



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIÓLOGO

**Estudio de la evolución del genoma cloroplástico en especies de la familia
Orchidaceae distribuidas en el sur del Ecuador**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN.

Autor: Bastidas Vélez, Cristian Israel

Directora: Ludeña Echeverría, Bertha Ximena, PhD.

Co-Directora: Riofrío Guaman, María Lorena, Blga.

LOJA – ECUADOR

2015

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Bertha Ludeña de Pintaud PhD.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: "Estudio de la evolución del genoma cloroplástico en especies de la familia Orchidaceae distribuidas en el Sur del Ecuador" realizado por Bastidas Vélez Cristian Israel ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero de 2015

f.

Cédula:1706505136

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Bastidas Vélez Cristian Israel declaro ser el autor del presente trabajo de fin de titulación: Estudio de la evolución del genoma cloroplástico en especies de la familia Orchidaceae distribuidas en el Sur del Ecuador, de la titulación de Biología siendo Bertha Ludeña Pintaud PhD. Directora y Blga. Lorena Riofrío codirectora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f.

Autor: Bastidas Vélez Cristian Israel

Cédula: 1104343320

DEDICATORIA

El presente trabajo dedico con todo mi amor y cariño principalmente a DIOS, que me dio la vida y por regalarme una familia maravillosa

A mis queridos padres Wladimir y Dunia, que con su esfuerzo y dedicación han estado conmigo en todo momento apoyándome y brindándome todo su amor.

A mi hermano Felipe Andrés, por ser mi compañero infalible con quién he compartido tantos momento inolvidables

Cristian Israel.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de fin de titulación agradezco a DIOS por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hizo realidad este sueño anhelado.

A mis padres por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional, por su esfuerzo y dedicación ya que ellos fueron el pilar para que yo pueda terminar mis estudios con éxito.

A mi directora de tesis PhD. Bertha Ludeña quien con sus conocimientos, sus experiencias, su paciencia y motivación han logrado en mi la culminación de este trabajo.

A mis profesores que durante toda mi carrera profesional han aportado con un granito de arena a mi formación; y, en especial a la Bióloga Lorena Riofrío y Biólogo Carlos Naranjo por sus consejos, sus enseñanzas y sobre todo por su amistad.

Agradezco de manera especial al Dr. Jean-Christophe Pintaud por su apoyo con el Análisis Bioinformático e interpretaciones filogenéticas.

Son muchas las personas que han acompañado el inicio de mi vida profesional a las que me encantaría agradecer por su amistad, apoyo, ánimo y compañía. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

Para ellos, muchas gracias y que DIOS los bendiga.

Cristian Israel.

ÍNDICE

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE	VI
RESUMEN EJECUTIVO	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS	5
CAPITULO I.....	6
MARCO TEÓRICO	6
1.1. El Genoma del Cloroplasto.....	7
1.2. Importancia del Genoma Cloroplástico.....	8
1.3. Familia Orchidaceae.....	8
1.3.1. <i>Epidendrum parviflorum</i> Ruiz Pav., Syst. Veg. Fl. Peruv. Chol. 1; 245 (1789)...	9
1.3.2. <i>Cyrtochylum myanthum</i> (Lindl.) Kraenzl., Pflazereich IV. 50 (80): 77 (1992).....	9
1.3.3. <i>Masdevallia deformis</i> Kraenzl., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 17:428 (1921).	10
1.4. Importancia de la familia Orchidaceae en Ecuador.....	11
1.5. Amenazas.	11
1.6. Evolución del Genoma Cloroplástico en la familia Orchidaceae.	11
CAPITULO II.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Material biológico.	13
2.1.1. Distribución de <i>Epidendrum parviflorum</i>	13
2.1.2. Distribución de <i>Cyrtochylum myanthum</i>	13
2.1.3. Distribución de <i>Masdevallia deformis</i>	13
2.2. Extracción de ADN.	14
2.3. Amplificación de Regiones Genómicas (PCR).....	14
2.4. Secuenciamiento.	15
2.5. Análisis Bioinformático.....	16
CAPITULO III.....	17

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	30
RECOMENDACIONES	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS.....	36

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Mapa genético del genoma cloroplástico de <i>Erycina pusilla</i> tomado de Pan I-C <i>et al.</i> , 2012.....	7
Figura 2. Captura de pantalla del software Mesquite, Alineación de secuencias de atpH-atpI.....	16
Figura 3. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas rps16-trnQ.....	18
Figura 4. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas atpH-atpI.....	20
Figura 5. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas trnL-trnF.....	21
Figura 6. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas trnL-ndhJ.....	22
Figura 7. Porcentaje de indels presente en los marcadores cloroplásticos analizados.....	25
Figura 8. Porcentaje de polimorfismos obtenidos.....	27
Tabla 1. Tabla de grupos genéticos de las regiones cloroplásticas analizadas por especie.....	23
Tabla 2. Tabla de SSR de las regiones cloroplásticas analizadas por especie.....	24
Tabla 3. Tabla de indels de las regiones cloroplásticas analizadas por especie.....	26
Tabla 4. Substituciones nucleotídicas determinadas por marcador y por especie.....	29

RESUMEN EJECUTIVO

La familia Orchidaceae ocupa una posición muy importante dentro de las angiospermas debido a la rica variedad de especies y gran morfología floral. Para Ecuador se han descrito 3549 especies, según el Royal Botanic Garden de Kew (2009), de las cuales 689 son endémicas del sur del país. Los estudios del genoma cloroplástico resultan útiles para análisis de variabilidad genética, estructura poblacional y de evolución molecular, debido a su secuencia altamente conservada y por estar sujeto a un modo de herencia maternal. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la variabilidad genética, la estructuración poblacional y la evolución del genoma cloroplástico (espaciadores intergénicos) de tres especies de la familia Orchidaceae: *Epidendrum parviflorum*, *Cyrtochylum myanthum* y *Masdevallia deformis* distribuidas en el sur de Ecuador.

Palabras Clave: *C. myanthum*, *E. parviflorum*, estructura poblacional, evolución molecular, espaciadores intergénicos cloroplásticos, *M. deformis*, Orchidaceae, variabilidad genética.

ABSTRACT

The Orchidaceae family occupies a very important place within angiosperms because of the rich variety of species and the large floral morphology exhibited. In Ecuador 3,549 species have been described (Kew Royal Botanic Garden, UK, 2009). Six hundred and eighty nine species are endemic to southern Ecuador. Studies of chloroplast genome are useful for analyzing genetic variability, population structure and molecular evolution due to its highly conserved sequence and maternal inheritance pattern. The present work aims to study the genetic variability, population structure and evolution of the chloroplast genome (intergenic spacers) within three orchids species distributed in southern Ecuador: *Epidendrum parviflorum*, *Masdevallia deformis* and *Cyrtochylum myanthum*.

Key words: *C. myanthum*; *E. parviflorum*; population structure; molecular evolution; chloroplast intergenic spacers; *M. deformis*; Orchidaceae; genetic variability.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo “Estudio de la evolución del genoma cloroplástico en especies de la familia Orchidaceae distribuidas en el sur del Ecuador” se realizó con el objetivo de estudiar la variabilidad genética, la estructuración poblacional y la evolución del genoma cloroplástico de tres especies de la familia Orchidaceae: *Epidendrum parviflorum*, *Cyrtochylum myanthum* y *Masdevallia deformis* distribuidas en el sur de Ecuador.

En lo referente a la estructuración del mismo, el presente documento de trabajo de fin de titulación está dividido en tres capítulos, dentro del primero se encuentra el marco teórico en donde se trata temas introductorios al genoma cloroplástico y su importancia, la familia Orchidaceae y una breve descripción de las tres especies en estudio y su importancia. En el segundo capítulo se presenta la metodología utilizada, describiendo los materiales y los pasos con los que se dio respuesta a los objetivos planteados como la extracción de ADN, las condiciones de PCR para cada una de las regiones estudiadas, su secuenciamiento y su análisis. En el tercer capítulo se exponen los resultados obtenidos y la discusión de los mismos. Finalmente se realizan recomendaciones y se enlista la bibliografía citada según las normas APA. Acompañando el texto se encuentran los anexos.

El genoma cloroplástico presenta un alto grado de conservación en tamaño, estructura, contenido génico y orden lineal en las plantas terrestres (Shaw, 2007). Siete genomas cloroplásticos de orquídeas han sido secuenciados (pertenecientes a los géneros *Corallorhiza*, *Cymbidium*, *Erycina*, *Neottia*, *Oncidium*, *Phalaenopsis*, y *Rhizanthella*). Los seis primeros pertenecen a la subfamilia *Epidendroideae* mientras que el último pertenece a la subfamilia *Orchidoideae*. (Chang CC. *et al.*, 2006; Barrett CF & Davis JI, 2012; Yang JB. *et al.*, 2013;). Estos resultados han permitido conocer más en detalle la estructura del genoma cloroplástico y detectar potenciales marcadores.

