador con el que se trabajó sirve para un análisis molecular del género de orquídeas estudiado.

La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de Sanger sirvió para la generación del árbol filogenético mediante el software libre MEGA 7, con el cual se realizó dos árboles, el uno con el método de Neighbor-Joining y el otro mediante el enfoque Maximum Composite Likelihood a los cuales se les añadió como out group a 2 especies de *Masdevallia* y a *Diodonopsis erinacea*, secuencias bajadas del GenBank.

La secuenciación de nuevas especies aporta valiosa información tanto para la base de datos GenBank que no contiene varias de estas especies, como para futuras investigaciones científicas en cuando a este género, que ayuden a resolver la confusión del mismo, comparando diferentes marcadores tanto cloroplasmáticos como nucleares. Los análisis obtenidos en esta investigación, nos dan una idea más clara de la generación de clados en este género, la separación de especies dentro de esta sección y la ausencia de híbridos.

## **RECOMENDACIONES:**

Aplicar otros marcadores moleculares tanto nucleares como cloroplásticos a estas especies para establecer una claridad y comparación de los árboles filogenéticos obtenidos con futuras investigaciones en cuanto a la formación de clados en sus ramas.

Es importante que los resultados obtenidos en cualquier tipo de investigación puedan ser publicados, como las secuencias obtenidas en este trabajo de titulación, las cuales son nuevas especies para el GenBank que servirán como base de futuras investigaciones científicas.

Se recomienda trabajar de manera conjunta con diferentes Instituciones en proyectos de investigación e información científica, más aún si interviene la flora y fauna de un país tan megadiverso como el Ecuador, en el que ambas partes trabajan por descubrir información relevante que ayude a la conservación de los ecosistemas.

Seguir con estudios moleculares dentro de este género de especies con un mayor número de muestras que no abarquen sólo a las orquídeas de Ecuador, con el fin de corroborar la eficiencia de los códigos de barra de ADN en la identificación de este género, que día a día incluye nuevas especies descubiertas en el mismo.

## BIBLIOGRAFÍA

**Aguilar, Sadoc Eliud.** Utilización de marcadores moleculares para definir la posición taxonómica en orquídeas. [En línea] Diciembre de 2003. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1960/1/IAD-2003-T001.pdf>.

**Ajú, María Magdalena.** Las orquídeas bases generales para su conocimiento y enseñanza [En línea] (tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Humanidades, Escuela de Estudios de Postgrado. Junio de 2009. Disponible en: [http://www.repositorio.usac.edu.gt/1621/1/07\\_2092.pdf](http://www.repositorio.usac.edu.gt/1621/1/07_2092.pdf).

**Baquero, Luis, et.al.** *ECUADOR – South America Orchidaceae: Epidendreae: Subtribe: Pleurothallinidae: Genus Dracula*. ResearchGate, n° 1 (2017) , 26 de Mayo de 2017, pp. 1-4.

**Benner, Marcelo.** *Plant Breeding: Mendelian to Molecular Approaches*. ResearchGate, (2004), pp. 2-5.

**Bremner, Nicolas y Chase, Mark.** *An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III*. 2009. 2, 2009, Botanical Journal of the Linnean Society, Vol. 161, pp. 105-121.

**Cáceres, Patricia.** EcuRed. *Orchidoideae*. [En línea] 1 de Julio de 2012. Disponible en: <https://www.ecured.cu/Orchidoideae>.

**Ceja, Jaqueline, et.al.** *Las plantas epífitas, su diversidad e importancia*. 2008. 91, 2008, Redalyc Sistema de Información Científica, Vol. I, pp. 35-41.

**Chase, Mark W.** *Classification of Orchidaceae in the Age of DNA data*. 2005. 1, 2005, Botanical Magazine, Vol. 22, pp. 2-7.

**Doyle, J. J y Doyle, J. L.** *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. 1987. 1987, Phytochemical Bulletin, Vol. Vol. 19, pp. 11-15.

