

Estandarización de Marcadores Moleculares Microsatélites en Muestras de *Vaccinium  
Floribundum* del Páramo de Santurbán

Daniela Johanna Mojica Candela

Trabajo de Grado para optar el título de Bióloga

Director

Luz Nayibe Garzón Gutiérrez  
Doctora en Ciencias Agropecuarias

Codirector

Fernando Rondón González  
Doctor en Ciencias Biología

Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Bucaramanga  
2019

## Tabla de Contenido

	Pág.
<b>Introducción .....</b>	<b>9</b>
<b>1. Objetivos .....</b>	<b>11</b>
1.1 Objetivo General.....	11
1.2 Objetivos Específicos .....	11
<b>2. Marco Referencial .....</b>	<b>11</b>
2.1 Generalidades de la Especie .....	12
2.2 Breve Revisión Sobre Marcadores Moleculares.....	14
2.2.1 Marcadores Moleculares .....	14
2.2.2 SSRs .....	14
2.3 Estudios en <i>Vaccinium</i> .....	15
2.4 Extracción ADN Total .....	16
2.5 PCR.....	17
2.6 Electroforesis .....	17
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>18</b>
3.1 Distribución de Poblaciones Naturales de <i>V. floribundum</i> .....	18
3.2 Recolecta.....	19
3.3 Protocolo de Extracción de ADN Total para la Especie <i>V. floribundum</i> .....	19
3.4 Condiciones de Amplificación para Marcadores Microsatélite en <i>V. floribundum</i> .....	22
<b>4. Resultados .....</b>	<b>24</b>
4.1 Distribución de Poblaciones Naturales de <i>V. floribundum</i> .....	24
4.2 Protocolo de Extracción de ADN para la Especie <i>V. floribundum</i> .....	27
4.3 Condiciones de Amplificación para Marcadores Microsatélite en <i>V. floribundum</i> .....	32
4.3.1 Visualización de Productos de PCR.....	35
4.3.2 Protocolo Estandarizado de Condiciones de Amplificación por PCR. ....	35
4.4 Evaluación de Marcadores SSR Estandarizados .....	36
<b>5. Discusión .....</b>	<b>40</b>
5.1 Distribución de <i>V. floribundum</i> .....	40
5.2 Extracción ADN Total .....	41
5.3 Estandarización de Marcadores-Transferibilidad .....	44
5.4 Estandarización de la PCR.....	44
5.5 Evaluación de Marcadores SSR Estandarizados .....	46
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>49</b>
<b>7. Recomendaciones .....</b>	<b>49</b>
<b>Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>50</b>

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Arbusto de agraz en el Páramo de Santurbán. ....	13
<b>Figura 2.</b> Planta de agraz con frutos. ....	13
<b>Figura 3.</b> Sitios de colecta en el municipio de California. ....	25
<b>Figura 4.</b> Sitios de colecta en los municipios de Charta y Vetas. ....	26
<b>Figura 5.</b> Sitios de colecta en el municipio de Suratá. ....	26
<b>Figura 6.</b> Sitios de colecta en los municipios de Tona y Piedecuesta. ....	27
<b>Figura 7.</b> ADN de <i>V. floribundum</i> extraído cuando se modificó peso inicial en mini prep..	29
<b>Figura 8.</b> ADN de <i>V. floribundum</i> extraído cuando se modificó el peso inicial. ....	29
<b>Figura 9.</b> ADN de <i>V. floribundum</i> extraído cuando se modificó la relación peso/volumen. ....	30
<b>Figura 10.</b> ADN de <i>V. floribundum</i> extraído con el protocolo estandarizado en el presente trabajo. ....	30
<b>Figura 11.</b> Producto amplificado del SSR VCC_S10. ....	34
<b>Figura 12.</b> Producto amplificado SSR NA398. ....	35
<b>Figura 13.</b> Lectura de productos de PCR del marcador NA1040. ....	37

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Marcadores microsatélites seleccionados. ....	22
<b>Tabla 2.</b> Ubicación y rango altitudinal en el que se encontró <i>V. floribundum</i> en cada municipio muestreado. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Modificaciones Realizadas al protocolo descrito por Doyle y Doyle(1991) .....	28
<b>Tabla 4.</b> Mediciones de calidad y concentración de ADN obtenido con el protocolo estandarizado.....	30
<b>Tabla 5.</b> Temperatura de hibridación de marcadores estandarizados. ....	32
<b>Tabla 6.</b> Amplificación (%) de marcadores SSR estandarizados en 15 muestras de <i>V. floribundum</i> .....	38
<b>Tabla 7.</b> Número de alelos y rango de productos de PCR de marcadores estandarizados.....	39
<b>Tabla 8.</b> Parámetros poblacionales evaluados con el software MolKin V.3 (Gutiérrez, 2005).. ..	39

## Resumen en Español

**TÍTULO:** ESTANDARIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES EN MUESTRAS DE *VACCINIUM FLORIBUNDUM* DEL PÁRAMO DE SANTURBÁN\*

**AUTOR:** DANIELA JOHANNA MOJICA CANDELA\*\*

**PALABRAS CLAVES:** SSR, EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y HETERÓLOGOS.

### DESCRIPCIÓN:

*Vaccinium floribundum* Kunth (1819), comúnmente conocido como agraz, mortiño, arándano o blueberry andino, es considerada una especie promisorio por sus características organolépticas, propiedades nutricionales y alto contenido de antioxidantes presentes en el fruto. Las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo se encuentran en las regiones de páramo y subpáramo. En Colombia, su cultivo comercial se limita a Antioquia y Boyacá, aunque en algunos departamentos como Santander se realiza la cosecha y comercialización del fruto silvestre presentes en zonas de páramo y subpáramo. De manera general, en el país no se han realizado estudios que permitan establecer la diversidad genética de las poblaciones naturales a partir de marcadores moleculares, siendo esta información importante para definir la estructura poblacional y crear planes de uso, manejo y conservación adecuados. Razón por la cual, se estableció como objetivo estandarizar las condiciones de amplificación de marcadores moleculares tipo microsatélite (Simple Sequence Repeats) heterólogos en la especie *V. floribundum*. Los resultados indican que esta especie de arándano es de amplia distribución en el Páramo de Santurbán. A partir del protocolo modificado por Doyle y Doyle (1991) se obtuvo ADN con calidad suficiente para realizar PCR. Se estandarizaron las condiciones para amplificar siete microsatélites heterólogos en *V. floribundum*, los cuales en general son polimórficos y permitirían detectar diversidad genética en sus poblaciones. Este conocimiento será base para futuros proyectos que permitan determinar la diversidad y estructura de las poblaciones naturales a partir de marcadores moleculares, información necesaria para generar los planes de manejo, uso y conservación de esta especie.

---

\*Trabajo de grado.

\*\*Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez.

## Resumen en Ingles

**TITLE:** STANDARDIZATION OF HETEROLOGOUS MICROSATELLITE MARKERS IN SAMPLES OF *VACCINIUM FLORIBUNDUM* FROM PÁRAMO OF SANTURBÁN\*

**AUTHOR:** DANIELA JOHANNA MOJICA CANDELA\*\*

**KEYWORDS:** SSR, DNA EXTRACTION, PCR AND HETEROLOGOUS.

### DESCRIPTION:

*Vaccinium floribundum* Kunth (1819), commonly known as agraz, mortiño, blueberry or Andean blueberry, is considered a promising species for its organoleptic characteristics, nutritional properties and high content of antioxidants present in the fruit. The optimum conditions for its growth and development are found in the Paramo and Sub paramo regions. In Colombia, its commercial cultivation is limited to Antioquia and Boyacá, although in some departments, such as Santander, the harvest and commercialization of the wild fruit present in Paramo and Sub paramo zones are carried out. No studies have been carried out in the country to establish the genetic diversity of natural populations from molecular markers, this information being important for defining the population structure and creating plans for appropriate use, management and conservation. For this reason, the objective was to standardize the amplification conditions of microsatellite-type molecular markers (Simple Sequence Repeats) in the species *V. floribundum*. The results indicate that this species of blueberry is widely distributed in the Paramo of Santurbán. Based on the protocol modified by Doyle and Doyle (1991), DNA with enough quality was obtained to carry out PCR. The conditions were standardized to amplify seven heterologous microsatellites in *V. floribundum*, which are generally polymorphic and would allow the detection of genetic diversity in their populations. This knowledge will be the basis for future projects that allow the determination of the diversity and structure of natural populations based on molecular markers, information needed to generate management plans, use and conservation of this species.

---

\*Bachelor thesis

\*\*Faculty of Sciences. School of Biology. Director Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

## Introducción

El agraz (*Vaccinium floribundum*, Kunth) es un arbusto muy ramificado con hojas alternas coriáceas, fruto globoso morado en la madurez. Se distribuye en el norte de los Andes, crece en el límite del bosque alto andino hasta páramo medio, se desarrolla principalmente en suelos ácidos y porosos con bajo contenido de nutrientes en un rango altitudinal de 2400 - 3900 m s. n. m. (Cardozo *et al.*, 2009; Granados, 2012). En Colombia se encuentran dos especies, *V. floribundum* y *V. meridionale* (Luteyn, 2002), en los sistemas de páramos de las tres cordilleras (Corantioquia, 2009), aunque sus poblaciones naturales se ven gravemente afectadas por procesos antropogénicos y por la expansión de la frontera agrícola que ocurre en los páramos Andinos (Buytaert *et al.*, 2006).

El agraz es considerada una especie promisoría porque es nativa de la región, no ha sido domesticada extensivamente, es subutilizada y poco conocida y cuenta con potencial económico (Corantioquia, 2009). Sus frutos son comercializados en mercados locales e internacionales ya que presentan propiedades nutraceuticas debido a su composición química. Además, contiene una cantidad importante de compuestos polifenólicos que tienen la propiedad de ser colorantes y presentar un efecto antioxidante (Torres *et al.*, 2009; Coba *et al.*, 2012).

A pesar de que existen estudios relacionados con el estado de conservación de las poblaciones naturales en arándanos de Colombia (Corantioquia, 2009; Granados, 2012) éstos se basan en caracteres morfológicos. En el país no se han realizado estudios que permitan establecer la diversidad genética de las poblaciones naturales de agraz a partir del uso de marcadores moleculares, siendo esta información importante para definir la estructura poblacional y crear planes de uso, manejo y conservación adecuados.

Por esto, en el presente informe final de trabajo de grado se reportan las condiciones de extracción de ADN y amplificación de marcadores microsatélite heterólogos, información base para desarrollar futuros estudios enfocados en la estimación de diversidad genética que permita elaborar planes de manejo y conservación de esta especie promisoría.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Estandarizar las condiciones de amplificación de marcadores moleculares tipo microsatélite heterólogos en la especie *V. floribundum*.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Determinar la distribución de *V. floribundum* en algunas localidades de California, Charta, Piedecuesta, Santa Bárbara, Suratá, Tona y Vetas.
- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN para la especie *V. floribundum*.
- Establecer las condiciones de amplificación para marcadores moleculares tipo microsatélite en *V. floribundum*.

## 2. Marco Referencial

En esta sección se detallan características asociadas a la taxonomía, distribución, morfología, reproducción, entre otros aspectos generales de la especie de estudio. Se ponen en contexto los protocolos de extracción de ADN más utilizados en plantas. Y finalmente, se abordan los marcadores moleculares tipo microsatélite, sintetizando los estudios más relevantes realizados en este género.

## 2.1 Generalidades de la Especie

El agraz (conocido también como arándano, mortiño y vichacha) pertenece al orden Ericalean y la familia Ericaceae, la subfamilia Vaccinioideae, el género *Vaccinium* y la sección *Cyanococcus*. Ericaceae es la familia con mayor extensión geográfica, se distribuye en las regiones tropicales y templadas de todos los continentes, presentando una amplia diversidad en el Neotrópico. La subfamilia Vaccinioideae tiene más de 1200 especies y *Vaccinium* es el género más diverso, con unas 500 especies (Luteyn, 2002; Pedraza-Penalosa, 2015).

*V. floribundum* es un arbusto que crece hasta tres metros de altura, usualmente es muy ramificado y sus hojas son simples, alternas, espiraladas, con borde aserrado, presenta flores agrupadas en inflorescencias racimosas apicales o terminales, las flores son perfectas y completas, el pedicelo es glabro, el cáliz es gamosépalo y la corola es gamopétala urceolada (Luteyn, 1991). Los frutos son bayas globosas y carnosas que al madurar presentan un color desde morado oscuro hasta negro y usualmente contienen de 45 a 60 semillas (**Figura 1** y **Figura 2**) (Corantioquia, 2009; Granados, 2012).



Figura 1. Arbusto de agraz en el Páramo de Santurbán.



Figura 2. Planta de agraz con frutos.

Dentro de las especies reconocidas como agraz en Colombia se encuentran *V. meridionale* y *V. floribundum* (Luteyn, 1991; Rangel-Ch, 2000). De acuerdo con los reportes hechos por el *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) y datos del herbario de la Universidad

Industrial de Santander (HUIS), estas especies se ubican en el área de páramos de Colombia incluido el Páramo de Santurbán.

## 2.2 Breve Revisión Sobre Marcadores Moleculares

**2.2.1 Marcadores Moleculares.** Los caracteres moleculares son universales; éstos tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación (Rentarúa, 2000). Esta variación, conocida también como polimorfismo, es producto de cambios espontáneos en el ácido desoxirribonucleótido (ADN), y pueden ir desde la substitución de un único nucleótido hasta mutaciones que involucren cambios en el genoma completo (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Existen diferentes tipos de marcadores genéticos utilizados en plantas, dentro de ellos los moleculares (Azofeifa-Delgado, 2006), los cuales entre otras aplicaciones, han permitido la identificación de la variabilidad en diferentes especies tanto a nivel inter como intraespecífico (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Medina, 2010). En los arándanos se han usado, principalmente, marcadores moleculares del tipo isoenzimas, RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y SSR (*Simple Sequence Repeat*) (Tamayo, 2007; Die y Rowland, 2013; Garriga *et al.*, 2013). Según Boches *et al.*, (2005), los microsatélites son los marcadores más eficaces para la identificación de genotipos en varias especies de *Vaccinium*.