En el sur del Ecuador se distribuye un número importante de especies de la familia Orchidaceae, como resultado de eventos paleo-ecológicos entre otros, que han conducido a una rápida radiación de las especies vegetales de la zona (Meisel & Woodward, 2005). El análisis de la variabilidad genética poblacional es una herramienta de suma importancia para evaluar el nivel de tolerancia de las especies expuestas a agresión ambiental. El estudio de marcadores cloroplásticos que se propone en este trabajo permitió monitorear la diversidad genética, establecer patrones de estructura genética poblacional de las especies en estudio y

entender la evolución molecular del genoma cloroplástico en un sector de la familia Orchidaceae.

Para llevar a cabo la investigación se colectaron muestras de las especies *Epidendrum parviflorum*, *Cyrtochylum myanthum* y *Masdevallia deformis* en las provincias de Loja y Zamora-Chinchipe. El material colectado fue deshidratado con silicagel para la posterior extracción de ADN. Se amplificaron las regiones cloroplásticas de interés utilizando la técnica de PCR. Los amplicones obtenidos fueron purificados y posteriormente secuenciados por Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con Geneious 4.7.5. y alineadas con Mesquite, Posteriormente se efectuaron análisis filogenéticos de Neighbor-Joining utilizando Bio NJ de Sea View 4.2.8. Se detectó a nivel de los cuatro espaciadores intergénicos estudiados variaciones en la secuencia como microsatélites, sustituciones nucleotídicas e indels principalmente. El alcance de los objetivos se los llevó en su totalidad obteniendo así los resultados esperados para poder culminar el presente trabajo.

OBJETIVOS

General

Analizar las secuencias cloroplásticas (espaciadores intergénicos): atpH-atpI, trnQ-rps16, trnL-trnJ y trnL-trnF en varias especies de orquídeas distribuidas en el Sur del Ecuador, a fin de establecer el nivel de diversidad genética presente y relacionarlos con aspectos de estructura poblacional, relaciones filogenéticas y de conservación.

Específicos

- Establecer niveles de variabilidad genética poblacional.
- Determinar la estructura genética de las especies.
- Monitorear la evolución de las regiones genómicas analizadas.
- Determinar posible vulnerabilidad.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

trnL-trnF han resultado ser altamente variables y por tanto guardar caracteres potencialmente informativos en su secuencia.

En el estudio realizado por Perry y Wolfe (2002) se demostró que la que la tasa de sustitución nucleotídica es 2.3 veces más alta en LSC y SSC que en las repeticiones invertidas cloroplásticas por lo que se considera que éstas evolucionan más lentamente.

Desde principios de 1990 Taberlet *et al.* (1991), Morton y Clegg (1993), Clegg *et al.* (1994), , y Gielly y Taberlet (1994) impulsaron el uso de secuencias de ADN no codificantes cloroplásticas como un recurso para generar filogenias de plantas (Shaw *et al.*, 2007).

1.2. Importancia del Genoma Cloroplástico.

Hasta el momento hay muy poca información disponible sobre el genoma del cloroplasto en la familia Orchidaceae pese a esto, estudios han puesto en manifiesto un alto grado de conservación en la secuencia de ADN de cloroplasto (cpDNA). Aunque hay tres genomas diferentes en las plantas, el ADN del cloroplasto es en muchos aspectos, el genoma de elección para estudios taxonómicos orquídeas (Chase & Palmer, 1989).

Son muchas las ventajas en el uso de cpDNA para la taxonomía y la investigación evolutiva (Webster (1992) tales como: a) el tamaño de cpDNA es pequeño, con un alto número de copias y la estructura simple; b) en comparación con el genoma nuclear y mitocondrial el cpDNA presenta un alto contenido de genes y su disposición se encuentra más conservada lo que facilita el diseño de primers que pueden resultar muy importantes para futuros estudios; c) El cpDNA es de herencia materna y por lo tanto no posee una recombinación genética que interfiera con las relaciones filogenéticas moleculares (Tien X & Li DZ. 2002).

Las regiones cloroplásticas (IR; SSC; LSC) brindan importante información sobre la inserción o delección de secuencias, transición o transversión y repeticiones nucleotídicas útiles para ayudar a esclarecer relaciones evolutivas dentro de la familia Orchidaceae (Wu CS. *et al.*, 2011; Liu Y. *et al.*, 2013;).

1.3. Familia Orchidaceae.

La familia Orchidaceae comprende una de las mayores familias de plantas con flores, posee una rica variedad de especies en las cuales se aprecia una alta diversidad morfológica floral (Chase MW *et al.*, 2003) con más de 25000 especies (Chase MW. 2005) y cinco subfamilias reconocidas (*Apostasioideae*, *Cypripedioideae*, *Epidendroideae*, *Orchidoideae* y *Vanilloideae*) (Chase MW *et al.*, 2003) con gran número de especies con un significativo valor económico (Raubeson & Jansen. 2005).

Las orquídeas son un grupo antiguo y su distribución actual sugiere un origen probablemente anterior a la ruptura de Gondwana hace 125 millones de años, sin embargo, no dejan de ser una familia que evoluciona de forma activa (Chase MW, 2001). Las orquídeas del Ecuador han sido estudiadas desde el tiempo de la colonia, sin embargo la gran mayoría de la flora Orchidaceae del Ecuador fue descubierta después de la Segunda Guerra Mundial, cuando investigadores principalmente de los Estados Unidos y Suecia realizaron expediciones botánicas. Ecuador posee probablemente la mayor diversidad de orquídeas a nivel mundial, debido principalmente a que nuestro país cuenta con una extensa variedad de microclimas que circunscriben especies en áreas muy restringidas, con características peculiares y muy específicas (Meisel & Woodward, 2005).

1.3.1. *Epidendrum parviflorum* Ruiz Pav., Syst. Veg. Fl. Peruv. Chol. 1; 245 (1789).

Planta epífita, forma matas densas de tallos delgados, cubiertos con dísticas, imbricar brácteas estrecha, tubulares, acuminados, foliáceas arriba. Hojas estrechamente lanceoladas, acuminadas, de color verde oscuro. Inflorescencia una panícula suelta, pocas ramas laterales basales, escarioso bráctea floral, lineal. Sépalos y los pétalos de oliva verde, los labios, la columna y las anteras blanco. Sépalos cóncavos, obovadas, poco agarrados, acuminados; pétalos lineales, ligeramente dilatados cerca de ápice agudo; labelo unido casi al ápice columna, lámina libre transversa, cordadas base, lóbulos laterales extendidos, angulares, lóbulo medio cuneado, truncado, dos callos basal engrosados, algo comprimido, con un disco elíptico, tres camellones, callo grueso elíptico que se extiende casi hasta el ápice, columna gruesa, apicalmente dilatado (Dodson, 2004).

Esta especie es un miembro del grupo paniculatum, subgrupo paniculatum. Se distingue por el bastón delgado como tallo con numerosas hojas, las vainas en la base con inflorescencia paniculada, las pequeñas flores con sépalos y pétalos verdes oscuros y el labio blanco (Dodson, 2004).

1.3.2. *Cyrtochylum myanthum* (Lindl.) Kraenzl., Pflanzeich IV. 50 (80): 77 (1992).

Planta terrestre, grande, pseudobulbo piriforme, liso, de color verde oscuro, 3 - 4 hojas en el ápice, panícula axilar muy larga, muchas ramas laterales, vainas foliares basales generalmente más largos que los de pseudobulbo. Sépalo dorsal y los pétalos de color marrón oscuro, garra amarilla, los sépalos laterales marrón, el labio color blanco amarillento pálido, ápice inclinado de color marrón oscuro, la columna de color amarillo pálido, márgenes del estigma pardusco púrpura, aurículas púrpura hacia la punta, los polinios de color amarillo brillante (Dodson, 2004).

1.3.3. *Masdevallia deformis* Kraenzl., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 17:428 (1921).