**Dressler, Robert y Dodson, Calaway.** *Classification and phylogeny in the orchidaceae*. 31 de Marzo de 1960, Annals of the Missouri botanical garden , Vol. 47, pp. 25-68.

**Dressler, Robert.** *The Orchids Natural History and Classification*. 1981, pp. 57-60.

**Endara, Lorena, Grimaldi, David y Roy, Bitty.** *Lord of the Flies: Pollination of Dracula*

*orchids*. 2010. 1, Costa Rica : s.n., Abril de 2010, LANKESTERIANA, Vol. X, pp. 1-11.

**Garibyan, Lilit y Avashia, Nidhi.** *Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR)*. 2013. 2013, Journal of Investigative Dermatology, Vol. 133, pp. 1-4.

**Garrigues, Fran.** *Sanger: Estrategia de secuenciación de Primera Generación*. 2017. 12 de Mayo de 2017, Genética Médica.

**Geospiza, Inc.** FinchTV. [En línea] 2012. Disponible en: <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>.

**González, Dolores y Vovides, Andrew.** *Low Intralinear Divergence in Ceratozamia (Zamiaceae) Detected with Nuclear Ribosomal DNA ITS and Chloroplast DNA trnL-F Non-Coding Region*. 2002. Vol. 27. pp. 654-661.

**Gutiérrez, Diego, Navarrete, Grace y Espín, Clímaco.** *Orquídeas de la Amazonía Ecuatoriana: maravillas escondidas en las montañas Andino - Amazónicas*. 2014. Puyo : s.n., 01 de Junio de 2014, Socioambiental de la Amazonía Ecuatoriana, Vol. XI, pp. 27-30.

**Haelterman, David.** 2013. flick. *Dracula iricolor*. [En línea] 12 de Noviembre de 2013. Disponible en: <https://www.flickr.com/photos/58798926@N07/39677199661>.

**Innis, Michael, et.al.** *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Segunda. s.l. : ACADEMIC PRESS, INC., 2012.

**Iza, Mario.** Identificación Molecular de Especies de Orquídeas del género *Dracula*, mediante el Sistema Barcode. [En línea] (tesis). Universidad Politécnica Salesiana. Enero de 2018. [Citado el: 18 de Febrero de 2018.] Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15043/1/UPS-QT10784.pdf>.

**Koopowitz, Harold, Thornhill, Alan y Anderson, Mark.** *Species distribution profiles of the neotropical orchids Masdevallia and Dracula (Pleurothallidinae, Orchidaceae); implications for conservation*. 1993. 2, Diciembre de 1993, Biodiversity & Conservation, Vol. II, pp. 681-690.

**Leopardi Verde, L.** Estudio taxonómico preliminar de la familia Orchidaceae, en algunas localidades del Estado Sucre, Venezuela. [En línea] Abril de 2008. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/282575017\\_Estudio\\_taxonomico\\_preliminar\\_de\\_la\\_familia\\_Orchidaceae\\_en\\_algunas\\_localidades\\_del\\_Estado\\_Sucre\\_Venezuela](https://www.researchgate.net/publication/282575017_Estudio_taxonomico_preliminar_de_la_familia_Orchidaceae_en_algunas_localidades_del_Estado_Sucre_Venezuela).



**Luer, C.** *Icones Pleurothallidarum X Systematics of Dracula: (Orchidaceae)*. s.l. : Missouri Botanical Garden, 1993.

**Massensini, Antonio.** 2013. Filogenia molecular de *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae) com ênfase nas espécies rupícolas do gênero e variabilidade genética do complexo *Acianthera prolifera* Lindl. [En línea] Mayo de 2013. Disponible en: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-9MWGQU/dissertacao\\_antonio\\_massensini\\_junior.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-9MWGQU/dissertacao_antonio_massensini_junior.pdf?sequence=1).