**2.2.2 SSRs.** Los SSR también conocidos como microsatélites son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases ubicadas en todo el genoma; tanto en regiones codificantes como no codificantes, contienen polimorfismos con valores superiores al 90%. Son utilizados para estudios de variación genética a nivel intra e interespecífico, análisis de linajes y de sistemas reproductivos (Rentarúa, 2000; Azofeifa-Delgado, 2006), segregan de

manera mendeliana, son codominantes, neutros y la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar (Rentarías, 2000).

Aunque el uso de microsatélites se ve limitado con respecto a otro tipo de marcadores (ya que se requiere conocer la secuencia que los flanquea para diseñar los cebadores) los microsatélites de una especie particular se pueden evaluar en especies filogenéticamente relacionadas, y de esta manera se denominan heterólogos (Azofeifa-Delgado, 2006; Cobo, 2014).

### 2.3 Estudios en *Vaccinium*

Boches *et al.*, (2005) desarrollaron 30 loci microsatélites provenientes de secuencias expresadas etiquetadas (EST) en *V. corymbosum*. De éstos, algunos provienen de librerías EST (identificados con el prefijo NA *non acclimated* y CA *cold acclimated*) y los otros de librerías genómicas (identificados con el prefijo VCC). Estos marcadores han sido utilizados por Boches *et al.*, (2006) en *V. corymbosum*; Schlautman *et al.*, (2017a) en *V. macrocarpon* y Cobo *et al.*, (2016) en *V. floribundum*, con poblaciones de EE.UU. y Ecuador. Aunque la mayoría de los estudios sobre diversidad (realizados principalmente en cultivares) han utilizado marcadores moleculares tipo microsatélite derivados de ADN nuclear (Covarrubias-Pazaran *et al.*, 2016; Schlautman *et al.*, 2017a), recientemente Schlautman *et al.*, (2017b), desarrollaron este tipo de marcadores en cloroplastos y mitocondrias para el género *Vaccinium*. Estos investigadores encontraron que de los 54 loci SSR analizados, ninguno fue polimórfico, aunque todos los cebadores fueron transferibles a 12 taxa en *Vaccinium* y cuatro especies no *Vaccinium*.

Por otra parte, Georgi *et al.*, (2013) realizaron el primer mapa genético del arándano americano (*V. macrocarpon*), utilizando cuatro familias segregantes para la característica de

resistencia a la pudrición del fruto (ocasionada por el hongo *Phyllosticta vaccinii*). Para la construcción del mapa se usaron marcadores SSR, SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*) y COS (*Conserved Orthologous Set*). Encontraron 14 grupos de ligamiento con un total de 879,9 cM y 82,2% de cobertura.

Lo anterior da muestra de que no son escasos los estudios relacionados con marcadores moleculares en especies del género *Vaccinium*; no obstante, las especies endémicas de Suramérica no han sido tan ampliamente estudiadas y para el caso de Colombia no se ha realizado ningún estudio a nivel de marcadores moleculares para este género. Por esto se debe aunar esfuerzos en estudiar las especies que se encuentran en la región y que, además, son de importancia por el papel ecológico que tienen en el ecosistema, teniendo en cuenta que esta especie contribuye al mantenimiento de la biodiversidad de los páramos, a la protección de los suelos y fuentes de agua (Pérez y Valdivieso, 2007).

Una amplificación de los marcadores moleculares inicia con la extracción exitosa de ADN de alta calidad (Alejos *et al.*, 2008). Existen diferentes técnicas utilizadas en la obtención de ADN en plantas y su posterior amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A continuación, las pautas más importantes para tener en cuenta durante este proceso.

## **2.4 Extracción ADN Total**

La extracción de ADN de la planta es el punto de inicio para análisis de genotipos (Henry, 2014), en el género se han evaluado diferentes protocolos y kits comerciales, los cuales han mostrado reproducibilidad (Tamayo, 2007). Sin embargo, es necesario estandarizar el protocolo debido a la especificidad que éstos pueden presentar para cada especie.

Henry (2014), propone un protocolo general para plantas donde considera que el proceso de extracción comienza con la colecta y el almacenaje de la muestra, el cual puede hacerse mediante discos foliares que permite almacenar un gran número de muestras y tejidos.

Además, sugiere que es necesario congelar la muestra hasta su procesamiento; la temperatura óptima para refrigeración está en el rango de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$  (González y Quintero, 2017).

Entre los componentes de un protocolo de extracción se debe incluir solución tampón para controlar el pH, sales que influyen en la solubilidad del ADN y otras moléculas, agentes quelantes, detergentes para romper los tejidos y paredes celulares, agentes de unión fenólicos como el PVP, enzimas que eliminan contaminantes como proteínas y ARN y disolventes como el agua o el tampón TE (Henry, 2014).

## 2.5 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN. Uno de los prerequisites para la reacción es que se precisa de alguna información sobre la secuencia nucleotídica del ADN a clonar. La información se utiliza para sintetizar dos cebadores, uno para el extremo 5' y otro para el extremo 3' de la secuencia que se clonará. Se añaden los cebadores a una muestra de ADN cuyas moléculas se han separado en cadenas sencillas. Los cebadores se unen a los nucleótidos complementarios que flanquean la secuencia a clonar. Después de la hibridación se añade la enzima ADN polimerasa que sea resistente al calor y ésta sintetiza una segunda cadena de ADN, la repetición de estos pasos genera más copias del material genético (Ausubel *et al.*, 2003; Klug *et al.*, 2006).

## 2.6 Electroforesis

Es una técnica ampliamente utilizada para la separación y visualización de fragmentos amplificados de ADN (Madriz y Peraza, 2017), consiste en la migración de moléculas de ADN a través de una corriente eléctrica, pasando por una red con tamaños de poro

diferenciales que puede ser de agarosa o poliacrilamida, dependiendo de la resolución y tamaños en pares de base de los fragmentos amplificados se utiliza una u otra, esta última forma redes con tamaños de poro más pequeños que permiten la separación de fragmentos más cortos (Espinosa, 2007). Para visualizar por lo general se utiliza la luz ultravioleta para geles de agarosa, y la tinción con nitrato de plata para geles de poliacrilamida (Ausubel *et al.*, 2003; Espinosa, 2007).

### 3. Materiales y Métodos

En el siguiente apartado se describen los métodos seguidos para cumplir los objetivos del presente trabajo, el cual se desarrolló en dos fases: la primera de muestreo o recolecta, desempeñada en el departamento de Santander en inmediaciones del Páramo de Santurbán, bajo las consideraciones del permiso marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial otorgado por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales a la Universidad Industrial de Santander (ANLA, 2015) y, la segunda en los Laboratorios adscritos al grupo de investigación en Microbiología y Genética de la Universidad Industrial de Santander, en donde se procesaron las muestras para extracción de ácidos nucleicos, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como diferentes técnicas de separación y visualización por electroforesis.

#### 3.1 Distribución de Poblaciones Naturales de *V. floribundum*

Este trabajo se enfocó en el estudio de *V. floribundum* pese al hecho que en algunas localidades también se observó *V. meridionale*. Para determinar la distribución de *V.*

*floribundum* en el departamento de Santander – Colombia, se realizó una búsqueda de literatura en las bases del *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF), el herbario de la UIS (HUIS), y adicionalmente se obtuvo información suministrada por la comunidad de mercados locales donde se comercializa el fruto. De esta manera, se realizó una selección de siete puntos de muestreo a lo largo del flanco occidental de la cordillera oriental, en los siguientes municipios: California, Charta, Piedecuesta, Santa Bárbara, Suratá, Tona y Vetas.

### **3.2 Recolecta**

La toma de muestras de tejidos foliares se llevó a cabo siguiendo las consideraciones descritas por González y Quintero (2017), por lo que se cortaron hojas jóvenes en buen estado y se introdujeron en sobres de papel debidamente rotulados, los que se depositaron en bolsas plásticas con gel de sílice que fueron mantenidas (durante la salida de campo) en un lugar seco y oscuro a temperatura ambiente. Una vez ingresadas al laboratorio se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Algunas muestras se ingresaron al Herbario de la Universidad Industrial de Santander con los siguientes códigos de catálogo 18649, 18650 y 18651.

### **3.3 Protocolo de Extracción de ADN Total para la Especie *V. floribundum***

A continuación, se describen los protocolos que fueron ensayados en la estandarización del proceso de extracción de ADN a partir de muestras de *V. floribundum* recolectadas en las localidades:

**Protocolo 1 - Dellaporta *et al.*, (1983) con modificaciones propias del laboratorio  
Soluciones y reactivos**

Solución de extracción (100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM mercaptoetanol, 10 mL 20% SDS)

5 M Acetato de potasio

3 M Acetato de sodio

Isopropanol frío

80% Etanol

Tampón TE

### **Procedimiento**

1. Pesar 1 g de tejido fresco de la planta y pulverizar en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Añadir 8 mL de solución de extracción, mezclar bien e incubar 1 h a 65 °C.
3. Añadir 2 mL de acetato de 5 M potasio agitar vigorosamente e incubar en hielo por 30 min.
4. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min a 0 °C.
5. Filtrar el sobrenadante por malla *miracloth* hacia un tubo con 8 mL de isopropanol frío, mezclar suavemente.
6. Incubar a -20 °C por 30 min.
7. Colectar ADN precipitado con micropipeta con punta cortadas pasar a un tubo de microcentrífuga con 300 µL de tampón TE.
8. Añadir 2 µL de RNAasa 10 mg/mL e incubar 1 h a 37 °C.
9. Adicionar 30 µL de acetato de 3M sodio 3 M y 250 µL de isopropanol frío.
10. Incubar a -20 °C por 1 h.
11. Centrifugar a 20000 g por 10 min a 0 °C.
12. Lavar con 80 % etanol, colectar ADN con micropipeta pasar a un tubo nuevo y dejar secar.
13. Resuspender ADN en 200 µL de TE.

### **Purificación de ADN (opcional)**

1. Añadir 600 µL de fenol equilibrado en el paso 12 mezclar bien y centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C.
2. Tomar el sobrenadante y pasarlo a un nuevo tubo. Añadir 600 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico 50:45:5 mezclar bien y centrifugar a 19000 g a 4 °C.
3. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo. Añadir 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico 45:5 mezclar bien y centrifugar a 19000 g a 4 °C.
4. Tomar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo. Añadir 1mL de isopropanol frío y dejarlo en frío por 1-2 h y centrifugar a 19000 g a 4 °C.
5. Descartar el sobrenadante y resuspender en 200 µL de tampón TE.

### **Protocolo 2 - Chelex (Reyes-Escogido *et al.*, 2010)**

#### **Solución**

Buffer TES II (10 mM TRIS- Base pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8; 0,5 % SDS)

#### **Procedimiento**

1. Resuspender el tejido macerado en 50 µL de lisis TES II.
2. Calentar en horno de microondas por 10 s en el nivel 6 (187 W).
3. Inmediatamente después agregar 150 µg de proteinasa K y 20 µg de RNAasa.
4. Nuevamente colocar en horno con las mismas condiciones del paso 2.

5. Después de la lisis, incubar durante dos min a temperatura ambiente, y 150  $\mu$ L de amortiguador TE y adicionar 25 mg de Chelex 100.
6. Agitar y luego se pasa al horno con las mismas condiciones del paso 2.

### **Protocolo 3 - Doyle y Doyle, (1991)**

#### **Soluciones**

Tampón de extracción 2% CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1,4 M NaCl, 0,2% 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0)

Tampón de lavado (76% Et OH, 10 mM de acetato de amonio)

TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4)

#### **Procedimiento**

1. Precalentar 5-7,5 mL de tampón de aislamiento CTAB 60 °C en un baño de agua.
2. Triturar 0,5-1,0 g de tejido de hoja fresca en tampón de aislamiento CTAB a 60 °C en un mortero precalentado.
3. Incubar la muestra a 60 °C durante 30 (15-60) min con ocasionales remolinos suaves.
4. Extraer una vez con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) mezclando suavemente, pero a fondo.
5. Centrifugar (alrededor de 6000 x g) a temperatura ambiente para concentrar las fases durante 10 min.
6. Retire la fase acuosa con una pipeta de orificio ancho, transfiera a un tubo de centrífuga de limpio, agregue 2/3 vol de isopropanol frío y mezcle suavemente para precipitar los ácidos nucleicos.
7. Si es posible, transfiera los ácidos nucleicos con un gancho de vidrio y vierta 10-20 mL de tampón de lavado.
8. Centrifugar los ácidos nucleicos (6000 x g por 10 min) después de un mínimo de 20 min de lavado.
9. Verter cuidadosamente el sobrenadante (algunos gránulos aún estarán sueltos incluso después de este centrifugado) y déjelos secar al aire brevemente a temperatura ambiente.
10. Resuspender el sedimento de ácido nucleico en 1 mL de TE.
11. Agregar RNAasa a una concentración final de 10  $\mu$ g/mL e incube 30 min a 37 °C.
12. Diluir la muestra con 2 vol de agua destilada o TE, agregar acetato de amonio (7,5 M pH 7,7) hasta una concentración final de 2,5 M; mezclar y agregar 2,5 vol de Et OH frío y mezclar suavemente para precipitar el ADN.
13. Centrifugar a 10000 x g durante 10 min en una centrífuga refrigerada o ventilada.
14. Seque la muestra al aire y vuelva a suspender en la cantidad apropiada de TE.

La calidad y homogeneidad del ADN genómico se verificó en gel de 1 % agarosa en buffer TBE 1X, que se corrió a 90 V durante 1 h; en todos los casos se sembraron 5  $\mu$ L de ADN y se usó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific)*. Para estimar la concentración del ADN el gel se observó en un transiluminador de

luz ultravioleta. Adicionalmente, se cuantifico la concentración y calidad por medida de la absorbancia (260 nm / 280 nm y 260-320nm / 280-320 nm) (*Multiskan go-Thermo Scientific*).