Planta de tamaño pequeño a mediano, epífitas, cespitosa; raíces delgadas. Ramicaules negruzco, erectos, delgados, 1,5 a 4,5 cm de largo, envueltos por 2 o 3 vainas sueltas, tubulares. Hoja verde oscuro, erguida a sub-recta, coriáceas, pecioladas, de 4 a 10 cm de largo incluido el pecíolo (2 a 4,5 cm de largo), la lámina elíptica, subagudo a obtuso, 1 a 2,4 cm de ancho, cuneadas a continuación del pecíolo negruzco. Inflorescencia solitaria, de color encendido llamativa por una horizontal, ascendente, o erecto, pedúnculo delgado 4 a 10 cm de largo, con una bráctea por debajo de la mitad, debajo del ramicaulo; bráctea floral tubular, 6 a 8 mm de largo; pedicelo 8 a 11 mm de largo; ovario de 5 mm de largo; sépalos rojo bermellón, glabro, el sépalo dorsal oblongo, 12 a 17 mm de largo, 5 a 6 mm de ancho, connado a los sépalos laterales de 8 mm para formar un tubo cilíndrico, la porción triangular libre, el ápice es agudo enrollado en una delgada cola dirigida hacia delante 15 a 23 mm de largo, los sépalos laterales oblongo-elípticos encima del tubo cilíndrico estrecho, más o menos dilatado más allá de la unión con el sépalo dorsal, 30 a 40 mm de largo, connados 19 a 30 mm, 20 a 27 mm de ancho en conjunto, los vértices redondeados abruptamente contratados en colas delgadas 1,5 a 2,5 mm de largo; pétalos blancos con un nervio central púrpura, oblongos, 7 a 8 mm de largo, 2 a 2,75 mm de ancho, el ápice subtruncado, ligeramente bilobulado, el margen labellar con una carina longitudinal salpicado de púrpura, que termina en un diente agudo, retorcido encima de la base; labelo rojo o naranja, estrechamente oblonga, 7 mm de largo, 1,25 a 1,5 mm de ancho, comprimido lateralmente por debajo de la mitad, poco pubescentes o glabros, margen denticulado a entero, el ápice acuminadamente obtuso a redondo, el disco con un par de callos longitudinal, ciliadas o glabros, la base subcordada, 1,5 mm de espesor, con bisagras abajo; columna blanca con un margen púrpura, 5 a 6 mm de largo, el pie 3 mm de largo, con una corta extensión, curvada (Dodson, 2004).

Esta especie es local, pero a veces abundante, en los bosques del sudeste de Ecuador, los sépalos laterales son de color rojo - naranja. Las plantas y flores de población recientemente descubierta más al sur son más grandes, bronceados al este de Loja y la Cordillera del Cóndor. En adicción, las flores más grandes son asumidos por pedúnculos erectos y los labios son enteros. Esta población se reorganizó como *M. exaltata* en 1982. En 1984, a una altura ligeramente inferior en el mismo valle, se descubrieron numerosas plantas más pequeñas con inflorescencias horizontales similares a la forma típica. Las flores eran más pequeñas y los labios de muchos eran minúsculas o microscópicamente pubescentes o denticulados (Dodson, 2004).

1.4. Importancia de la familia Orchidaceae en Ecuador.

Ecuador es uno de los lugares más ricos del mundo por la diversidad de orquídeas, con tal vez una cuarta parte de todas las especies conocidas que se encuentran allí. Resulta irónico que pese a ser tan numerosas, muchas de las especies presentes son raras y amenazadas de extinción. La mayoría de orquídeas tienen un alto valor económico en el comercio internacional (Simpson, 2006). Desafortunadamente, la vulnerabilidad de algunas especies se debe a la alta tasa de deforestación y en consecuencia a la pérdida de hábitat así como a la colección selectiva (Dodson, 2005).

1.5 Amenazas.

En el Ecuador la familia Orchidaceae, como se dijo anteriormente, se encuentra amenazada y numerosas de sus especies en peligro de extinción debido a factores como la depredación selectiva de especies por colectores comerciales, ya que la extraordinaria variedad de aspectos florales de éstos organismos asegura una gran demanda de los consumidores de orquídeas. Además la destrucción masiva de hábitats produce pérdidas catastróficas con invaluable valor científico ya que muchas de las especies afectadas son aún desconocidas (Lenington & Pritchard, 2001). Según la FAO, Ecuador es uno de los países con mayor nivel de deforestación en América Latina.

La vulnerabilidad de las orquídeas del Ecuador se resume entonces a la destrucción de hábitat, sumado al problema del tráfico de especies, por su alto valor comercial (Endara, 1999). Es importante señalar que las orquídeas son sensibles al estrés ambiental, en especial a aquel derivado de la actividad antropogénica (deforestación) así como el calentamiento global (Kartzinel, 2012).

1.6 Evolución del Genoma Cloroplástico en la familia Orchidaceae.

Componentes de genoma del cloroplasto como SSC y LSC han resultado ser altamente informativos para la sistemática molecular, la fitogeografía y la genética de poblaciones en plantas (Shaw *et al.*, 2007). A pesar del transcurrir del tiempo el uso de cpDNA en investigaciones de evolución y sistemática molecular de plantas es relativamente bajo y son pocas las regiones no codificantes que se han comparado debido a las diferentes tasas de evolución entre las diversas proporciones del genoma (Olmstead & Palmer, 1994). Los espaciadores intergénicos cloroplásticos (IGS) han resultado ser informativos en estudios genéticos de plantas (Dong-Keun Yi *et al.*, 2012) por ello se los ha seleccionado en el presente estudio a fin de analizar la diversidad genética de varias especies ecuatorianas de la familia Orchidaceae.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico.

Proveniente de hojas de las especies *Epidendrum parviflorum*, *Cyrtochylum myanthum* y *Masdevallia deformis* en las provincias de Loja y Zamora Chinchipe (Anexo 1). El material recogido fue deshidratado en silicagel hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

2.1.1. Distribución de *Epidendrum parviflorum*.

Zamora-Chinchipe de Yangana a Valladolid, 2100 m. 24 de julio 1985, Dodson y Embree 16071 (QCNE, RPSC). De Zamora a Guayaquil, Cord. Condor, de Zumbi a Paquisha, 1450 m, 19 de febrero de 1986 Hirtz *et al.* 2826 (MO); de Zumbi a Paquisha, 1450 m, 19 de febrero de 1986 Hirtz *et al.* 2828 (MO). 26 individuos de *Epidendrum parviflorum* fueron analizados, distribuidos en 3 poblaciones diferentes: P1 - 10 individuos, P2 - 15 individuos y P3 - 1 individuo (Dodson, 2004).

2.1.2. Distribución de *Cyrtochylum myanthum*.

Loja: Carretera de Loja-Saraguro, km 8.6 de Saraguro, 09.40S 79. 15W, 2900-3100m, el 16 de junio de 1979; Loja-Zamora, 1800 m, 20 de marzo 1972, Harling 11337 (GB); Cuenca-Loja, a 3 km NW de Saraguro, 2900 m, 25 de julio de 1979, Heinonen 45 (GB); Carretera Yangana-Valladolid, 04.25S 79.15W, 2700 m, el 23 de diciembre de 1991, D.Rubio *et al.* 2281 (MO, QCNE); Loja-Zamora. Km 13, 2700 m, 18 de septiembre de 1961, Dodson y tien 668 (SEL); Yangana-Valladolid, km8, 2500 m, el 28 de febrero de 1985, Ollgaard *et al.* 58447 (UCA); Parque Nacional Podocarpus, Centro de información 04,05S 79.10W, 29 m, 15 de junio 1988 (Dodson, 2004).

Zamora Chinchipe: Parque Nacional Podocarpus, camino a mirador, 1000 m, 6 de septiembre de 1988 Madsen *et al.* 75285 (AUU); Loja - Zamora, por el sendero, 2700 m, 3 de agosto de 1982 Clemants 2286 (Nueva York); Yangana - Valladolid, a 3 km más allá de pase, 2700 m 2 de febrero de 1985, Harling & Andersson 21444 (AUU, AMES, QCA); Carretera Loja - Zamora, km 17, 03.59S 79,08W, 2400 m, 16 de abril 1973 Holm-Nielsen *et al.* 3607 (AUU, AMES). 99 individuos fueron analizados, 19 para la P1, para la P2 - 9 individuos, P3 - 8 individuos, P4 - 4 individuos, P5 - 4 individuos, P6 - 8 individuos, P7 - 11 individuos, P8 - 20 individuos, P9 - 16 individuos (Dodson, 2004).

2.1.3. Distribución de *Masdevallia deformis*.

Loja: Al norte del paso sur de Yangana, 2400m, 3 Mar.1982, Luer, 7103 (SEL).

Zamora: Entre Loja y Zamora, 2200 m, 19 de noviembre 1979, Luer, 4805 (SEL); Cordillera del Cóndor, Enero 1972, M Fiske sn (AMES); misma colección por M. Fiske, 27 de Septiembre 1977, Luer 1848 (SEL); por encima de Valladolid, 2450 m, 18 de marzo de 1984 Luer *et al.* 9566 (MO); 23 de marzo 1985, Luer *et al.* 10937 (MO); 2700 m, 4 de abril de 1985 Harling & Andersson 23660 (GB). 24 individuos fueron analizados, provenientes de 5 poblaciones, P1 - 6 individuos, P2 - 4 individuos, P3 - 12 individuos, P4 y P5 - 1 individuo (Dodson, 2004).