**Magdeldin, Sameh.** *Gel Electrophoresis*. 2012. 04 de Abril de 2012, IntechOpen.

**Meyer, Gary y Cameron, Ken.** *A Preliminary Phylogenetic Study Of Dracula (Pleurothalidinae, Epidendroideae, Orchidaceae) Based On Plastid matK Sequence Data*. 2009. 2009, proceedings of the second scientific conference on andean orchids, Vol. II, pp. 100-114.

**McKendrick, Sheena.** Manual para la germinacion in vitro de orquideas. [En línea] 21 de Marzo de 2000. Disponible en: [https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion\\_orquideas.pdf](https://blog.solusan.com/wp-content/uploads/2007/05/germinacion_orquideas.pdf).

**Ministerio de Turismo.** Ministerio de Turismo. *Ecuador declarado “País de las Orquideas”*. [En línea] 31 de Octubre de 2013. Disponible en: <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-declarado-pais-de-las-orquideas/>.

**Policha, Tobias, et.al.** *Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking Dracula orchids using realistic three-dimensional printed flowers*. 210, 2016, New Phytologist, pp. 1058-1071.

**Przeslawski, J.** *Mark Chase and the Molecular Systematics Story*. 1995. 1995, Botanical Journal of the Linnean Society, Vol. II, pp. 35-40.

**Poczai, Peter y Hyvönen, Jaakko.** *Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects*. 2010. 4, 2010, Molecular Biology Reports, Vol. 37, pp. 1897-1912.

**Pupulin, Franco, Gilberto, Merino y Medina, Hugo.** *DRACULAS del Ecuador*. [En línea]. 2009. [Consulta: 18 abril 2017].

**Rodríguez, Gemma.** Estudio del ADN. [En línea] 2014. Disponible en: <http://www2.iib.uam.es/seq/tecnicas/biomed1.htm>.

**Rosas, Juan Carlos.** Manual del Módulo de Biodiversidad y Fitomejoramiento. [En línea] Mayo de 2001. Disponible en: <https://www.zamorano.edu/biblioteca/?p=65>.

**Tamura, et.** Molecular Evolutionary Genetics Analysis. *MEGA 7*. [En línea] 2013. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/>.

**Tamura, Koichiro, Glen, Stecher y Kumar, Sudhir.** MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. [En línea] 2016. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/pdfs/KumarStecher16.pdf>.

**Tropicos.org.** Tropicos. [En línea] 2018. [Consulta: 14 abril 2017]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/>.

**Westermeier, R.** *Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. 1997. 2, 1997, Molecular Nutrition Food Research, Vol. XVII, pp. 331.

## ANEXOS

### ANEXO A Resultados de la extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Código	Nombre científico	Extracción	Amplificación	Secuenciación
3400	<i>Dracula simia</i>	SI	+	+
3401	<i>Dracula erythrochaete</i>	SI	+	+
3402	<i>Dracula vampira</i>	SI	+	+
3403	<i>Dracula sodiroi</i>	SI	+	+
3404	<i>Dracula fuliginosa</i>	SI	+	+
3405	<i>Dracula psyche (pisiche)</i>	SI	+	+
3410	<i>Dracula felix</i>	SI	+	-
3412	<i>Dracula erythrocodon</i>	SI	+	+
3413	<i>Dracula cordobae</i>	SI	+	+
3419	<i>Dracula gigas</i>	SI	+	+
3421	<i>Dracula rezeckiana</i>	SI	+	+
3427	<i>Dracula navarrorum</i>	SI	+	+
3428	<i>Dracula marsupialis</i>	SI	+	+
3429	<i>Dracula fuligifera</i>	SI	+	+
3441	<i>Dracula vespertilio</i>	SI	+	+
3442	<i>Dracula dalessandroi</i>	SI	+	+
3485	<i>Dracula terborchii</i>	SI	+	-
3487	<i>Dracula dalstroemii</i>	SI	+	+
3489	<i>Dracula andreettae</i>	SI	+	+
3498	<i>Dracula levii</i>	SI	+	+
3524	<i>Dracula hirtzii</i>	SI	+	+
3527	<i>Dracula polyphemus</i>	SI	+	+
3529	<i>Dracula ubangina</i>	SI	+	+
3531	<i>Dracula tubeana</i>	SI	+	+
3532	<i>Dracula hirsuta</i>	SI	+	+
3669	<i>Dracula lafleurii</i>	SI	+	+
3534	<i>Dracula woolwardiae</i>	SI	+	+
3535	<i>Dracula dodsonii</i>	SI	+	+
3536	<i>Dracula sibundoyensis</i>	SI	+	+
3548	<i>Dracula lotax</i>	SI	+	+