### 3.4 Condiciones de Amplificación para Marcadores Microsatélite en *V. floribundum*

Se seleccionaron 11 pares de cebadores heterólogos diseñados por Boches *et al.*, (2005) para regiones microsatélites de *V. corymbosum*. Durante la selección de los cebadores se consideraron criterios de transferibilidad a otras especies del género *Vaccinium*, presencia de elevado número de alelos y polimorfismo (**Tabla 1**).

La amplificación de los microsatélites se llevó a cabo partiendo de las condiciones propuestas por Boches *et al.*, (2005) y realizando modificaciones. El primer paso fue determinar la temperatura óptima de hibridación por lo que se realizó un gradiente que iba desde 55 °C hasta 65 °C. En caso de ser necesario, posteriormente se modificó el tiempo de extensión final y el número de ciclos. El gradiente de temperatura se hizo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Realplex (Eppendorf)* y para las siguientes amplificaciones se utilizó un termociclador AB 2720 (*Applied Biosystems*).

**Tabla 1.**  
*Marcadores microsatélites seleccionados.*

Nombre	Motivo	F/R	Secuencia	PB	# alelos reportados	GenBank
CA421F*	(CT)25	F	TCAAATTCAAAGCTCAAATCAA	180–250	14	CF810704
		R	GTTTAAGGATGATCCCGAAGCTCT			
CA483F	(TC)8	F	GTCTTCCTCAGGTTCCGGTTG	300–370	9	CF810754
		R	GAACGGCTCCGAAGACAG			
CA794F*	(GA)12	F	CGGTTGTCCTCCACTTCATCTT	220–290	10	CF810941
		R	GTTTGAATTTGGCTTCGGATTC			
NA398	(AAAT)5	F	TCCTTGCTCCAGTCCATATGC	210–240	5	CF811369
		R	GTTTCCTTCCACTCCAAGATGC			
NA741	(TC)9	F	GCCGTCGCCTAGTTGTTG	240–290	14	CF811540
		R	GTTTGATTTTGGGGGTTAAGTTTGC			
NA800*	(TC)13	F	CAATCCATTCCAAGCATGTG	230–290	31	CF811589
		R	GTTTCCCTAGACCAGTGCCACTTA			
NA1040*	(TC)11	F	GCAACTCCCAGACTTCTCC	180–270	15	CF811165
		R	GTTTAGTCAGCAGGGTGCACAA			

Nombre	Motivo	F/R	Secuencia	PB	# alelos reportados	GenBank
VCC_I2	(CT)14	F	AGGCGTTTTTGAGGCTAACA	200–275	10	AY762678
		R	TAAAAGTTCGGCTCGTTTTGC			
VCC_J5	(TC)17	F	CCCCAACGGTCTTGATCTTA	250–300	12	AY762682
		R	GTTTCCTCTCTCTCCAACCCAGT			
VCC_K4	(TC)16(TC)12	F	CCTCCACCCCACTTTCATTA	150–300	14	AY762684
		R	GCACACAGGTCCAGTTTTTG			
VCC_S10	(CT)22	F	ATTTGGTGTGAAACCCCTGA	200–300	29	AY762685
		R	GTTTGC GGCTATATCCGTGTTTGT			

Nota: \*Los cebadores y las características descritas fueron tomados de Boches *et al.*, (2005); los cebadores con \* fueron utilizados por Cobo (2014).

En el proceso de estandarización se utilizaron nueve muestras. Para determinar la temperatura de hibridación se realizó el gradiente con las siguientes condiciones en reacciones de 10  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  de ADN [ $\sim 2,5$  ng/ $\mu\text{L}$ ], 1X de buffer de reacción, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 0,3  $\mu\text{M}$  de cada cebador, 0,25 U de Taq polimerasa (*Thermo Fisher Scientific*) y se completó el volumen con agua grado biología molecular (*Amresco*). La denaturación inicial se realizó a 94 °C por 3 min, el ADN fue amplificado por 35 ciclos y el programa de cada uno consistió en denaturación por 40 s a 94 °C, hibridación con gradiente y extensión a 72 °C durante 40 s, y extensión final a 72 °C por 30 min.

Una vez se identificó la temperatura de hibridación para cada marcador, se siguió el proceso de estandarización para eliminar bandas inespecíficas y aumentar la resolución de las bandas específicas. En este caso, en la PCR se utilizaron reacciones de 10  $\mu\text{L}$  con 1  $\mu\text{L}$  de ADN genómico [ $\sim 2,5$  ng/ $\mu\text{L}$ ] y 0,6  $\mu\text{L}$  de cada cebador [100 $\mu\text{M}$  pmol/ $\mu\text{L}$ ], 5  $\mu\text{L}$  de *TopTaq™ Master Mix* (*Quiagen*) [200  $\mu\text{M}$  dATP, 200  $\mu\text{M}$  dGTP, 200  $\mu\text{M}$  dCTP, 200  $\mu\text{M}$  dTTP y 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ], 1  $\mu\text{L}$  de *Coral Load 5X* y 1,9  $\mu\text{L}$  de agua HPLC; se realizaron modificaciones de acuerdo a los resultados obtenidos. El cambio en la Taq polimerasa utilizada se debió a que para la fecha en que se inició este ensayo se tenía disponibilidad de ésta en el laboratorio y a que en trabajos previos se evidenció una mayor eficiencia de esta enzima comparada con la Taq polimerasa convencional.

Para visualizar los resultados de la amplificación se realizó la estandarización en geles de agarosa y poliacrilamida (PAGE), teniendo en cuenta la concentración del gel, el tiempo y condiciones de corrida. Los geles se analizaron mediante el software de tratamiento de imagen de electroforesis *Total Lab D1* con el objetivo de estimar del peso molecular en pares de base de los productos amplificados.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación, se seleccionaron 15 muestras de ADN al azar, provenientes de tres localidades diferentes, y se amplificaron los marcadores estandarizados con el fin de estimar, como un primer acercamiento, parámetros de interés genéticos poblacionales que aproximen a la diversidad genética de esta especie en Colombia.

#### 4. Resultados

En este apartado se reportan los resultados obtenidos en el desarrollo de las actividades de campo y laboratorio realizadas en el marco del trabajo de grado. Adicionalmente, se incluyen resultados de la evaluación de parámetros de genética poblacional en los marcadores estandarizados.

##### 4.1 Distribución de Poblaciones Naturales de *V. floribundum*

Los datos de georreferenciación de las salidas de campo se ingresaron al software *Quantum GIS* v.3.2.2, para elaborar el mapa de distribución (**Figura 3** a la **Figura 6**). En los mapas se logra apreciar los puntos de muestreo en cada municipio y la delimitación del Páramo de Santurbán del año 2014 (Minsiterio de Ambiente y Desarrollo Sostenible., 2014) y varias capas correspondientes a las veredas, municipios y departamentos del país. Esta información

fue tomada de diferentes bases de datos (DANE e IGAC); por esta razón, algunos límites no están sobrepuestos.

En las zonas visitadas, el único municipio donde no se observó *V. floribundum* fue Santa Bárbara. En cuanto a rango altitudinal, se logró coleccionar individuos desde los 2100 m s. n. m. hasta los 3700 m s. n. m. (**Tabla 2**).

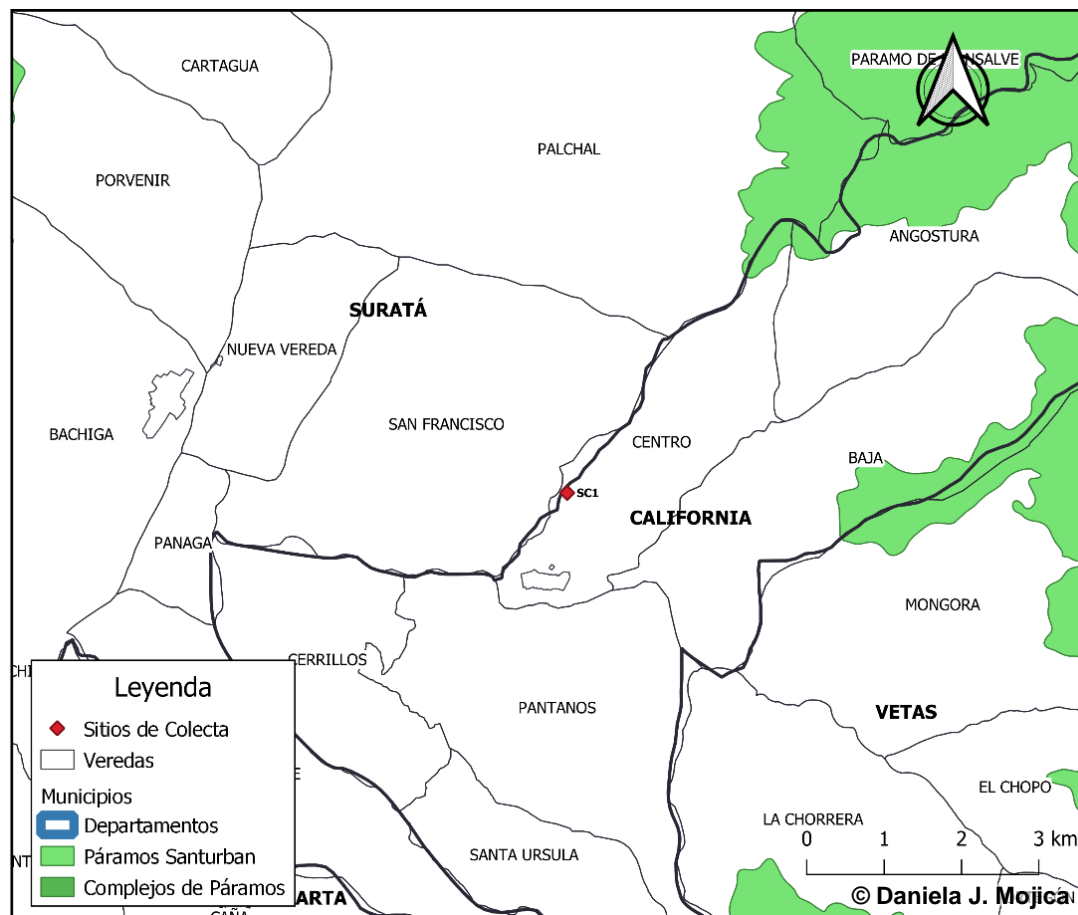


Figura 3. Sitios de colecta en el municipio de California.

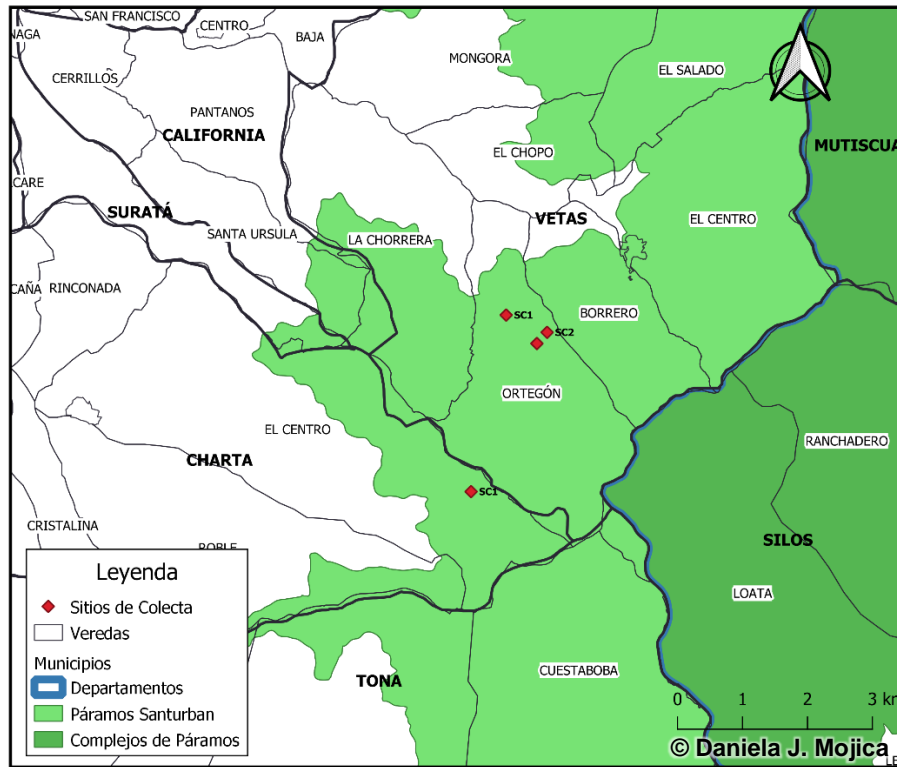


Figura 4. Sitios de colecta en los municipios de Charta y Vetás.

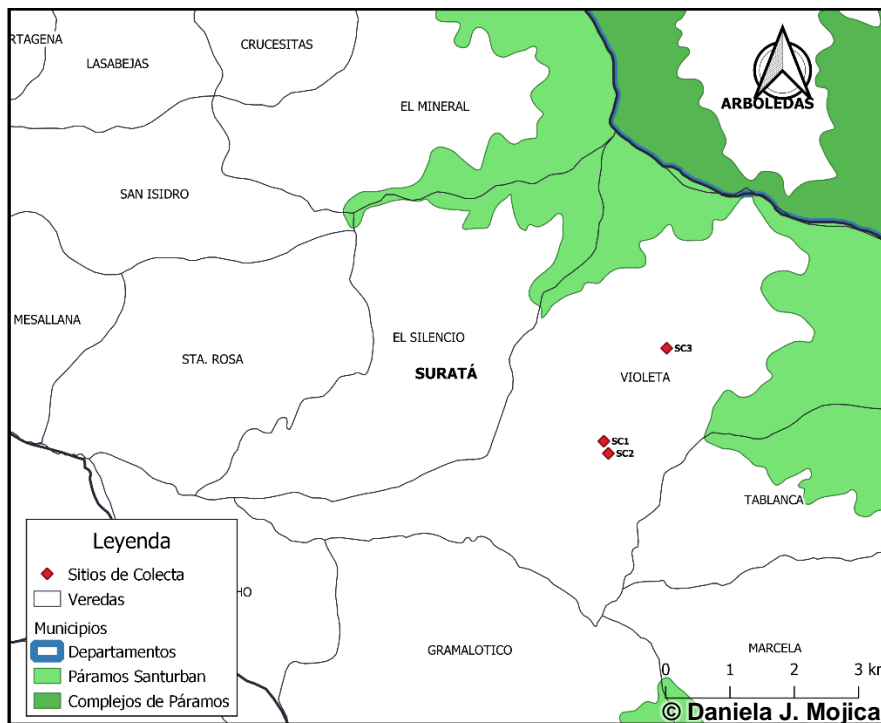


Figura 5. Sitios de colecta en el municipio de Suratá.