2.2. Extracción de ADN.

Se efectuó la extracción a partir de 48-50mg de muestra de las cuales se procedió a la trituración del tejido para romper membranas y células liberando el ADN para su fácil acceso con 2 bolas de tungsteno por cada muestra en un tubo de 2ml y mediante el Kit de extracción DNeasy de la marca Qiagen. La extracción realizada permitió obtener un ADN de buena calidad el cual fue cuantificando con el espectrofotómetro NanoDrop 2000. La calificación se efectuó mediante la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1% (50ml) teñido con Gel Red. Las observaciones fueron registradas mediante un sistema de foto documentación.

2.3. Amplificación de Regiones Genómicas (PCR).

Los primers cloroplásticos utilizados fueron: trnF fwd: (5'-CGAAATCGGTAGACGCTA-3') trnL rev: (5'-ATTTGAACTGGTGACACGA-3') (Taberlet P. *et al.*, 1991); rps16 fwd: (5'GTGCGACGTTGCTTTCTACC-3') trnQ rev : (5'-AGGTTCGAATCCTTYCGTC-3'); atpH fwd : (5'-CCAGCAGCAATAACRGAAGC-3') atpI (5'-TTCAAGCTCTTATTTTTGCAACKT-3') (Scarcelli N. *et al.*, 2011).

Utilizando como polimerasa la Gotaq DNA Polymerase de la Marca Promega y optimizando las unidades dentro de la reacción de PCR se logró la obtención de amplicones. La amplificación se realizó usando: reaction buffer 5x Green GoTaq 2.5ul, de dNTP's 0,5ul (10mM), por cada uno de los primers (Forward y Reverse) 0,4ul (25mM), de la GoTaq Polimerase 0.125ul (5u/ul), de H₂O destilada desionizada 2.325ul más 6.25ul de ADN trabajando así con un volumen final de 12.5ul y fueron corridas en el termociclador ABI-Veriti (Applied Biosystems) y TECHNE TC-312. Las condiciones de amplificación fueron:

Primer trnL-F

Desnaturalización Inicial	95°C - 1min	1 Ciclo
Desnaturalización Anillamiento Extensión	95°C - 30sec 54°C - 20sec; 52°C - 20sec; 50°C - 20sec 72°C - 1min	40Ciclos
Extensión Final	72°C - 7min	1 Ciclo

Primer AtpH-I

Desnaturalización Inicial	95°C - 1min	1 Ciclo
Desnaturalización Anillamiento Extensión	95°C - 30sec 59°C - 15sec; 58°C - 15sec; 56°C - 15sec 72°C - 1min	40Ciclos
Extensión Final	72°C - 7min	1 Ciclo

Primer trnQ-16

Desnaturalización Inicial	95°C - 1min	1 Ciclo
Desnaturalización Anillamiento Extensión	95°C - 30sec 64°C - 20sec; 62°C - 20sec; 60°C - 20sec 72°C - 1min	38 Ciclos
Extensión Final	72°C - 7min	1 Ciclo

Primer trnL-ndhJ

Desnaturalización Inicial	95°C - 1min	1 Ciclo
Desnaturalización Anillamiento Extensión	95°C - 30sec 56°C - 30seg; 55°C - 30seg; 54°C 30seg 72°C - 1min	40Ciclos
Extensión Final	72°C - 7min	1 Ciclo

Se evaluó la amplificación de las regiones genómicas mediante electroforesis en un Gel de agarosa al 1% más la solución de GelRed (50ml). Se tomaron 3ul del producto de PCR y 1.5ul de marcador molecular 100 bp DNA Ladder de la casa comercial Invitrogen de una dilución (1/5) que se preparó previamente. La migración de las muestras fue en buffer SB1X (Ácido Bórico de Sodio). Las condiciones durante la migración fueron 120V durante aproximadamente 3 minutos con 300mA luego se cambió el Voltaje a 95V durante 27min, esto para que el ADN penetre con fuerza el gel y luego migre lentamente permitiendo la separación de bandas.

2.4. Secuenciamiento.

Aquellos individuos que resultaron positivos fueron purificados con el Kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin de la casa comercial Promega

Se cuantificó los resultados con el NanoDrop y también fueron controladas en el gel de agarosa al 1% con solución GelRed (50ml). Para su posterior secuenciación en Macrogen (Corea)

2.5. Análisis Bioinformático.

Las secuencias obtenidas fueron revisadas en la base de datos de NCBI para detectar secuencias similares publicadas. Posteriormente fueron analizadas con Geneious 4.7.5. y alineadas con Mesquite (Figura 2). Seguido se procedió al análisis Neighbor-Joining utilizando Bio NJ de Sea View 4.2.8.

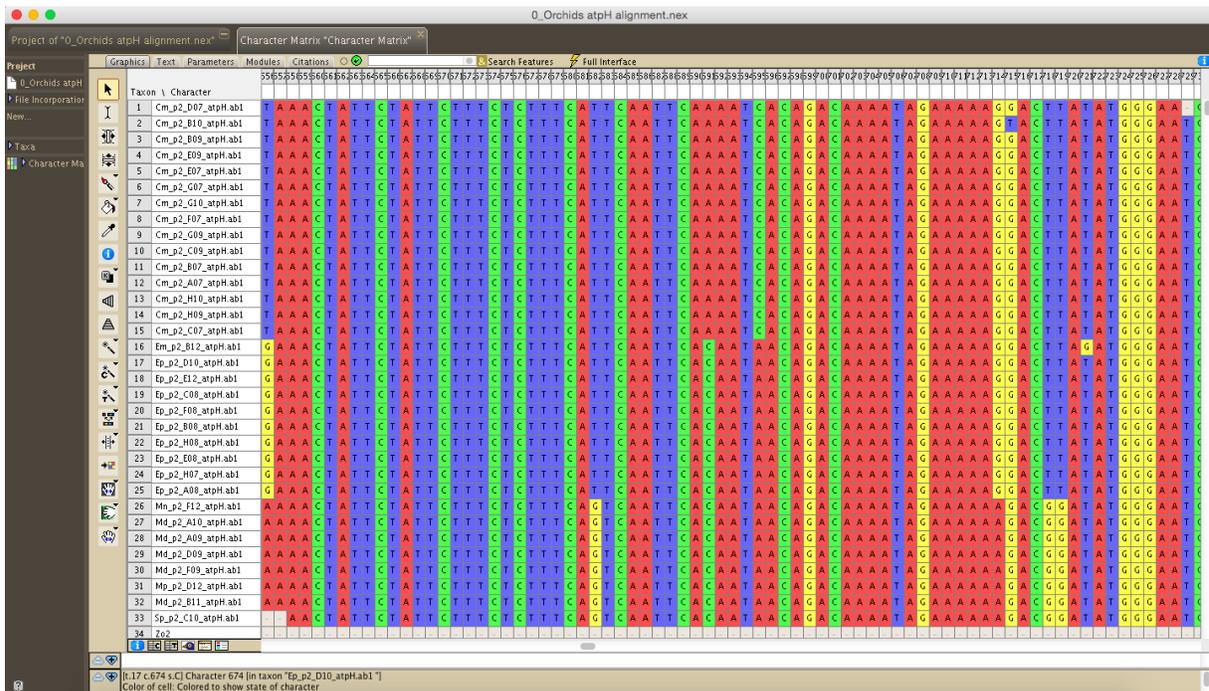


Figura 2. Captura de pantalla del software Mesquite, Alineación de secuencias de atpH-atpI.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dentro del presente trabajo de fin de titulación se extrajo ADN de 115 muestras: 23 muestras para *Epidendrum parviflorum*, 24 muestras para *Masdevallia deformis* y 68 muestras de *Cyrtochilum myanthum* (Anexo 2).

Se logró la amplificación de las regiones cloroplásticas obteniéndose 30 secuencias para la región atpH-atpl, 20 secuencias para trnQ-rps16 y 25 secuencias para trnL-trnF (todas ellas han sido enviadas y aceptadas en el GenBank y están en espera de recibir las accesiones correspondientes al momento de la redacción del artículo científico correspondiente). Para la región cloroplástica trnL-ndhJ no incluido como objetivo en el trabajo de fin de titulación se obtuvo también secuencias adecuadas (Anexo 3).

En el presente trabajo se analizaron un total de 4250 pares de bases de la región no codificante cloroplástica correspondiente a los espaciadores intergénicos: atpH-atpl, trnL-trnF, trnQ-rps16 y trnL-ndhJ.