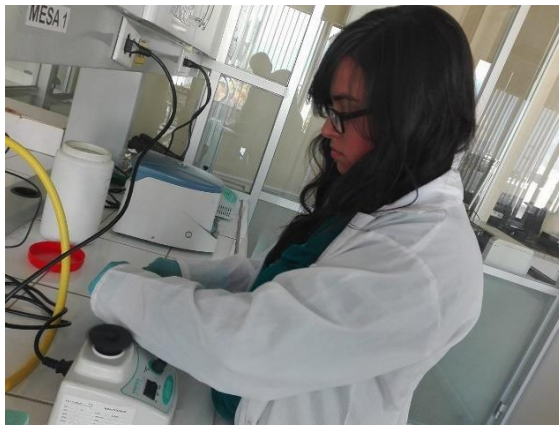
3539	<i>Dracula sijmii</i>	SI	+	+
3540	<i>Dracula Kareniae</i>	SI	+	+
3544	<i>Dracula lindstroemii</i>	SI	+	+
3545	<i>Dracula morleyi</i>	SI	+	+
3546	<i>Dracula hawleyi</i>	SI	+	+
3547	<i>Dracula venosa</i>	SI	+	+
3787	<i>Dracula mantissa</i>	SI	+	+
3552	<i>Dracula chiroptera</i>	SI	+	+
3574	<i>Dracula deltoidea</i>	SI	+	+
3615	<i>Dracula papillosa</i>	SI	+	+
3667	<i>Dracula mopsus</i>	SI	+	+
3724	<i>Dracula alcithoe</i>	SI	+	+
3740	<i>Dracula christineana</i>	SI	+	+
3771	<i>Dracula fafnir</i>	SI	+	+
3609	<i>Dracula mendozae</i>	SI	+	+
3769	<i>Dracula radiosa</i>	SI	+	+
3639	<i>Dracula nigrifella</i>	SI	+	+
3618	<i>Dracula trigonopetala</i>	SI	+	+
3770	<i>Dracula iricolor</i>	SI	+	+
3603	<i>Dracula gastrophora</i>	SI	+	+
3522	<i>Dracula x pinasensis</i>	SI	+	+
3717	<i>Dracula sibundoyensis</i>	SI	+	+
3630	<i>Dracula polyphemus</i>	SI	+	+
3749	<i>Dracula portillae</i>	SI	+	+
3531	<i>Dracula tubeana</i>	SI	+	-

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

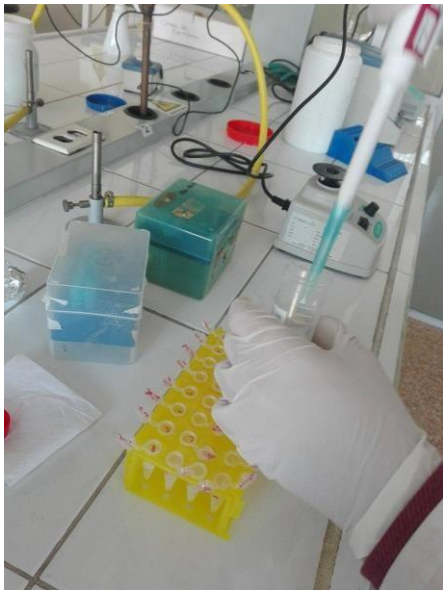
## ANEXO B Proceso de Extracción de ADN



Muestras extraídas de AND  
etiquetadas y guardadas



Mezcla de los componentes  
mediante vortex



Colocación de 600 uL de  
Fenol- Cloroformo (1:1) en  
los tubos etiquetados.