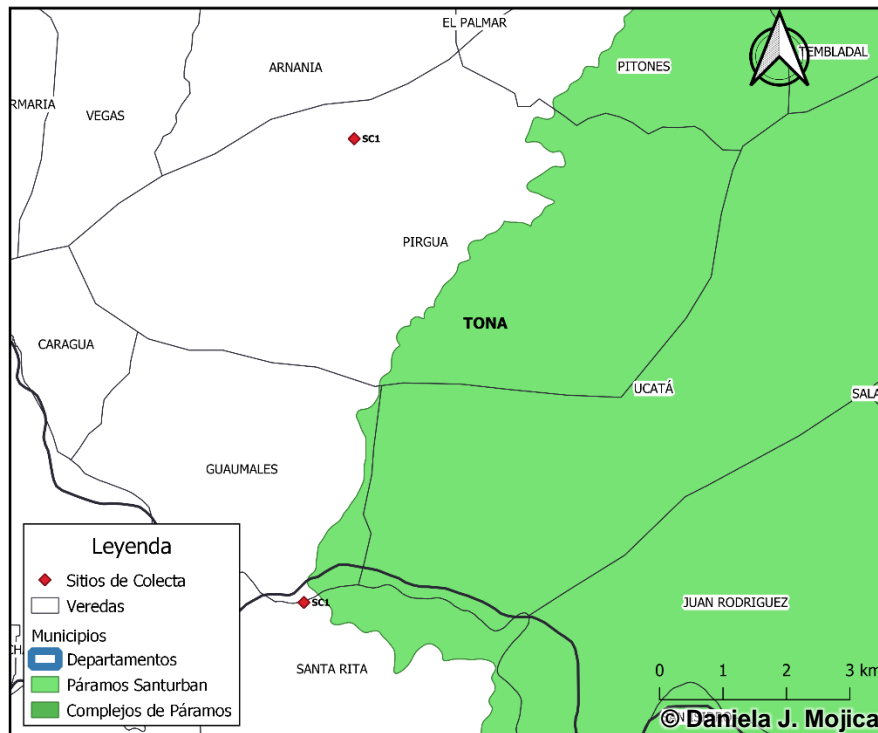


Figura 6. Sitios de colecta en los municipios de Tona y Piedecuesta.

Tabla 2.

Ubicación y rango altitudinal en el que se encontró *V. floribundum* en cada municipio muestreado.

Municipio	Vereda	Rango altitudinal (m s. n. m.) *	Georeferenciación*
California	Centro	2429-2586	Longitud 7.35700001 Latitud -72.94350204
Charta	El Centro	3611-3700	Longitud 7.26651401 Latitud -72.89966997
Piedecuesta	Santa Rita	2963-3042	Longitud 7.10801701 Latitud -72.98766897
Suratá	Violeta	2131-2323	Longitud 7.48509502 Latitud -72.97963701
Tona	Pirgua	2434-2488	Longitud 7.16577803 Latitud -72.98125296
Vetas	Ortegón	3611-3700	Longitud 7.29782503 Latitud -72.89335504

Nota: \*Datos tomados en campo.

#### 4.2 Protocolo de Extracción de ADN para la Especie *V. floribundum*

Se inició el proceso de estandarización con el protocolo universal para plantas de Dellaporta *et al.*, (1983) sin resultados positivos. A pesar de que se realizaron ajustes al periodo de

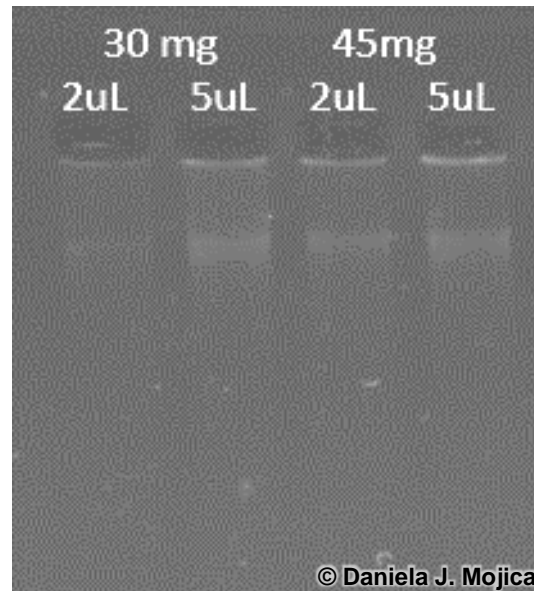
incubación (2, 4 y 6 horas) no se logró obtener ADN, por lo que se decidió ensayar los otros protocolos.

El segundo protocolo que se utilizó fue el método de *Chelex 100-Microwave* reportado por Reyes-Escogido *et al.*, (2010), dado que este protocolo no mostró resultados y teniendo en cuenta que no está diseñado para plantas, se descartó.

El tercer y último protocolo ensayado fue el descrito por Doyle y Doyle (1991). En este, se realizaron más ajustes ya que desde el primer ensayo se observó una pequeña cantidad de ADN en *V. floribundum*. En la Tabla 3 se presentan las modificaciones realizadas y el resultado obtenido.

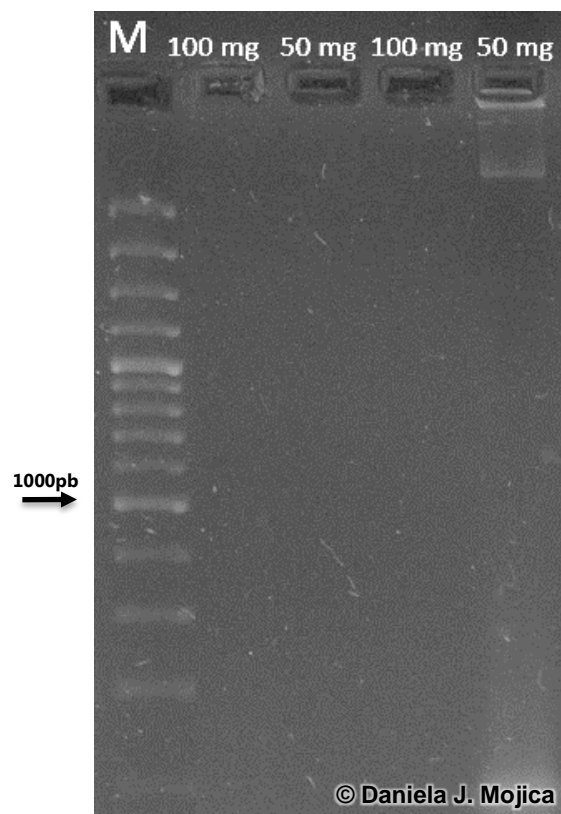
**Tabla 3.**  
*Modificaciones realizadas al protocolo descrito por Doyle y Doyle, (1991).*

Modificación	Descripción	Resultado
Tiempo de exposición al buffer de extracción	El protocolo indicaba de 15 a 60 min, por 2, 4, 6 h y toda la noche.	No se observó ADN.
Tejido inicial	El protocolo en miniprep utiliza 15 mg, se cambió a 30 mg y posteriormente a 45 mg.	No se observó ningún cambio al utilizar 30 mg; sin embargo, con 45 mg se obtuvo ADN (Figura 7).
Eppendorf – Falcon	Se trabajó con miniprep (tubos de microcentrífuga 1,5 mL) y maxiprep (tubos 15 mL), se escaló el protocolo y se utilizó diferente cantidad de material vegetal (100, 250, 500, 750 mg).	En miniprep se obtuvo muy poca cantidad de ADN, y una parte quedó en el pozo (Figura 8, pozo 4). En maxiprep al incrementar los pesos iniciales se notó un aumento en la cantidad de ADN. Se observó la saturación del solvente cuando el peso inicial sobrepasó el rango de 250-500 mg y el ADN extraído se quedó casi por completo en el pozo (Figura 9).
Concentración CTAB	En el protocolo inicial el buffer de extracción contiene CTAB al 2%. Se cambió a 4%, con el fin de evitar la precipitación de polisacáridos junto con el ADN.	Se eliminaron los residuos de polisacáridos, aunque también se disminuyó la cantidad de ADN obtenido (Figura 9 y 10). En la Tabla 4 se muestran los valores tomados por espectrofotometría.



**Figura 7.** ADN de *V. floribundum* extraído cuando se modificó peso inicial en mini prep.

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una muestra de agraz con 30 mg y 45 mg, sembrando volúmenes diferentes.



**Figura 8.** ADN de *V. floribundum* extraído cuando se modificó el peso inicial.

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1%. M: marcador de peso molecular de 1000 pb (Thermo Scientific). Dos muestras de agraz con 100 mg y 50 mg cada una.

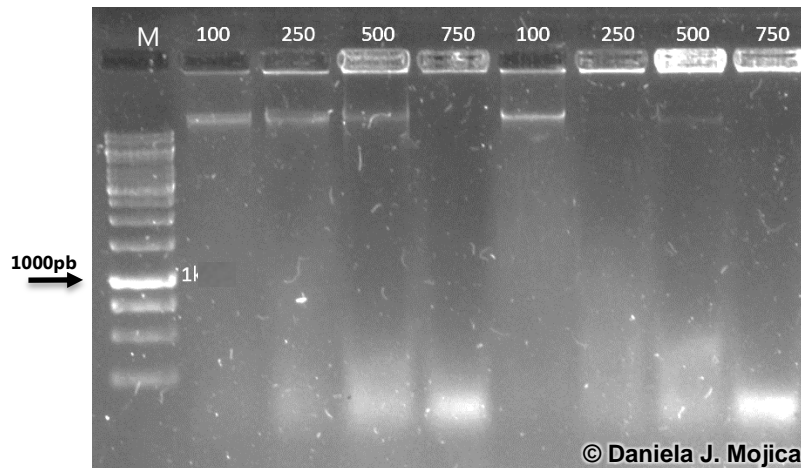


Figura 9. ADN de *V. floribundum* extraído cuando se modificó la relación peso/volumen.

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1% M: marcador de peso molecular de 1000 pb (Thermo Scientific). Pozos 2-8 dos muestras de agraz con 100 mg; 250 mg; 500 mg y 750 mg de tejido inicial cada una.

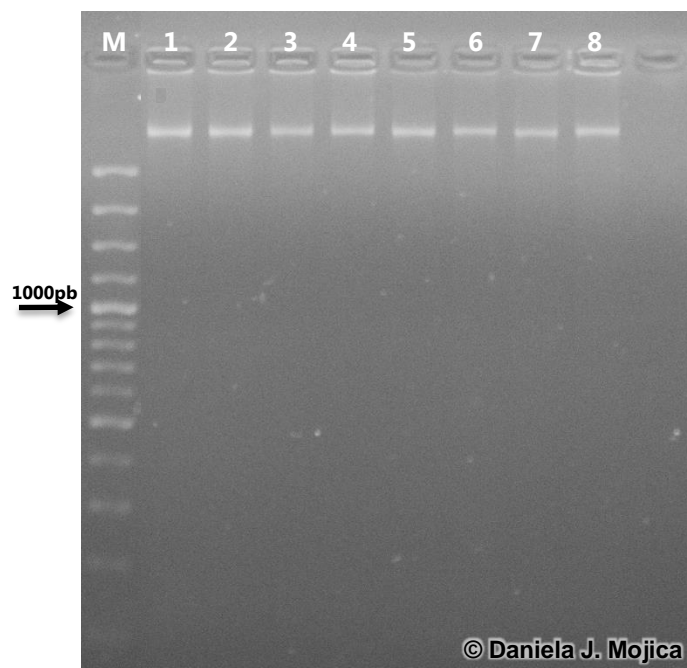


Figura 10. ADN de *V. floribundum* extraído con el protocolo estandarizado en el presente trabajo.

Nota: Gel de agarosa al 1% que evidencia la extracción positiva de ADN en ocho muestras de la especie de estudio. M: marcador de peso molecular de 1000 pb (Thermo Scientific).

Tabla 4.

Mediciones de calidad y concentración de ADN obtenido con el protocolo estandarizado.

Muestra	A260/A280	(260-320) / (280-320)	[ $\mu\text{g/mL}$ ]
1	1,38	1,82	4,84
2	1,54	1,81	3,14
3	1,64	1,80	2,00
4	1,25	1,78	2,06
5	1,64	1,84	1,71

Muestra	A260/A280	(260-320) / (280-320)	[ $\mu\text{g/mL}$ ]
6	1,42	1,82	4,33
7	1,26	1,77	5,71
8	1,38	1,69	3,11

Se presenta a continuación el protocolo estandarizado para extracción de ADN vegetal de hojas *V. floribundum* en el Laboratorio de Genética y Biotecnología.