El marcador rps16-trnQ, espaciador intergénico que se encuentra en la región LSC (1121 pares de bases) reveló una alta variabilidad y una extraordinaria riqueza en secuencias repetitivas SSRs (micro y minisatélites) alrededor de 6 secuencias repetitivas, que en el caso de la especie *Cyrtochilum myanthum* permitió establecer diferencias intraespecíficas. Para *Masdevallia deformis* se observan claramente dos grupos permitiendo establecer diferencias interespecíficas en poblaciones. *Epidendrum Parviflorum* reflejó homogeneidad para su secuencia en esta región genómica (Figura 3).

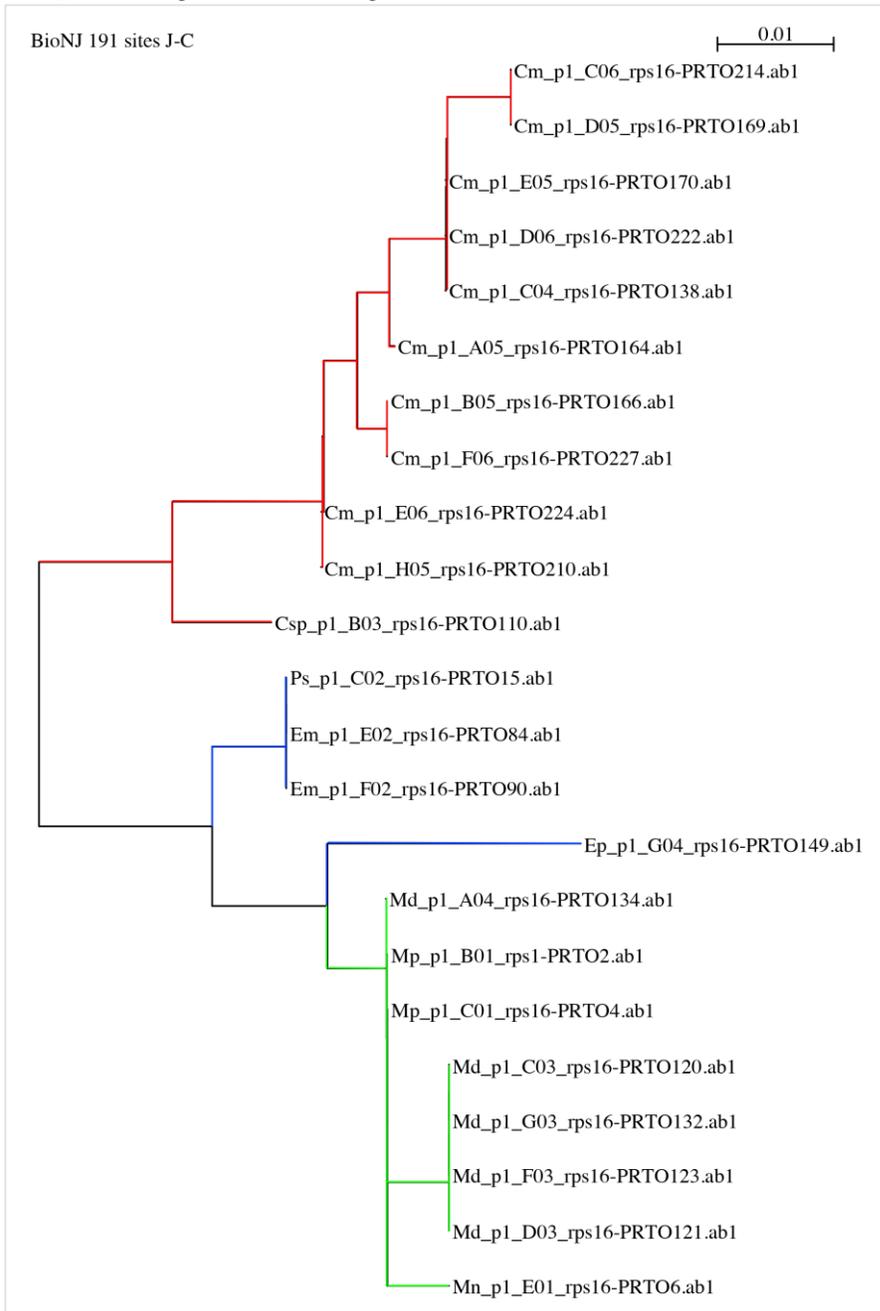


Figura 3. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas rps16-trnQ.

La secuencia del espaciador intergénico atpH-atpI que se encuentra en la región LSC (921 pares de bases) reveló ser igualmente rica en micro y minisatélites así como en sustituciones nucleotídicas. La especie *Masdevallia deformis* presentó una alta variabilidad en esta región cloroplástica demostrando una extraordinaria diferenciación interespecífica. Apreciación que no se pudo aplicar en las especies *Cyrtochilum*

myanthum y *Epidendrum parviflorum* donde no se puede apreciar diferenciación intraespecífica (Figura 4).

BioNJ_tree Mon Aug 4 08:09:30 2014 Page 1 of 1

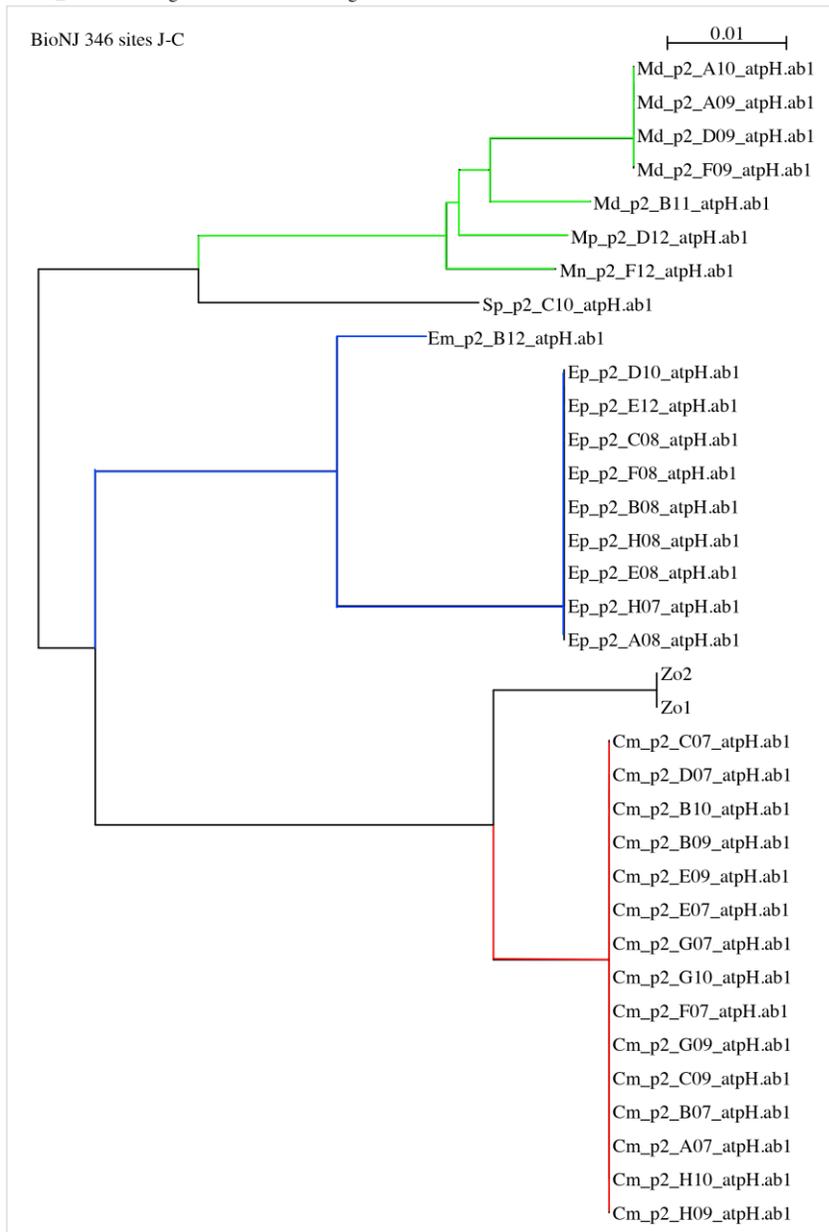


Figura 4. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas atpH-atpI.

El espaciador intergénico trnL-trnF (1152 pares de bases) reveló una extraordinaria variación a nivel intergénico basada en la ausencia de una zona de 170 pares de bases en especies de género *Epidendrum*. *Cyrtochilum myanthum* presentó variabilidad en referencia a las otras especies (Figura 5).