ANEXO C Equipos utilizados en el proyecto



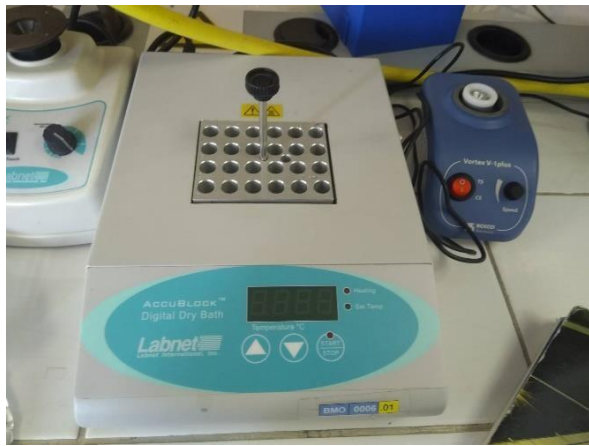
Centrifuga Normal labnet



Centrifuga de tubos PCR



Termociclador labnet modelo multigene



Termo bloque para Baño  
María labnet



Cámara de Flujo Laminar



Cámara de Electroforesis  
horizontal labnet modelo gel  
XL



Computadora y  
Fotodocumentador microbis  
modelo bio-imaging  
systems



Refrigeradora TEMPLOW



**ANEXO D** Condiciones de temperatura en el termociclador.

ETAPAS	TEMPERATURA(C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	1min	1
Desnaturalización	94	30s	30
Hibridación	53	40s	30
Elongación	72	40s	30
Elongación final	72	5min	1

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)

**ANEXO E** Especies recolectadas

Número de Especie	Código	Nombre Científico	Lugar donde se recolectó	Ciudad o provincia
1	3400	<i>Dracula simia</i>	Orquideario Sarina de	Quito
2	3401	<i>Dracula erythrochaete</i>	Orquideario Sarina de	Quito
3	3402	<i>Dracula vampira</i>	Orquideario Sarina de	Quito
4	3403	<i>Dracula sodiroi</i>	Orquideario Sarina de	Quito
5	3404	<i>Dracula fuligifera</i>	Orquideario Sarina de	Quito
6	3405	<i>Dracula psyche</i>	Orquideario Sarina de	Quito
7	3406	<i>Dracula saulli</i>	Orquideario Sarina de	Quito
8	3407	<i>Dracula benedicti</i>	Orquideario Sarina de	Quito
9	3408	<i>Dracula gigas</i> (rosada)	Orquideario Sarina de	Quito
10	3410	<i>Dracula felix</i>	Orquideario Sarina de	Quito
11	3412	<i>Dracula erythrocodon</i>	Orquideario Sarina de	Quito
12	3413	<i>Dracula cordobae</i>	Orquideario Sarina de	Quito
13	3414	<i>Dracula sp</i>	Orquideario Sarina de	Quito
14	3415	<i>Dracula diana</i>	Orquideario Sarina de	Quito
15	3416	<i>Dracula wallisi</i>	Orquideario Sarina de	Quito
16	3417	<i>Dracula chimaera</i>	Orquideario Sarina de	Quito
17	3418	<i>Dracula diana</i> (Blanca)	Orquideario Sarina de	Quito
18	3419	<i>Dracula gigas</i>	Orquideario Sarina de	Quito
19	3421	<i>Dracula rezekiana</i>	Orquideario Sarina de	Quito
20	3422	<i>Dracula subotae</i>	Orquideario Sarina de	Quito
21	3423	<i>Dracula platycrater</i>	Orquideario de	Quito