#### **Protocolo 4: Protocolo estandarizado modificado a partir de Doyle y Doyle, (1991).**

##### **Soluciones**

Solución de 4 % CTAB, (1,4 M NaCl, 0,02 M EDTA, 0,1 M Tris HCl, 2% mercaptoetanol)

Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1

Tampón de lavado (76 % etanol, 10 mM acetato de amonio)

##### **Procedimiento**

1. Precalear la solución de extracción a 60 °C.
2. Pesar 100 mg de tejido macerado previamente con nitrógeno líquido.
3. Adicionar 7 mL de solución de extracción. Incubar la muestra a 60 °C durante 1 h en baño de maría con agitación a 130 rpm (los tubos se pueden girar 90° para que exista más espacio y evitar la sedimentación de la muestra).
4. Extraer una vez con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 mezclando suavemente, pero a fondo. Puede ser por inversión 20 veces.
5. Centrifugar 6000 g por 10 minutos.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, añadir 2/3 de volumen de isopropanol frío y mezclar suavemente, dejar incubando en frío por toda la noche.
7. Si es posible sacar con micropipeta el ADN precipitado, si no, centrifugar a 6000 g por 10 minutos, descartar el sobrenadante y transferir el *pellet* a un tubo de microcentrífuga.
8. Adicionar 1 mL de tampón de lavado, transferir a un microtubo 1,5 mL y resuspender cuidadosamente dejando mínimo por 20 minutos.
9. Centrifugar a 6000 g por dos minutos, descartar sobrenadante y dejar secar sobre una servilleta estéril.
10. Resuspender en 50  $\mu\text{L}$  de tampón TE o en un vol mayor, dependiendo del tamaño del *pellet*.
11. Adicionar 2  $\mu\text{L}$  de RNAasa 10 mg/mL e incubar por 30 min a 37 °C (o a 65 °C para desactivar nucleasas).
12. Diluir la muestra en dos volúmenes de tampón TE. Adicionar acetato de amonio 7,5 M a una concentración final de 2,5 M y 2,5 vol de etanol frío y mezclar para precipitar ADN.
13. Centrifugar a 10000 g durante 10 min.
14. Descartar sobrenadante, dejar secar boca abajo sobre una servilleta estéril y resuspender en 50  $\mu\text{L}$  de tampón TE.

15. Realizar la medición de calidad y concentración de ADN (p.ej. con espectrofotometría, 260/280 nm).
16. Realizar las diluciones en agua milli Q para obtener el ADN en la concentración adecuada. En el presente la solución de trabajo adecuada se estableció a una concentración de 2,5 ng/ $\mu$ L.

#### 4.3 Condiciones de Amplificación para Marcadores Microsatélite en *V. floribundum*

Como se mencionó anteriormente, el primer paso en la estandarización de los marcadores microsatélite, dado que son heterólogos, fue realizar un gradiente de temperatura de hibridación. La temperatura de hibridación reportada por Boches *et al.* (2005) fue la misma en seis de los siete marcadores estandarizados (**Tabla 5**), donde el microsatélite VCC\_K4 amplificó mejor a 60 °C, dos grados por debajo de la reportada por esos investigadores.

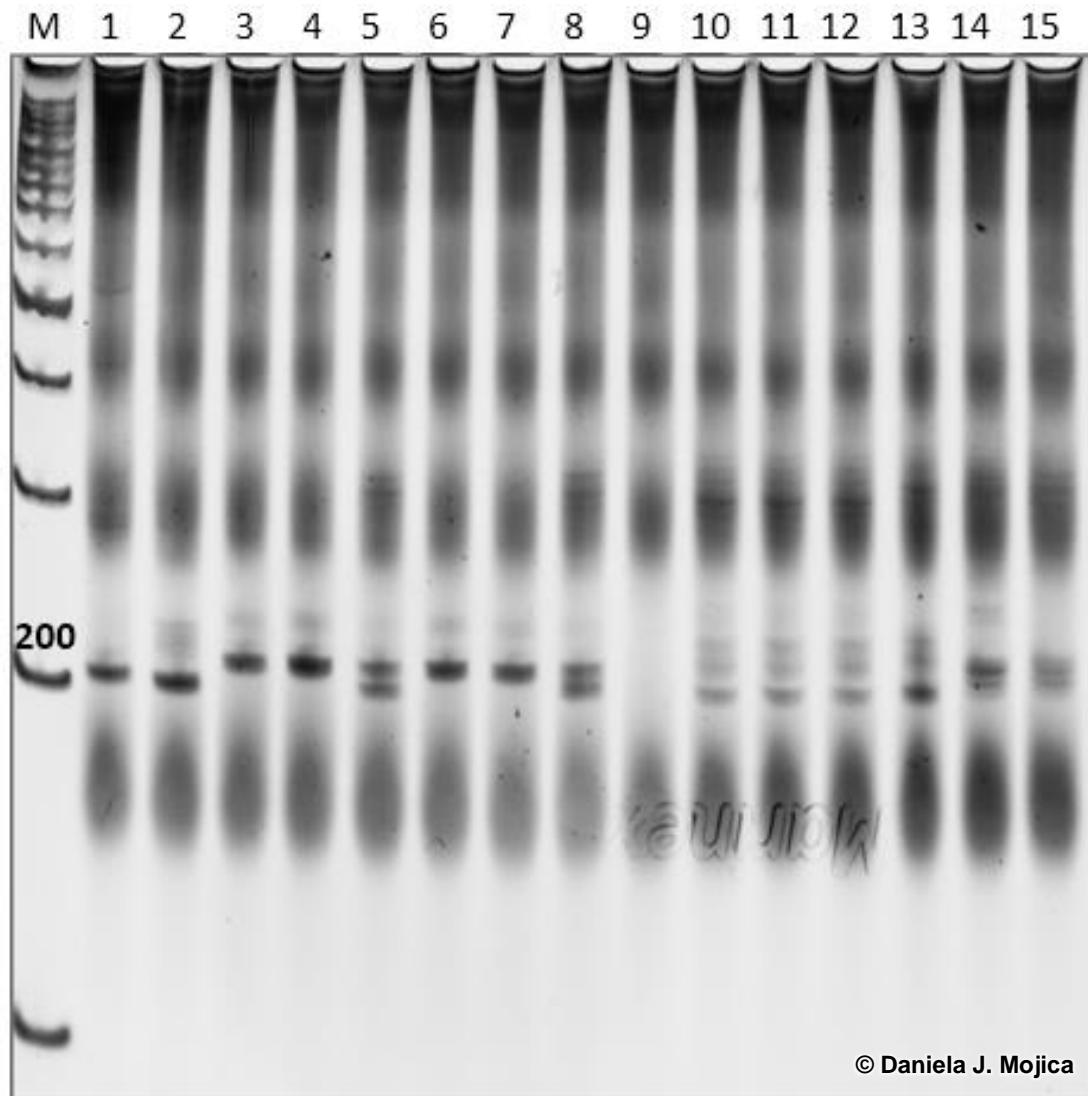
Después de realizar el gradiente de temperatura de hibridación a los once SSR determinó que, la óptima para el marcador NA398 es 56 °C, mientras que los marcadores CA794F, NA800, NA1040, VCC\_K4 y VCC\_S10 presentaron mejor producto amplificado, y el marcador VCC\_I2 a 62 °C; para un total de siete marcadores estandarizados (**Tabla 5**). En los marcadores CA421F, CA483F, NA741 y VCC\_J5 no se observó producto amplificado en ninguna de las temperaturas evaluadas, por consiguiente, se descartaron.

**Tabla 5.**  
*Temperatura de hibridación de marcadores estandarizados.*

SSR	T° de hibridación (°C) Boches <i>et al.</i> (2005)	T° de hibridación (°C) presente trabajo
<b>CA794F</b>	60	60
<b>NA398</b>	56	56
<b>NA800</b>	60	60
<b>NA1040</b>	60	60
<b>VCC_I2</b>	62	62
<b>VCC_K4</b>	62	60
<b>VCC_S10</b>	60	60

Las modificaciones al protocolo de amplificación consistieron en incrementar el tiempo de denaturación inicial (3 a 5 min), y disminuir el tiempo de extensión final (30 a 5 min) y el número de ciclos (35 a 30).

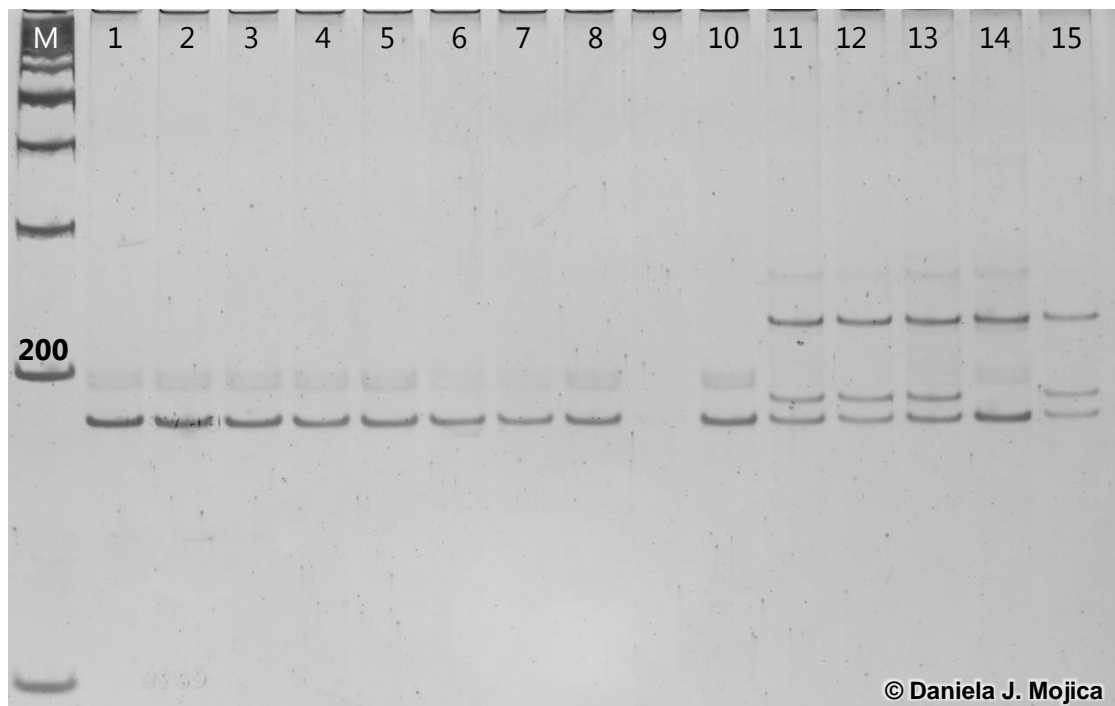
Aunque con las condiciones descritas se obtuvo amplificación en la mayoría de las muestras, al momento de la visualización por medio de electroforesis en PAGE se observó de manera constante un barrido (*smears*) en todos los carriles, lo que dificulta la lectura del producto principal. Se realizaron ensayos disminuyendo el volumen de *Top Taq Master Mix* (5 a 2,5  $\mu$ L), y aunque se logró amplificación, al visualizar los productos de PCR se siguieron observando bandas inespecíficas, aspecto que se mantuvo pese a la eliminación de la reacción del colorante *Coral Load* (**Figura 11**).



**Figura 11.** Producto amplificado del SSR VCC\_S10.

Nota: \*Electroforesis en gel de poliacrilamida en donde se muestra el producto esperado (200- 300 pb) cuando se utilizó TopTaq Master Mix. A pesar de que se observan bandas, los smears dificultan la lectura de las mismas. M: marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific) todos los pozos excepto el 9 muestran productos amplificados.

Se realizaron ensayos de amplificación con el kit *Go Taq Green Master Mix*. Los resultados no muestran *smears* y evidencian una mejoría significativa en la visualización de los productos de PCR (**Figura 12**). En el caso particular del marcador VCC\_I2, se lograron apreciar productos de PCR en el tamaño esperado que no se veían cuando se utilizó *Taq DNA polimerasa* y *Top Taq Master Mix*.



**Figura 12. Producto amplificado SSR NA398.**

Nota: Electroforesis en gel de poliacrilamida en donde se muestra el producto esperado (210—240 pb) al utilizar el kit Go Taq Green Master Mix (Promega). M: marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific); todos los pozos excepto el 9 muestran productos amplificados. Las bandas superiores a los 200 pb se consideraron stutters (ver discusión 5.5).

**4.3.1 Visualización de Productos de PCR.** Con el objetivo de establecer condiciones óptimas para la visualización de productos de PCR, se estandarizó la concentración de la poliacrilamida no desnaturalizante y las características de corrida para la electroforesis. En el sentido expuesto, se estableció que geles de poliacrilamida 19:1 al 8% [PA40%] mostraron buena separación de los productos de PCR de los SSR estandarizados, cuando la corrida se realizó como sigue: 30 min a 45 V; 4 h a 120 V; 30 min a 150 V.

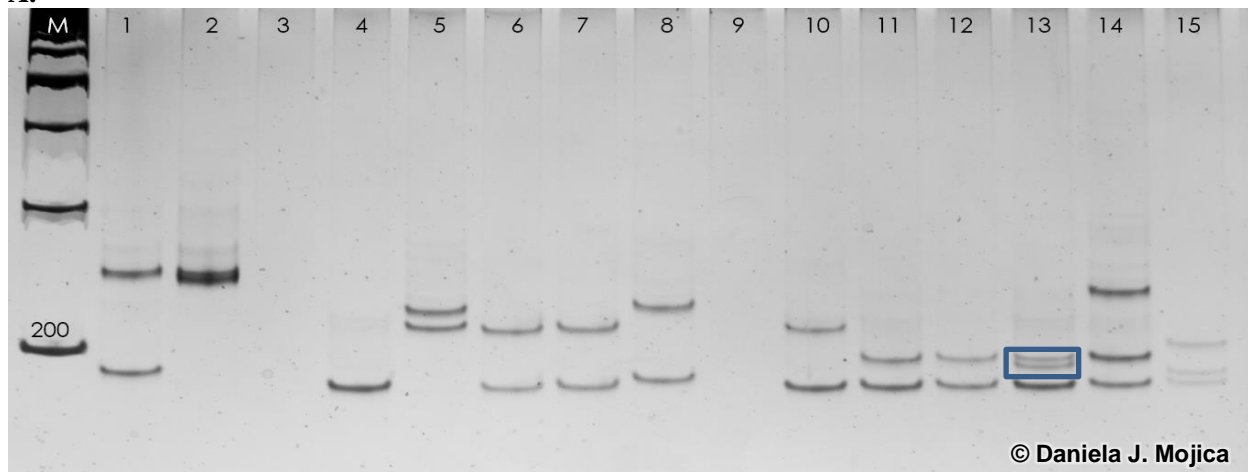
**4.3.2 Protocolo Estandarizado de Condiciones de Amplificación por PCR.** Para un volumen de reacción de 10  $\mu$ L el mix incluyó 2,5  $\mu$ L de *Go Taq Green Master Mix*, 1,5  $\mu$ L de ADN [2,5 ng/ $\mu$ L], 0,125  $\mu$ L de cada cebador [0,25 mM] y 5,75  $\mu$ L de agua HPLC. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 5 min de denaturación inicial a 92 °C, seguido por 30 ciclos de 40 s a 92 °C, 40 s (ver temperatura en **Tabla 5**) y 40 s a 72 °C; finalizando con 5 min de extensión a 72 °C.