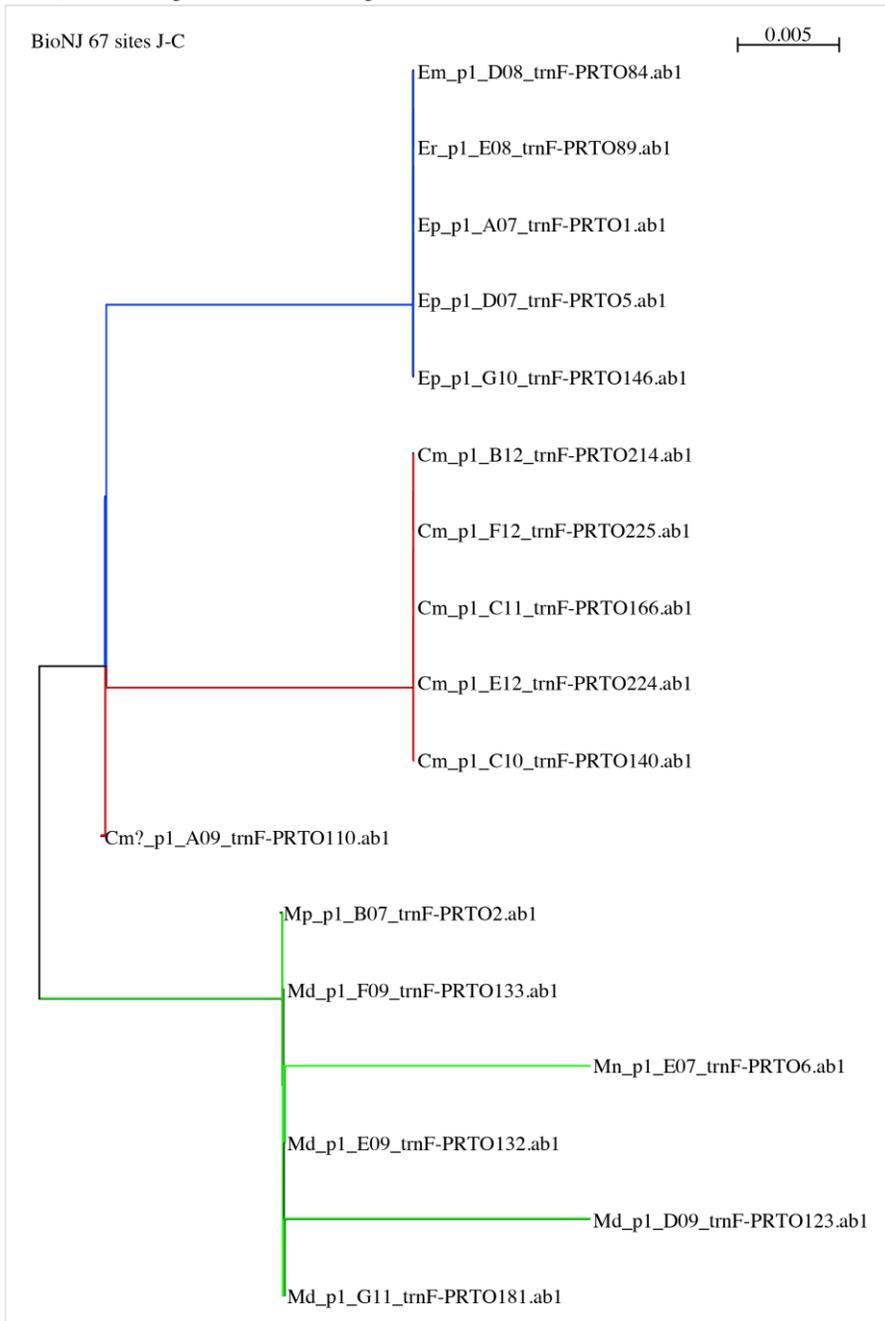


Figura 5. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas trnL-trnF.

El marcador trnL-ndhJ (754 pares de bases) de igual manera presentó una alta variabilidad intraespecífica basada en la presencia de secuencias repetitivas así como de sustituciones nucleotídicas. Por el contrario, al interior de las especies analizadas (variación intraespecífica) no se observa variabilidad en las secuencias (Figura 6).

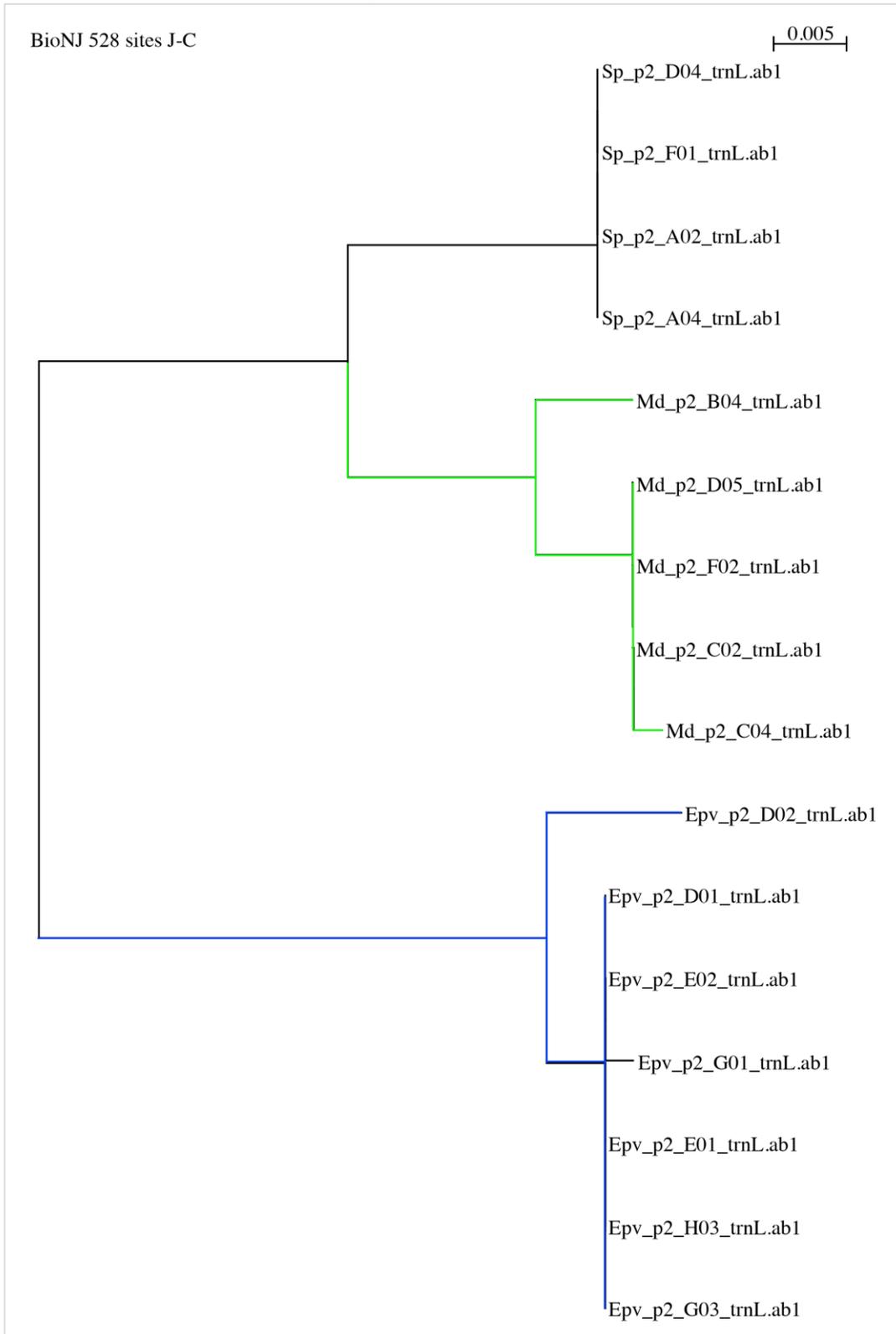


Figura 6. Análisis NJ de secuencias cloroplásticas trnL-ndhJ.

Al determinar la estructura genética de las especies podemos concluir que con *Cyrtochilum myanthum* se determinaron 5 grupos genéticos para el marcador trnQ-rps16 y 1 grupo genético para el marcador atpH-atpl y el marcador trnL-trnF lo que permitió establecer diferencias intraespecíficas. En *Epidendrum parviflorum* se obtuvo un grupo genético para los marcadores trnQ-rps16; atpH-atpl y trnL-trnF por lo tanto estos marcadores no permiten determinar variación intraespecífica, sin embargo hubo variaciones para el marcador trnL-ndhJ donde se puede apreciar 2 grupos genéticos. Con la especie *Masdevallia deformis* se identificaron 2 grupos para todos los marcadores analizados.