			Sarina	
22	3424	<i>Dracula wordakii</i>	Orquideario de Sarina	Quito
23	3427	<i>Dracula navarrorum</i>	Orquideario de Sarina	Quito
24	3428	<i>Dracula marsupialis</i>	Orquideario de Sarina	Quito
25	3429	<i>Dracula fuligifera</i>	Orquideario de Sarina	Quito
26	3430	<i>Dracula houtteana</i>	Orquideario de Sarina	Quito
27	3431	<i>Dracula gorgona</i>	Orquideario de Sarina	Quito
28	3441	<i>Dracula vespertilio</i>	Orquideario de Sarina	Quito
29	3480	<i>Dracula vampira</i>	Cantón Huaca	Carchi
30	3481	<i>Dracula gigas</i>	Cantón Huaca	Carchi
31	3482	<i>Dracula andreetae</i>	Cantón Huaca	Carchi
32	3483	<i>Dracula chimaera</i>	Cantón Huaca	Carchi
33	3484	<i>Dracula marsupialis</i>	Cantón Huaca	Carchi
34	3485	<i>Dracula terborchii</i>	Cantón Huaca	Carchi
35	3487	<i>Dracula dalstroemii</i>	Cantón Huaca	Carchi
36	3488	<i>Dracula iricolor</i>	Cantón Huaca	Carchi
37	3489	<i>Dracula andreetae</i>	Cantón Huaca	Carchi
38	3490	<i>Dracula dalstroemii</i>	Cantón Huaca	Carchi
39	3520	<i>Dracula marinii</i>	Alberto Guerrero	Quito
40	3521	<i>Dracula rezekiana</i>	Alberto Guerrero	Quito
41	3522	<i>Dracula pinasesis</i>	Alberto Guerrero	Quito
42	3523	<i>Dracula hirtzii</i>	Alberto Guerrero	Quito
43	3524	<i>Dracula hirtzii</i>	Alberto Guerrero	Quito
44	3525	<i>Dracula terborchii</i>	Alberto Guerrero	Quito
45	3526	<i>Dracula gastrophora</i>	Alberto Guerrero	Quito
46	3527	<i>Dracula polyphemus</i>	Alberto Guerrero	Quito
47	3528	<i>Dracula trigonopetala</i>	Alberto Guerrero	Quito
48	3529	<i>Dracula ubangina</i>	Alberto Guerrero	Quito
49	3530	<i>Dracula trigonopetala</i>	Alberto Guerrero	Quito
50	3531	<i>Dracula tubeana</i>	Alberto Guerrero	Quito
51	3532	<i>Dracula hirsuta</i>	Alberto Guerrero	Quito
52	3533	<i>Dracula lafleurii</i>	Alberto Guerrero	Quito
53	3534	<i>Dracula woolwardiae</i>	Alberto Guerrero	Quito
54	3535	<i>Dracula dodsonii</i>	Alberto Guerrero	Quito
55	3536	<i>Dracula sibundoyensis</i>	Alberto Guerrero	Quito
56	3536	<i>Dracula andreetae x</i>	Alberto Guerrero	Quito
57	3537	<i>Dracula lotax</i>	Alberto Guerrero	Quito
58	3538	<i>Dracula x sijmii</i>	Alberto Guerrero	Quito
59	3539	<i>Dracula sijmii</i>	Alberto Guerrero	Quito
60	3540	<i>Dracula x kareniae</i>	Alberto Guerrero	Quito
61	3541	<i>Dracula sp2</i>	Alberto Guerrero	Quito
62	3542	<i>Dracula simia</i>	Alberto Guerrero	Quito
63	3543	<i>Dracula polyphemus</i>	Alberto Guerrero	Quito
64	3544	<i>Dracula levii</i>	Alberto Guerrero	Quito
65	3545	<i>Dracula morleyi</i>	Alberto Guerrero	Quito
66	3546	<i>Dracula x hawleyi</i>	Alberto Guerrero	Quito
67	3547	<i>Dracula venosa</i>	Alberto Guerrero	Quito
68	3548	<i>Dracula mantissa</i>	Alberto Guerrero	Quito
69	3549	<i>Dracula marsupialis</i>	Alberto Guerrero	Quito
70	3550	<i>Dracula x felix</i>	Alberto Guerrero	Quito
71	3551	<i>Dracula marsupialis</i>	Alberto Guerrero	Quito
72	3552	<i>Dracula chiroptera</i>	Alberto Guerrero	Quito
73	3553	<i>Dracula sp3</i>	Alberto Guerrero	Quito
74	3554	<i>Dracula levii</i>	Alberto Guerrero	Quito
75	3555	<i>Dracula marsupialis</i>	Alberto Guerrero	Quito
76	3563	<i>Dracula iricolor</i>	Jardín Botánico	Quito
77	3564	<i>Dracula mopsus</i>	Jardín Botánico	Quito