#### 4.4 Evaluación de Marcadores SSR Estandarizados

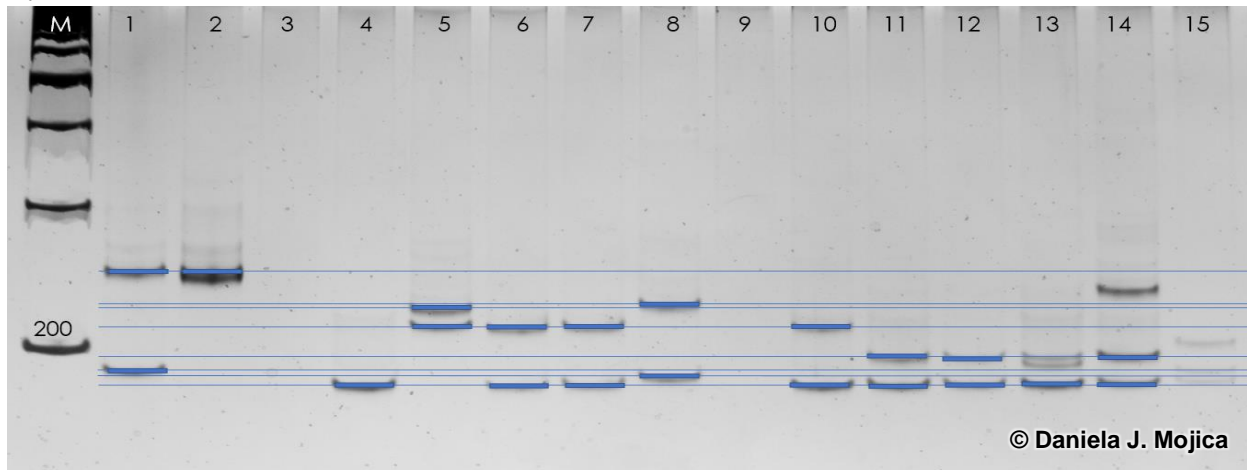
De manera adicional a lo propuesto en los objetivos del presente trabajo y para dar una aplicación inicial de estos marcadores al estudiar la diversidad genética de *V. floribundum*, se estimaron diferentes parámetros genético-poblacionales en una muestra aleatoria de 5 individuos de tres localidades diferentes (Charta, Suratá y Vetás) para un total de 15.

La amplificación se hizo siguiendo el protocolo estandarizado para cada marcador, y posterior a la electroforesis se fotodocumentó cada gel. Los resultados obtenidos se analizaron siguiendo el método de comparación directa con el marcador y con información proveniente del software *Total Lab D1* (**Figura 13**) con el fin de determinar el peso en pares de bases de cada banda. Para evitar la sobreestimación de los parámetros, sólo se tuvieron en cuenta las bandas nítidas que estuvieron cercanos al tamaño esperado.

A.



B.



C.

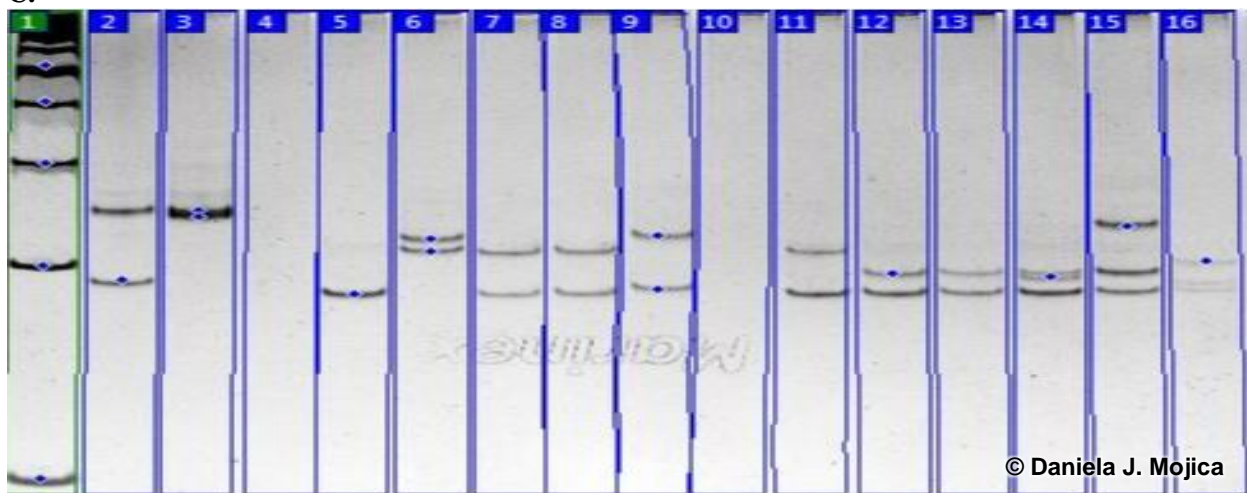


Figura 13. Lectura de productos de PCR del marcador NA1040.

Nota: A. Foto original; B. Lectura por comparación. C. Lectura con el software Total Lab D1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en donde se muestra el producto esperado (180-270 pb) en todos los casos M: marcador de peso molecular 100 pb (Thermo Scientific); todos los pozos excepto 3 y 9 muestran productos amplificados.

En la **Figura 13** se muestran los resultados para el marcador NA1040, donde se observan diferentes tamaños de banda para las muestras evaluadas. Por ejemplo, para este marcador en la muestra 13 se presentó el fenómeno conocido como *stutter bands* (Gugerli *et al.*, 2008) (**Figura 13-A**) por lo que estas bandas (recuadro azul) no se tuvieron en cuenta para análisis posteriores, con el fin de evitar la sobreestimación de los parámetros. Todos los marcadores estandarizados se evaluaron de esta manera.

Seis de los siete marcadores evaluados mostraron alto porcentaje de amplificación (86,7-93,3 %) dado que en la mayoría de las muestras se observó producto de tamaño esperado. Por

el contrario, el marcador VCC\_S10 solo fue eficiente en el 46,7% de las muestras evaluadas (**Tabla 6**). En las muestras 1, 6, 13 y 14 amplificaron los siete marcadores, mientras que en las demás, excepto la número 9, amplificaron entre cinco y seis microsatélites (**Tabla 6**).

En la Tabla 7 se detalla el rango de los productos de PCR amplificados (pb) y el número de alelos obtenidos para cada marcador estandarizado en las 15 muestras evaluadas, comparados con el reportado por Boches *et al.*, (2005). Cuatro de los marcadores estandarizados (CA794F, VCC\_I2, VCC\_K4 y VCC\_S10) se encuentran en el rango esperado; NA398, NA800 y NA1040 mostraron productos de PCR de valor inferior al reportado por Boches *et al.*, (2005). En cuanto al número de alelos, los microsatélites CA794F, NA398 y NA800 exhibieron 4 y los sistemas NA1040 y VCC\_K4 8 y 9, respectivamente, siendo éstos los SSR que mayor número de alelos presentaron.

**Tabla 6.**  
*Amplificación (%) de marcadores SSR estandarizados en 15 muestras de V. floribundum.*

Muestra\Marcador	CA794F	NA398	NA800	NA1040	VCC_I2	VCC_K4	VCC_S10	Porcentaje de amplificación (%)
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	85,7
3	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	85,7
4	✓	✓	✓	✓	-	✓	-	71,4
5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	85,7
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100
7	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	85,7
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	85,7
9	-	-	-	-	-	-	-	0
10	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	85,7
11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	85,7
12	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	85,7
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100
14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	100
15	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	71,4
Porcentaje de muestras amplificadas (%)	86,7	93,3	86,7	86,7	86,7	93,3	46,7	

Nota: ✓: producto amplificado en el rango esperado.

**Tabla 7.**

Número de alelos y rango de productos de PCR de marcadores estandarizados.

Nombre	Número de alelos		Rango productos de PCR (pb)	
	Boches <i>et al.</i> , (2005)	Presente trabajo	Boches <i>et al.</i> , (2005)	Presente trabajo
<b>CA794F</b>	10	4	220–290	226-264
<b>NA398</b>	5	4	210–240	180-230
<b>NA800</b>	31	4	230–290	202-226
<b>NA1040</b>	15	8	180–270	179-248
<b>VCC_I2</b>	10	7	200–275	211-281
<b>VCC_K4</b>	14	9	150–300	201-262
<b>VCC_S10</b>	29	5	200–300	202-228

Para la evaluación de parámetros genéticos-poblacionales se usó el genotipo de las muestras para cada marcador amplificado en pares de bases. Se estimó la presencia de polimorfismo, el número de alelos, la heterocigosidad y el contenido de información polimórfica (PIC *Polymorphism Information Content*). Para estos dos últimos parámetros se utilizó el software *MolKin V.3* (Gutiérrez, 2005).

Todos los marcadores SSR estandarizados en *V. floribundum*, excepto NA398, son informativos puesto que el valor de PIC es >0,5 según Botstein *et al.*, (1980) (**Tabla 8**), pese al bajo número de alelos (**Tabla 7**) con relación a lo reportado por Boches *et al.*, (2005). Con respecto a la heterocigosidad (He), el marcador más diverso es VCC\_K4 mientras que el menos diverso es el NA398 (**Tabla 8**). En cuanto a las localidades, se observó un mayor número de heterocigotos en Charta, mientras se espera que Vetás sea más diversa para los marcadores estandarizados pese al bajo valor de PIC promedio respecto a lo definido por Botstein *et al.*, (1980).

**Tabla 8.**

Parámetros poblacionales evaluados con el software *MolKin V.3* (Gutiérrez, 2005).

SSR	He	PIC	EAI
<b>CA497F</b>	0,64	0,57	2,74
<b>NA398</b>	0,31	0,29	1,45
<b>NA800</b>	0,63	0,57	2,70
<b>NA1040</b>	0,76	0,73	4,17

SSR	He		PIC	EAI
<b>VCC_I2</b>	0,80		0,77	4,90
<b>VCC_K4</b>	0,81		0,79	5,23
<b>VCC_S10</b>	0,70		0,67	3,37
Localidad	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>PIC</b>	<b>EAI</b>
<b>Vetas</b>	0,49	0,39	0,37	2,70
<b>Charta</b>	0,46	0,81	0,35	2,45
<b>Suratá</b>	0,39	0,51	0,31	2,01
<b>Promedio</b>	0,66	0,57	0,62	3,51

Nota: Los parámetros evaluados en las localidades siguieron el método de rarefacción implementado en el software *MolKin V.3* (Gutiérrez, 2005). He: heterocigosidad esperada; Ho: heterocigosidad observada; PIC: contenido de información polimórfica; EAI: número de alelos esperados.

## 5. Discusión

### 5.1 Distribución de *V. floribundum*

Con respecto a su ecología fue común encontrar a *V. floribundum* en diferentes hábitats p. ej. en bosque alto andino, pastizales, potreros y páramo medio, acorde a lo expresado por Luteyn, (2002). Con el muestreo realizado se pudo constatar que las poblaciones naturales de *V. floribundum* se encuentran amenazadas por la sobre explotación de sus frutos. Aunque se han reportado diferentes técnicas para la propagación por estacas (Muñoz, 2004) o por cultivos *in vitro* de esta especie (Pinzón, 2006), en las localidades visitadas no se evidenció la presencia de cultivos comerciales. Por esta razón, se podría decir que la cosecha del fruto solamente se realiza a partir de las poblaciones silvestres.

A pesar, de que la localidad visitada en Santa Bárbara se encuentra dentro del rango altitudinal de distribución no logramos encontrar individuos de *V. floribundum*. Esto posiblemente se dio por que el muestreo no fue intensivo, en ese sentido se recomienda ampliar las localidades.

## 5.2 Extracción ADN Total

La recolecta de la muestra es el paso inicial para el proceso de extracción, una vez se desprenden los folíolos se inicia la oxidación del ADN debido a algunos compuestos de la hoja como los polisacáridos y polifenoles (Alejos *et al.*, 2008; Borges *et al.*, 2009; Henry, 2014). Para evitar esto es necesario mantener un adecuado manejo de la muestra, aunque lo más recomendable es una cadena de frío que la conserve a baja temperatura (p. ej. nitrógeno líquido) lo que implica un costo alto. El gel de sílice es una alternativa viable que puede mantener condiciones favorables para la muestra (Funk *et al.*, 2017). Dadas las propiedades higroscópicas del gel de sílice éste mantiene estable la temperatura y absorbe la humedad eficientemente (Zallama *et al.*, 2018). Esto se pudo evidenciar en el presente trabajo, en el que las muestras se mantuvieron en sílice hasta ser llevadas al laboratorio, posteriormente se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Según Alejos *et al.* (2008) y Borges *et al.* (2009) esto puede mejorar la calidad de ADN obtenido al final de la extracción.

Durante el proceso de recolección se tuvo en cuenta el estado de desarrollo de las hojas. Aunque el color verde generalmente está asociado a hojas jóvenes, en algunas especies por la incidencia del sol se presentan diferentes tonalidades (Chaves, 2007). Por esta razón, en el agraz el color no fue un buen indicador. De esta manera y teniendo en cuenta que es una especie coriácea como criterio de selección se utilizó la dureza de la hoja, y se tomaron las que presentaban una textura suave.