Tabla 1. Tabla de grupos genéticos de las regiones cloroplásticas analizadas por especie.

Grupos Genéticos	C. myanthum	E. parviflorum	M. deformis
trnQ-rps16	5 grupos	1 grupo	2 grupos
atpH-atpl	1 grupo	1 grupo	2 grupos
trnL-trnF	1 grupo	1 grupo	2 grupos
trnL-ndhJ	-	2 grupos	2 grupos

Para dar respuesta al tercer objetivo específico, el monitoreo de la evolución de las regiones genómicas se analizaron las secuencias simples repetitivas (SSRs), las inserciones y deleciones (Indels) y las sustituciones nucleotídicas obteniendo lo siguiente:

Secuencias Simples Repetitivas (SSRs).

La función y el origen de SSRs en el genoma del cloroplasto no se comprende en su totalidad. Sin embargo, el comportamiento de estos marcadores podría proporcionar información útil sobre la genética de poblaciones en plantas (Powell, 1995 Echt *et al.*, 1998).

La identificación de las secuencias repetitivas en el presente estudio, se la realizó mediante la alineación de las secuencias de las regiones cloroplásticas usando Mesquite. El número de secuencias repetitivas presentes en las regiones estudiadas en *C. myanthum* y *E. parviflorum* fue mayor en comparación a *M. deformis* cuyo genoma cloroplástico resultó pobre en SSRs para los marcadores analizados (Tabla 2).

Para *C. myanthum* se detectó 13 SSRs: tres para atpH-atpl, cuatro para trnQ-rps16, seis en trnL-trnF y tres para trnL-ndhJ demostrando así que la diversidad de regiones repetitivas entre marcadores es alta en *C. myanthum*, información valiosa en el presente

estudio útil para dilucidar la estructura y variabilidad genética de las especies en estudio (Dong-Keun Yi *et al.*, 2012) (Tabla 2).

E. parviflorum presentó un número igual de SSRs que *C. myanthum* pero a diferencia de éste, la diversidad de regiones repetitivas entre marcadores fue relativamente baja. En esta especie se detectó el número más alto de SSRs para atpH-atpI (4 SSR). Además se registró dos SSRs para trnQ-rps16, cuatro para trnL-trnF y tres para trnL-ndhJ (Tabla 2).

Varias de las regiones cloroplásticas en estudio resultaron ser ricas en cadenas de repeticiones de mononucleótidos y/o pequeñas unidades de repeticiones en tándem que son probablemente el resultado de slipped-strand mispairing (Levinson & Gutman, 1987). Según el modelo propuesto por Streisinger esto se debe a la gran cantidad de SSR en las secuencias analizadas aportando con información útil para ayudar a esclarecer relaciones evolutivas dentro de la familia Orchidaceae (Liu Y. *et al.*, 2013; Wu CS. *et al.*, 2011).

Se observó similitud de dos SSR en todos los primers presentes en todas las especies: TTTTTT – AAAAAA obteniendo similares resultados a un estudio realizado por Dong-Keun Yi *et al.* (2012). Sin embargo trnQ-rps16 fue el marcador cloroplástico que presentó una alta riqueza en secuencias repetitivas.

El genoma del cloroplasto es rico en porciones mono o polinucleótidas que pueden resultar útiles en estudios de evolución del mismo.

Tabla 2. Tabla de SSR de las regiones cloroplásticas analizadas por especie.

Cebador o primer	Posición pb	Secuencia SSR	Especies		
			<i>C. myanthum</i>	<i>E. parviflorum</i>	<i>M. deformis</i>
atpH - atpI	289 a 299	AACCAACCAA	x	x	x
	753 a 760	AAAAAAA	x		x
	880 a 888	TTTTTTTTT		x	
	1020 a 1031	CCAAATTCCAAATT		x	
	1073 a 1079	ATATATA	x	x	x
	1135 a 1140	CCCCC			x
trnQ - rps16	574 a 581	ATAATAAT			x
	664 a 669	TTTTTT		x	
	719 a 731	AAAAAAAAAAAAA	x	x	x
	873 a 884	TTGACTTGACTT	x		
	1140 a 1144	TTTTTT	x		
	1621 a 1628	ATTATTAT	x		
trnL - trnF	111 a 116	AAAAAA	X	x	
	98 a 105	TTTTTTTTT	X		
	263 a 268	TATATA	X	x	x

	606 a 612 - 661 a 666	AAAAAA	X	x	
	758 a 764	TTTTTTT	X		
	801 a 808	AGAGAGAG	X	x	x
trnL - ndhJ	205 a 211	TTTTTTTTT		x	x
	600 a 6006	ATATATA		x	
	653 a 657	AAAAAA		x	

Inserciones y deleciones (Indels).

Para las especies estudiadas, se identificó un total de 59 indels en las regiones cloroplásticas analizadas: 27 para atpH-atpI (13 inserciones y 14 deleciones), 17 en trnQ-rps16 (6 inserciones y 11 deleciones), 12 para trnL-trnF (6 inserciones y 6 deleciones) y solo 3 inserciones para trnL-ndhJ (Tabla 3).

La mayoría de estos indels (45.76%) se presentaron en la región cloroplástica atpH-atpI, mientras que el 28.81% se localizaron en trnQ-rps16, 20.33% en trnL-trnF y tan solo 5.08% en trnL-ndhJ (Figura 7).

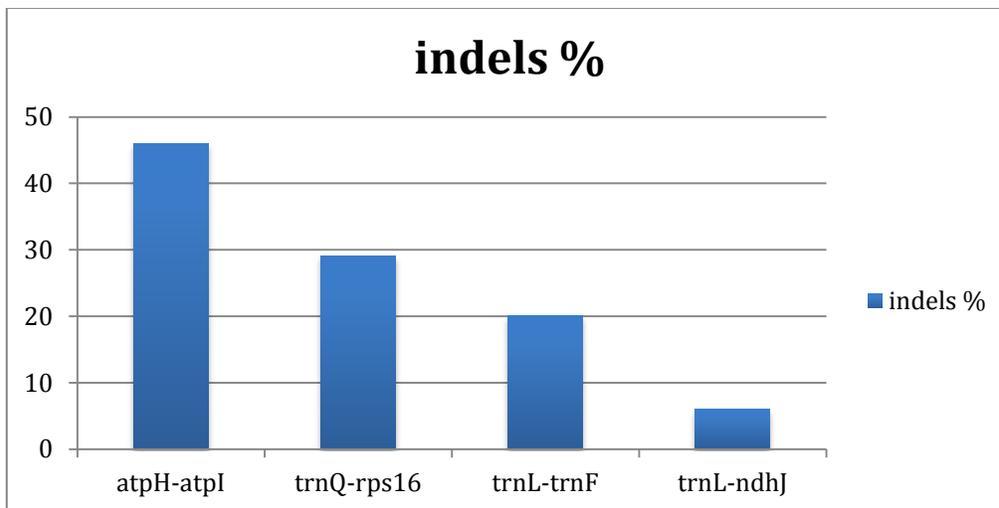


Figura 7. Porcentaje de indels en los marcadores cloroplásticos analizados.

Todos los indels registrados no fueron mayores a 10 bp de longitud. Resultados similares al estudio de Dong-KeunYiet *al.*2012. donde el 85% de SSR no fueron mayores a 10 bp de longitud y se concentraron en las regiones LSC y SSC del genoma cloroplástico, esto originado probablemente por mecanismos de slipped-strand mispairing durante la replicación de cpDNA.