78	<b>3565</b>	<i>Dracula vampra</i>	Jardín Botánico	Quito
79	<b>3566</b>	<i>Dracula venosa</i>	Jardín Botánico	Quito
80	<b>3567</b>	<i>Dracula chimaera</i>	Jardín Botánico	Quito
81	<b>3568</b>	<i>Dracula erythrochaete</i>	Jardín Botánico	Quito
82	<b>3569</b>	<i>Dracula lafleurii</i>	Jardín Botánico	Quito
83	<b>3570</b>	<i>Dracula radiella</i>	Jardín Botánico	Quito
84	<b>3571</b>	<i>Dracula tubeana</i>	Jardín Botánico	Quito
85	<b>3572</b>	<i>Dracula eytrocodon</i>	Jardín Botánico	Quito
86	<b>3573</b>	<i>Dracula psyche</i>	Jardín Botánico	Quito
87	<b>3574</b>	<i>Dracula deltoidea</i>	Jardín Botánico	Quito
88	<b>3575</b>	<i>Dracula hirsuta</i>	Jardín Botánico	Quito
89	<b>3576</b>	<i>Dracula lotax</i>	Jardín Botánico	Quito
90	<b>3577</b>	<i>Dracula vespertilio</i>	Jardín Botánico	Quito
91	<b>3578</b>	<i>Dracula hirsuta</i>	Jardín Botánico	Quito
92	<b>3615</b>	<i>Dracula papillosa</i>	Jardín Botánico	Quito
93	<b>3616</b>	<i>Dracula hirtzii</i>	Jardín Botánico	Quito
94	<b>3617</b>	<i>Dracula papillosa</i>	Jardín Botánico	Quito
95	<b>3619</b>	<i>Dracula gigas</i>	Jardín Botánico	Quito
96	<b>3623</b>	<i>Dracula mendozae</i>	Jardín Botánico	Quito
97	<b>3624</b>	<i>Dracula hirsuta</i>	Jardín Botánico	Quito
98	<b>3618</b>	<i>Dracula trigonopetala</i>	Jardín Botánico	Quito
99	<b>3609</b>	<i>Dracula mendozae</i>	Jardín Botánico	Quito
100	<b>3603</b>	<i>Dracula gastrophora</i>	Jardín Botánico	Quito
101	<b>3630</b>	<i>Dracula polyphemus</i>	Cantón Huaca	Carchi
102	<b>3669</b>	<i>Dracula lafleurii</i>	Cantón Huaca	Carchi
103	<b>3667</b>	<i>Dracula mopsus</i>	Cantón Huaca	Carchi
104	<b>3787</b>	<i>Dracula mantissa</i>	Cantón Huaca	Carchi
105	<b>3724</b>	<i>Dracula alcithoe</i>	Cantón Huaca	Carchi
106	<b>3740</b>	<i>Dracula christineana</i>	Cantón Huaca	Carchi
107	<b>3769</b>	<i>Dracula radiosa</i>	Cantón Huaca	Carchi
108	<b>3770</b>	<i>Dracula iricolor</i>	Cantón Huaca	Carchi

Fuente: (Moreno Mariela, 2018)