Las hojas de agraz al ser coriáceas dificultan el proceso de extracción de ADN, específicamente durante la ruptura de la célula de forma física, por lo que es imprescindible realizar el macerado con nitrógeno líquido como lo sugieren Burden, (2012) y Henry (2014). Además, otros autores indican que al utilizar nitrógeno líquido para macerar las muestras se rompen con mayor facilidad las paredes y membranas celulares ya que este congela las

muestras de -196 °C a -210 °C (Alejos *et al.*, 2008; González y Quintero, 2017) lo que conlleva a tener una mayor concentración de ADN.

Adicionalmente, las hojas jóvenes contienen más células por unidad de peso y poseen menos polisacáridos y polifenoles, compuestos que pueden llegar a dificultar la extracción (Alejos *et al.*, 2008). En el caso de los polisacáridos, generalmente precipitan junto con el ADN y resulta una solución altamente viscosa, que puede interferir en la PCR (Arruda *et al.*, 2017); mientras que los polifenoles disminuyen la calidad y concentración de ADN extraído ya que al entrar en contacto con este lo oxidan (Fang *et al.*, 1992).

El color de las hojas de agraz (tonalidad rojiza) evidencia la presencia de flavonoides previamente reportado en las hojas de las ericáceas (Abreu *et al.*, 2008) y se ha probado que el exceso de radiación solar que reciben las plantas de páramo puede inducir esta característica (Chaves, 2007). Éste es otro factor que pudo influir en la alta tasa de degradación del ADN, obtenida al iniciar los ensayos de extracción, ya que estos flavonoides interfieren en los procesos relacionados con la oxidación del mismo (Trueba, 2003).

Una vez se tiene el tejido macerado apto para iniciar el proceso de extracción es necesario determinar la cantidad apropiada de tejido inicial, pues si se toma en exceso se puede sobresaturar la mezcla, lo que afecta el rendimiento y aumenta las impurezas del extracto (Alejos *et al.*, 2008). Por lo anterior, durante la estandarización del protocolo se ensayaron distintos pesos iniciales de tejido macerado, estos experimentos se realizaron tanto en tubos de 1,5 mL como en tubos de 15 mL con el fin de encontrar la mejor relación tejido inicial vs solución de extracción, procurando obtener la mayor concentración de ADN genómico. Se pudo evidenciar que para 100 mg de tejido inicial de *V. floribundum* se logra obtener ADN de alta calidad y concentración, utilizando 7 mL de solución de extracción (**Tabla 4**) (**Figura 9** y **Figura 10**).

El siguiente paso es la solución de extracción; ésta puede variar en cuanto a sus componentes y en el tiempo de exposición con la muestra. El CTAB es un detergente comúnmente utilizado en la solución de extracción vegetal (Doyle y Doyle, 1991; Dhanya *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2012) y ha sido reportado ampliamente en la bibliografía para la obtención de ADN a partir de tejidos vegetales ya que tiene una capacidad de liberar a los ácidos nucleicos y además formar complejos con los mismos, lo cual facilita su separación de los demás componentes celulares (Ausubel *et al.*, 2003; Arruda *et al.*, 2017).

En el presente trabajo cuando en la solución de extracción se aumentó la concentración de este componente, se observó el ADN con menos contaminantes (**Figura 10**) y se verificó este resultado por mediciones de espectrofotometría (**Tabla 4**). La mejoría en la extracción posiblemente se dio por un aumento en la precipitación del ADN, puesto que el CTAB es un surfactante que disminuye la tensión superficial del agua y produce un cambio conformacional en el ADN, compactándolo en un glóbulo, lo que conlleva a que la precipitación del ADN sea más efectiva (Azmat *et al.*, 2012). Por el contrario, no se notó diferencia cuando se varió el tiempo de exposición del buffer de extracción con la muestra, por lo que se mantuvo dentro del rango del protocolo original (15-60 min a 60 °C).

Teniendo en cuenta que la concentración en las 15 muestras preliminares vario de 1,71-6,58 µg/mL (**Tabla 4**) el protocolo de extracción se puede considerar eficiente en cuanto a la concentración de ADN obtenido.

Para lograr la correcta amplificación del ADN se debe tener en cuenta la calidad y concentración de ADN molde (Alejos *et al.*, 2008). Con el protocolo de extracción estandarizado en el presente trabajo se logró obtener el ADN total de calidad, que permitió la estandarización de los marcadores microsátélite.

### 5.3 Estandarización de Marcadores-Transferibilidad

La serie de marcadores de tipo microsatélite que fueron diseñados inicialmente para *V. corymbosum* han sido útiles en la evaluación de diferentes especies del género como *V. ovarum*, *V. bracteatum*, *V. vitis-idaea*, *V. crassifolium*, *V. macrocarpon*, *V. darrowii*, *V. tenellum*, *V. elliotti*, *V. arboreum*, *V. Oldhamii* y *V. floribundum* (Boches *et al.*, 2005, 2006; Cobo *et al.*, 2016). La transferibilidad de éstos es posible, puesto que estas especies se encuentran relacionadas filogenéticamente e inclusive algunas pertenecen a la misma sección (*Cyanococcus*) (Boches *et al.*, 2005). En este trabajo de grado se logró estandarizar siete de once marcadores, por lo que el porcentaje de transferibilidad fue del 63%. Este resultado está acorde con lo reportado por otros autores para especies del género *Vaccinium*, por ejemplo, Bassil *et al.*, (2009) reportaron 84,6% de transferibilidad para EST-SSR y 60-70% de transferibilidad para SSR de librerías genómicas; Liu *et al.*, (2014) obtuvieron un promedio de 78,6% para 8 especies con un rango de 68-89% de transferibilidad para EST-SSR; y Cobo *et al.*, (2016) reportan que el porcentaje de transferibilidad fue 91,67%.

La transferibilidad puede verse afectada por muchos factores que van desde el diseño del cebador hasta las condiciones de ciclado y reacción de la PCR (Chen *et al.*, 2014), además, ésta podría ser exitosa o no en dependencia de la coexistencia de sitios de unión de los cebadores (Silva *et al.*, 2014). A pesar de esto se ha reportado que los marcadores SSR presentan un alto nivel de transferibilidad entre especies relacionadas (Yan *et al.*, 2017).

### 5.4 Estandarización de la PCR

Con respecto a las modificaciones del protocolo de amplificación de los marcadores microsatélite, en este trabajo se pudo evidenciar que las temperaturas óptimas de hibridación no varían significativamente entre especies relacionadas como es el caso de *V. floribundum* y

*V. corymbosum*, puesto que se encuentran clasificadas en la misma sección, lo que facilita la transferencia de marcadores moleculares entre especies (Luteyn, 1991; Boches *et al.*, 2005).

Por otra parte, teniendo en cuenta que la reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación exponencial, reducir el número de ciclos puede resultar en cambios significativos en el producto amplificado (Ausubel *et al.*, 2003; Klug *et al.*, 2006). Esto se corroboró en el presente trabajo ya que, al pasar de 35 a 30 ciclos, permitió obtener sólo las bandas objetivo, y disminuir significativamente las inespecíficas. La PCR se optimizó siguiendo las sugerencias de Espinosa (2007), al aumentar el tiempo de denaturación inicial (de 3 a 5 min) y disminuir el tiempo de extensión final (de 30 a 5 min), conservando la amplificación de productos de PCR específicos.

En cuanto a las concentraciones de las reacciones, se siguió lo sugerido por Boches *et al.*, (2005), principalmente en la concentración de ADN total que para un volumen final de 10  $\mu$ L 2,5 ng de ADN molde parecen ser suficientes para una amplificación exitosa (**Tabla 6**).

Ya que los microsátélites utilizados en este trabajo son secuencias cortas de un tamaño esperado no superior a 370 pb, y para este tipo de marcadores los cambios entre un alelo y otro pueden ser sólo de un par de bases (Rentarúa, 2000), era fundamental contar con un sistema altamente resolutivo para separar las variantes alélicas (Espinosa, 2007). Por lo tanto, se realizó la visualización de fragmentos en agarosa de alta resolución 3%, en la cual se esperaba un poder de resolución de 0,04-0,7 Kb (datos del fabricante); Sin embargo, al no evidenciar polimorfismos se utilizó PAGE. Para la visualización de los fragmentos y polimorfismos, PAGE fue una técnica eficiente debido a que las moléculas de acrilamida forman redes con tamaños de poros más uniformes y pequeños (Espinosa, 2007), apropiados para el tamaño de banda esperados con los marcadores evaluados.

## 5.5 Evaluación de Marcadores SSR Estandarizados

Pese a que el alcance de este trabajo no era llevar a cabo un estudio de diversidad genética poblacional, de manera preliminar se estimaron parámetros de esta índole a partir de 15 muestras seleccionadas al azar.

En primera instancia las corridas electroforéticas permitieron observar aspectos no visualizados en el proceso de estandarización como la presencia de *stutter bands*. Se observó que con algunos de los cebadores amplificaban bandas inespecíficas cerca del producto de tamaño esperado, un fenómeno común en este tipo de marcadores conocido como tartamudeo o “*stutter*”, que se generan por la formación de un tipo especial de ADN *homoduplex* durante la PCR, en donde las cadenas se complementan de manera parcial (dado por inserciones o deleciones) y esto conduce a la formación de bucles. Esta estructura afecta la conformación de la doble cadena de ADN y por tanto su migración, lo que se evidencia como fragmentos adicionales en el gel, que pueden conducir a errores en el momento de la lectura (Gugerli *et al.*, 2008; Kulibaba y Liashenko, 2016).

En el presente trabajo de grado para los marcadores NA1040 (**Figura 13-A**), CA794F, VCC\_I2, y el NA800 se observaron dos bandas y según la nitidez y el tamaño del fragmento puede considerarse como *stutter band*. Adicionalmente, la mayoría de los microsatélites que presentaron esta característica son dinucleótidos, y se ha reportado que las bandas *stutter* son más frecuentes en este tipo de motivos (Kulibaba y Liashenko, 2016).

En cuanto a los resultados mostrados en la **Tabla 6** se puede observar que la única muestra en la que no se obtuvo producto amplificado con ningún marcador fue la número 9. En las mediciones de absorbancia del ADN de esta muestra obtuvo un valor de 1,65 como cociente de la medición de absorbancia A260/A280; este valor debería estar entre 1,8 – 2 (Madriz y Peraza, 2017). Esto puede indicar que posiblemente en el proceso de extracción la remoción

de proteínas no fue adecuada, siendo este uno de los factores que puede inhibir la PCR (Espinosa, 2007); sin embargo, no es lo único, otros factores como residuos de la extracción y condiciones de ciclado de la PCR son los principales inhibidores de la PCR (Huggett *et al.*, 2008; Schrader *et al.*, 2012) los cuales pudieron interferir en el proceso de amplificación de esta muestra.

A pesar de estar estandarizado el microsatélite VCC\_S10 presentó el número más bajo de muestras amplificadas (7/15), posiblemente por la naturaleza de los polimorfismos (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005), que puede conllevar a que los sitios de unión de este marcador no sean complementarios para *V. floribundum* y se generen alelos nulos, es decir, “cuando un alelo no puede ser amplificado por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador” (Pemberton *et al.*, 1995; Dawson R.J. *et al.*, 1997; Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Esto es una explicación viable teniendo en cuenta que se está trabajando con marcadores heterólogos. Además, la falta de conservación de los sitios de unión de cebadores puede conllevar a la no amplificación de productos de PCR esto es más común en transferencias de cebadores entre especies (Silva *et al.*, 2014), como se evidenció al no encontrar producto amplificado con los cuatro marcadores en los que no se obtuvo producto. Es importante destacar que la probabilidad de ocurrencia de alelos nulos aumenta cuando se trabaja con marcadores heterólogos (Kim *et al.*, 2004).

Respecto a los parámetros indicadores de diversidad genética, con los marcadores SSR estandarizados el número de alelos estuvo en un rango entre 4 y 9, lo que puede dar indicio de variabilidad entre los individuos de *V. floribundum* en las localidades muestreadas. De igual manera, el contenido de información polimórfica de seis SSR está acorde a lo descrito por Botstein *et al.*, (1980) lo que indica que se esperaría que estos marcadores (**Tabla 7**) exhiban un alto polimorfismo, en particular aquellos cuyo PIC fue  $>0,76$  lo que está en

concordancia con lo reportado por Liu *et al.*, (2014) donde los marcadores evaluados por esos autores mostraron una media del PIC de 0,77, indicando un alto nivel de polimorfismo.

La expectativa del número de alelos varía entre 1,45 (NA398) y 5,23 (VCC\_K4), resultado acorde a los valores de PIC estimados (**Tabla 8**). Lo anterior, podría indicar que en individuos silvestres se esperaría encontrar diversidad alélica, de ser utilizados estos SSR en un análisis genético poblacional. Este resultado es consistente con lo reportado por Boches *et al.*, (2006) ya que para individuos silvestres estos investigadores encontraron una mayor diversidad alélica, comparado con los cultivares (en promedio 15,5 alelos y 12,6 respectivamente).

El número promedio de alelos en una población es una medida de diversidad genética altamente informativa y un estadístico útil en la identificación de poblaciones para la conservación; sin embargo, este parámetro puede ser afectado por el tamaño de la muestra (Kalinowski, 2004; Rodrigáñez *et al.*, 2008). Para disminuir el error que pueda producir este factor se aplicó a dicho parámetro la corrección de Hurlbert, (1971) (método de rarefacción) así este valor para las localidades estudiadas fue 3,51 (**Tabla 8**) lo que indica que hay variación en éstas (Kalinowski, 2004; Gutiérrez, 2005; Rodrigáñez *et al.*, 2008). A partir de los resultados se sugiere plantear dos hipótesis; la primera, *V. floribundum* constituye una población genéticamente idéntica pese a la variabilidad detectada en las localidades ( $H_e$  y  $H_o$ , **Tabla 8**); y la segunda, como consecuencia de la baja diversidad alélica (PIC y EAI, **Tabla 8**), se esperaría que *V. floribundum* esté perdiendo su diversidad genética. Hipótesis que deberán ser validadas en estudios futuros.

## 6. Conclusiones

*Vaccinium floribundum* se encuentra ampliamente distribuido en el Páramo de Santurbán y sus inmediaciones, donde se logró identificar individuos en ambiente natural en 6 de 7 municipios muestreados, lo cual podría constituir poblaciones naturales que desde el punto de vista genético poblacional no han sido determinadas.

El protocolo más eficiente para extraer ADN a partir de hojas de *V. floribundum* es el reportado por Doyle y Doyle, (1991). Con las modificaciones realizadas se puede obtener ADN de calidad y cantidad óptimos para PCR.

De los 11 marcadores seleccionados se logró estandarizar siete, de los cuales seis presentan un alto contenido informativo polimórfico y valores de diversidad que superan el 60%, lo que los hace potencialmente eficientes para realizar estudios genético-poblacionales.

## 7. Recomendaciones

Se recomienda:

- Ampliar el número de SSR base con respecto a los estandarizados en este trabajo de grado para garantizar conclusiones más certeras al estimar la diversidad y el grado de estructura genética y, de ser posible el uso de marcadores propios de la especie. En caso contrario ampliar el número de individuos por localidad para que le dé robustez a los diferentes parámetros genético-poblacionales.

### Referencias Bibliográficas

- Abreu, O.A., A. Cuéllar Cuéllar, y S. Prieto. 2008. Fitoquímica del género *Vaccinium* (Ericaceae). *Rev. Cuba. Plantas Med.* 13(3): 1-11.
- Alejos, L.P.V., M. del C.M. Aragón, y A.R. Cornejo. 2008. Extracción y purificación de ADN. p. 1-26. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*.
- ANLA. 2015. Resolución 0047 de 22 de enero del 2015. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA. AUTORIDAD NACIONAL DE LICENCIAS AMBIENTALES ANLA, Colombia.
- Aranguren-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil, y J. Jordana. 2005. Los microsatélites, marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim. Recib. Oct.* Aceptado Diciembre 13(11): 30-42.
- Arruda, S.R., D.G. Pereira, M.M. Silva-Castro, M.G. Brito, y A.M. Waldschmidt. 2017. An optimized protocol for DNA extraction in plants with a high content of secondary metabolites, based on leaves of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). *Genet. Mol. Res.* 16(3): 1-9.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J. a Smith, K. Struhl, C.J. Wiley, R.D. Allison, M. Bittner, y S. Blackshaw. 2003. *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Azmat, M.A., I.A. Khan, H.M.N. Chemma, I.A. Rajwana, A.S. Khan, y A.A. Khan. 2012. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of *Mangifera indica* L. \*. *J. Zhejiang Univ.* 13(4): 239-243.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. *Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; Aplicaciones En Frutales Del Trópico*. *Agron. Mesoam.* 17(2): 221-241.
- Bassil, N., A. Oda, y K.E. Hummer. 2009. Blueberry microsatellite markers identify cranberry cultivars. *Acta Hort.* 810: 181-186.
- Boches, P., N. V Bassil, y L. Rowland. 2006. Genetic Diversity in the Highbush Blueberry Evaluated with Microsatellite Markers. *J. Am. Hort. Soc.* 131(5): 674-686.
- Boches, P.S., N. V. Bassil, y L.J. Rowland. 2005. Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Mol. Ecol. Notes* 5(3): 657-660.
- Borges, A., M. Rosa, G. Recchia, J. Queiroz-Silva, E. Bressan, y E. Veasey. 2009. CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Sci. Agric.* 66(4): 529-534.

- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, y R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32(3): 314-31.
- Burden, D. 2012. Guide to the Disruption of Biological Samples. *Random Prim.* 25(12): 1-25.
- Buytaert, W., R. Célleri, B. De Bièvre, F. Cisneros, G. Wyseure, J. Deckers, y R. Hofstede. 2006. Human impact on the hydrology of the Andean páramos. *Earth-Science Rev.* 79(1-2): 53-72.
- Cardozo, R., S. Córdoba, J. González, J. Guzmán, H. Lancheros, L. Mesa, R. Pacheco, B. Pérez, F. Ramos, M. Torres, y P. Zuñiga. 2009. Especies útiles en la Región Andina de Colombia.
- Chaves, Ó.M. 2007. Retraso del enverdecimiento en las hojas nuevas de *Pernettya prostrata* (Ericaceae): posibles funciones adaptativas. *Rev. Pensam. Actual* 7(8-9): 96-104.
- Chen, C., C.H. Bock, y T.G. Beckman. 2014. Sequence analysis reveals genomic factors affecting EST - SSR primer performance and polymorphism. : 1147-1156.
- Coba, P.S., D. Coronel, K. Verdugo, M.F. Paredes, E. Yugsi, y L. Huachi. 2012. Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La granja, Rev. Ciencias la Vida* 16(2): 5-13.
- Cobo, M.M., B. Gutiérrez, A.F. Torres, y M. de L. Torres. 2016. Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochem. Syst. Ecol.* 64: 14-21.
- Cobo, M.M.A. 2014. Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) en tres Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi.
- Corantioquia. 2009. Conozcamos y usemos el mortiño. 3: 28.
- Covarrubias-Pazarán, G., L. Díaz-García, B. Schlautman, J. Deutsch, W. Salazar, M. Hernández-Ochoa, E. Grygleski, S. Steffan, M. Iorizzo, J. Polashock, N. Vorsa, y J. Zalapa. 2016. Exploiting genotyping by sequencing to characterize the genomic structure of the American cranberry through high-density linkage mapping. *BMC Genomics* 17(1): 451.
- Dawson R.J., Gibbs H.L., Hobson K.A., y Yezerinac S.M. 1997. Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity (Edinb)*. 79(November 1996): 506-514.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, y J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Report.* 1 Number 4: 19-20.

- Dhanya, K., J. Kizhakkayil, S. Syamkumar, y B. Sasikumar. 2007. Isolation and amplification of genomic DNA from recalcitrant dried berries of black pepper (*Piper nigrum* L.)--a medicinal spice. *Mol. Biotechnol.* 37(2): 165-168.
- Die, J. V., y L.J. Rowland. 2013. Advent of genomics in blueberry. *Mol. Breed.* 32(3): 493-504.
- Doyle, J., y J.. Doyle. 1991. DNA Isolation from Small Amount of Plant Tissue. *Phytochem. Bull.* 57: 13-15.
- Espinosa, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. p. 517-540. En *Las herramientas moleculares.*
- Fang, G., S. Hammar, y R. Rebecca. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques* 13(1): 52-56.
- Funk, V., M. Gostel, A. Devine, C. Kelloff, K. Wurdack, C. Tuccinardi, A. Radosavljevic, M. Peters, y J. Coddington. 2017. Guidelines for collecting vouchers and tissues intended for genomic work (Smithsonian Institution): Botany Best Practices. *Biodivers. Data J.* 5: e11625.
- Garriga, M., P. a Parra, P.D.S. Caligari, J.B. Retamales, B. a Carrasco, G. a Lobos, y R. Garcia-Gonzales. 2013. Application of inter-simple sequence repeats relative to simple sequence repeats as a molecular marker system for indexing blueberry cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 93: 913-921.
- Georgi, L., J. Johnson-Cicalese, J. Honig, S.P. Das, V.D. Rajah, D. Bhattacharya, N. Bassil, L.J. Rowland, J. Polashock, y N. Vorsa. 2013. The first genetic map of the American cranberry: Exploration of synteny conservation and quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 126(3): 673-692.
- González, M.A., y L. Quintero. 2017. Plantas. p. 11. En :González, M., Arenas, H. (eds.), *Recolección de tejidos biológicos para análisis genéticos.* Primera ed. Instituto de Investigación de Recursos Bológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D. C., Colombia. 33 p.
- Granados, D.E. 2012. Evaluación del estado de conservación de las poblaciones de *Vaccinium meridionale* Swartz (Ericaceae) ubicadas en el nororiente del Departamento de Cundinamarca.
- Gugerli, F., S. Brodbeck, y R. Holderegger. 2008. Insertions-deletions in a microsatellite flanking region may be resolved by variation in stuttering patterns. *Plant Mol. Biol. Report.* 26(3): 255-262.
- Gutiérrez, J.P. 2005. MolKin v3.0 A Computer Program for Genetic Analysis of Populations Using Molecular Coancestry Information. *J. Hered.* (96): 718-721.

- Henry, R.J. 2014. Plant DNA extraction. Plant genotyping DNA fingerprinting plants (May): 239-249.
- Huggett, J.F., T. Novak, J.A. Garson, C. Green, S.D. Morris-jones, R.F. Miller, y A. Zumla. 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors : an important and unrecognised phenomenon. 9: 1-9.
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction : Private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genet.* 5: 539-543.
- Kim, K.S., M.S. Min, J.H. An, y H. Lee. 2004. Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean goral. *J. Hered.* 95(6): 521-525.
- Klug, W.S., M.R. Cummings, y C.A. Spencer. 2006. *Conceptos de genética.* octava.
- Kulibaba, R.A., y Y. V Liashenko. 2016. Influence of the PCR Artifacts on the Genotyping Efficiency by the Microsatellite Loci Using Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis. 50(3): 162-167.
- Liu, Y. chun, S. Liu, D. cheng Liu, Y. xiang Wei, C. Liu, Y. min Yang, C. guang Tao, y W. sheng Liu. 2014. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in blueberry (*Vaccinium*) and their cross-species transferability in *Vaccinium* spp. *Sci. Hort.* (Amsterdam). 176: 319-329.
- Luteyn, J.L. 1991. Key to the subfamilies and genera of neotropical Ericaceae. *Nord. J. Bot.* 11(6): 623-627.
- Luteyn, J.L. 2002. Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae. *Bot. Rev.* 68(1): 55-87.
- Madriz, K., y J. Peraza. 2017. *Manual de Laboratorio de Biología Molecular.*
- Medina, C.I.C. 2010. Variabilidad poblacional y ecofisiológica del mortiño (*Vaccinium meridionale* sw.), especie con potencial productivo y agroexportador en el trópico altoandino.
- Minsiterio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. 2014. Resolución 2090 del 14 dic de 2014. Por medio de la cual se delimita el Páramo Jurisdicciones-Santurbán-Berlín y se adoptan otras determinaciones, Colombia.
- Muñoz, V. 2004. Determinación de Métodos para Producción de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), con Fines de Propagación y Producción Comercial. 1(1).
- Pedraza-Penalosa, P. 2015. New blueberry and mortino relatives (Ericaceae) from northwestern Colombia. *PhytoKeys* 49: 33-58.

- Pemberton, J.M., J. Slate, D.R. Bancroft, y J.A. Barrett. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4(2): 249-252.
- Pérez, S., y C. Valdivieso. 2007. Colección y caracterización morfológica in situ del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt) en la sierra norte del Ecuador.
- Pinzón, A. 2006. Complementación y validación, del protocolo de propagación in vitro de *Vaccinium floribundum* Kunth.
- Rangel-Ch, O. 2000. Colombia Diversidad Biótica III La región de vida paramuna. *Igarss* 2014 (1): 1-5.
- Rentaría, M.A. 2000. Breve revisión de los marcadores moleculares. p. 541-566. En *Las herramientas moleculares*.
- Reyes-Escogido, L., M. Balam-Chi, I. Rodríguez-Buenfil, J. Valdés, L. Kameyama, y F. Martínez-Pérez. 2010. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: Examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 98(4): 465-474.
- Rodrigáñez, J., C. Barragán, E. Alves, y C. Gortázar. 2008. Genetic diversity and allelic richness in Spanish wild and domestic pig population estimated from microsatellite markers. *Spanish J. Agric. Res.* (6 (Special issue)): 107-115.
- Sánchez, N.G., M. Luna Rodriguez, M. Vasquéz-Torres, L.R. Sánchez- Velasquez, N. Santana-Buzzy, P. Octavio-Aguilar, y G. Iglesias-Andreu. 2012. Optimización de un protocolo del aislamiento del adn y de un sistema de amplificaciónISSR-PCR para *Ceratozamia mexicana* Brongn. (Zamiaceae). *Rev. Chapingo Ser. Ciencias For. y del Ambient.* 18(1): 123-133.
- Schlautman, B., G. Covarrubias-Pazaran, D. Fajardo, S. Steffan, y J. Zalapa. 2017b. Discriminating power of microsatellites in cranberry organelles for taxonomic studies in *Vaccinium* and *Ericaceae*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 64(3): 451-466.
- Schlautman, B., J. Bolivar-Medina, S. Hodapp, y J. Zalapa. 2017a. Cranberry SSR multiplexing panels for DNA horticultural fingerprinting and genetic studies. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 219: 280-286.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek, y R. Johne. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal.
- Silva, M.A.A., M.M. Souza, G.S. Silva, C.A.F. Melo, y R.X. Corrêa. 2014. Analysis of transferability of microsatellite primers ( SSR ) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*. 13(3): 5908-5918.

- Tamayo, P. 2007. Identificación molecular de patrones genéticos en distintas muestras de arándano (*Vaccinium* sp.). 36(2): 3-15.
- Torres, W., I. Montoya, y G. Ligarreto. 2009. Aspectos sociales y económicos de la producción de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz).
- Trueba, G.P. 2003. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. Rev. Cuba. Investig. Biomed. 22(1): 48-57.
- Yan, Z., F. Wu, K. Luo, Y. Zhao, Q. Yan, Y. Zhang, y Y. Wang. 2017. Cross-species transferability of EST-SSR markers developed from the transcriptome of *Melilotus* and their application to population genetics research. Sci. Rep. (July): 1-11.
- Zallama, B., L.Z. Ghedira, y S. Ben Nasrallah. 2018. Characterization of Thermophysical Properties of Silica Gel. J. Porous Media 21(7): 577-588.