Tabla 3. Tabla de indels de las regiones cloroplásticas analizadas por especie.

atpH - atpI								
Especie	Inserciones							
<i>C. myanthum</i>	C – 890	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. parviflorum</i>	T – 447	G - 499	T - 985-987-989-992	G - 988-991-994	A - 986-990-993	-	-	-
<i>M. deformis</i>	G - 467	G - 468 a 471	T - 472	C - 473-474	G - 499	A - 736	T - 975	-
Especie	Delecciones							
<i>C. myanthum</i>	A – 760	C - 879	A - 972 – 974	C - 971	T - 973	(C) 1027-1028-1034	A - 1029-1030	T - 1033-1035
<i>E. parviflorum</i>	A - 613-615-617-619	T - 614-618-621	G - 616	C-T - 1140	-	-	-	-
<i>M. deformis</i>	T - 1057-1069-1070	C - 1058	-	-	-	-	-	-
trnQ - rps16								
Especie	Inserciones							
<i>C. myanthum</i>	G – 849	A - 850 a 852	T - 872 a 874	C - 870-871	G - 869	-	-	-
<i>M. deformis</i>	T - 931-932	-	-	-	-	-	-	-
Especie	Delecciones							
<i>C. myanthum</i>	A - 798-800 a 8002	C - 797	T – 799	-	-	-	-	-
<i>E. parviflorum</i>	A - 832 a 834 - 836 a 841	G - 842	T - 830-846	-	-	-	-	-
<i>M. deformis</i>	A – 731	A - 860 a 866	T - 934 a 937	T - 945 a 947	C - 944-957-962	-	-	-
trnL – trnF								
Especie	Inserciones							
<i>C. myanthum</i>	T - 268	A - 332	-	-	-	-	-	-
<i>E. parviflorum</i>	A- 201	C - 263-265	-	-	-	-	-	-
<i>M. deformis</i>	G - 176	T - 328	-	-	-	-	-	-
Especie	Delecciones							
<i>C. myanthum</i>	T - 156 a 159	C - 170	-	-	-	-	-	-
<i>E. parviflorum</i>	T - 156 a 159	C - 170	-	-	-	-	-	-
<i>M. deformis</i>	T - 156 a 159	C - 170	-	-	-	-	-	-
trnL – ndhJ								
Especie	Inserciones							
<i>E. parviflorum</i>	C - 218	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. deformis</i>	T - 204	A - 245	-	-	-	-	-	-

Sustituciones Nucleotídicas

La identificación de las sustituciones nucleotídicas se realizó mediante la alineación de las secuencias obtenidas en Mesquite obteniendo como resultado un total de 93 sustituciones nucleotídicas: 24 para atpH-atpl, 18 para trnQ-rps16, 38 para trnL-trnF y 13 para trnL-ndhJ (Tabla 4).

Los resultados revelaron que la región trnL-trnF es la menos conservada en sustitución de bases nucleotídicas en comparación con las otras regiones. La relación de diferencia entre todas las regiones en estudio fue consistente, las proporciones fueron de 25:20:40:15 aproximadamente, estos datos indican que las regiones atpH-atpl, trnQ-rps16 y trnL-ndhJ cambian ligeramente más lento que la región trnL-trnF. Resultados que demostraron que la región LSC posee una tasa de sustitución nucleotídica más alta que IR pero similar a SSC (Dong-Keun Yi *et al.*, 2012).

En cuanto a las especies *M. deformis* resultó ser la especie con más sustituciones nucleotídicas con un total de 36 información crucial al momento de establecer estrategias de conservación debido a su alta variabilidad de secuencias y el estado de esta especie como endémica, seguida por *C. myanthum* con 31 y 26 para *E. parviflorum*.

Indels vs. sustituciones nucleotídicas.

En general, las sustituciones nucleotídicas representan el 61% de los polimorfismos, mientras que indels representan el 39% (Figura 8).

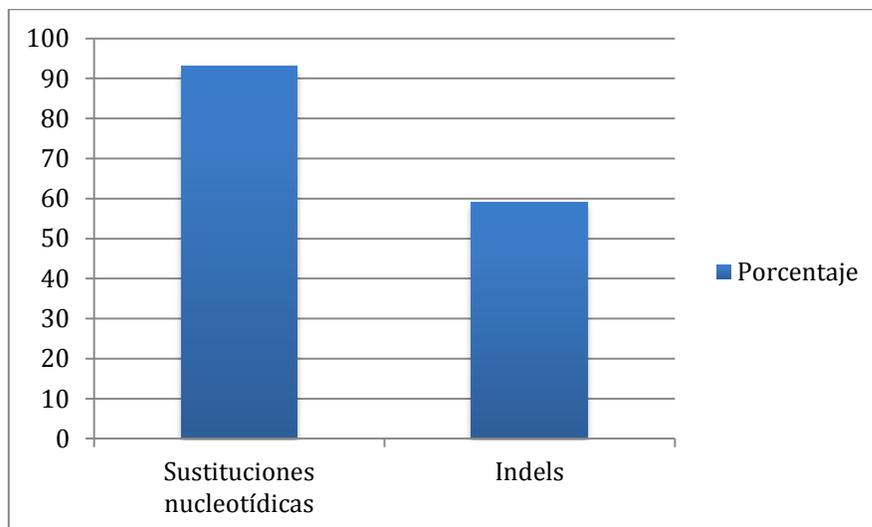


Figura 8. Porcentaje de polimorfismos obtenidos.

Este estudio presenta un conjunto de datos importantes al comparar las cantidades relativas de indels y sustituciones nucleotídicas lo que entra en conflicto con la hipótesis de Clegg *et al.*, (1994); quienes sostienen que pueden ocurrir indels con más frecuencia que las sustituciones nucleotídicas, mientras que Gielly y Taberlet 1994 sugieren que tanto indels se producen con las misma frecuencia que las sustituciones nucleotídicas. Los resultados obtenidos en el presente estudio estarían sustentando el postulado de Small *et al.*, (1998) que sugieren que las sustituciones de nucleótidos representan alrededor del 70% y los indels representan alrededor del 30% de todas las mutaciones en el genoma cloroplástico.

Los análisis realizados permiten determinar que de las tres especies en estudio la que presenta menor cantidad de grupos genéticos es la especie *Masdevallia Deformis* y *Epidendrum Parviflorum*. Adicionalmente *Masdevallia deformis* presenta mayor cantidad de sustituciones nucleotídicas. Según Provan *et al.* (2004) sugiere que los SSR, la sustitución de bases nucleotídicas y los indels son herramientas emergentes para el análisis de alta resolución de la variación inter e intraespecífica en regiones no codificantes de genoma cloroplástico y desde este punto de vista es claro que la especie *Masdevallia deformis* es la más pobre en sus capacidades genómicas por lo cual se recomienda establecer estrategias de protección y conservación para la misma.

Tabla 4. Substituciones nucleotídicas determinadas por marcador y por especie.

atpH - atpI														
C. Plato	Muestra	Especie	Pobl	Sustitución										
P2-E07	PRTO224	<i>C. myanthum</i>	P2	616 T-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-B10	PRTO163	<i>C. myanthum</i>	P4	628 A-G	715 T-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-D07	PRTO222	<i>C. myanthum</i>	P2	630 A-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-B09	PRTO170	<i>C. myanthum</i>	P1	963 G-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2G07	PRTO217	<i>C. myanthum</i>	P1	963 G-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-D12	PRTO004	<i>M. deformis</i>		343 A-C	978 G-T	1001 A-C	1106 A-C	1020 C-A	1124 A-G	1142 C-T	1157 A-G	-	-	-
P2-B11	PRTO134	<i>M. deformis</i>	P2	531 C-A	492 C-A	976 G-A	978 G-T	1001 A-C	1020 C-A	1124 A-G	1142 C-T	1196 G-T	-	-
P2-A10	PRTO133	<i>M. deformis</i>	P2	748 T-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trnQ - rps16														
C. Plato	Muestra	Especie	Pobl	Sustitución										
P1-A05	PRTO164	<i>C. myanthum</i>	P1	527 A-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-E06	PRTO224	<i>C. myanthum</i>	P2	527 A-G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-H05	PRTO210	<i>C. myanthum</i>	P1	527 A-G	858 A-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-C06	PRTO214	<i>C. myanthum</i>	P1	571 C-T	576 C-A	858 A-C	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-D05	PRTO169	<i>C. myanthum</i>	P1	571 C-T	576 C-A	1258 G-C	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-B05	PRTO166	<i>C. myanthum</i>	P1	858 A-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-F06	PRTO227	<i>C. myanthum</i>	P2	858 A-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-A04	PRTO134	<i>M. deformis</i>	P2	602 G-A	644 G-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-B01	PRTO002	<i>M. deformis</i>		602 G-A	645 C-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-C01	PRTO004	<i>M. deformis</i>		602 G-A	645 C-A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trnL - trnF														
C. Plato	Muestra	Especie	Pobl	Sustitución										
P1-A07	PRTO001	<i>E. parviflorum</i>	P1	999 A-G	1006 C-T	1035 C-T	1055 C-G	1001 G-C	-	-	-	-	-	-
P1-G10	PRTO146	<i>E. parviflorum</i>	P2	999 A-G	1006 C-T	1035 C-T	1055 C-G	1001 T-C	1109 C-T	1150 G-A	1177 T-G	1223 A-G	1258 C-A	1301 A-G
P2-G01	PRTO199	<i>E. parviflorum</i>	P1	1056 A-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-D09	PRTO123	<i>M. deformis</i>	P1	277 A-G	958 G-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-B04	PRTO134	<i>M. deformis</i>	P2	937 C-A	962 C-T	992 T-G	1074 G-T	1085 G-T	1128 C-A	1149 C-T	1318 A-G	1474 A-G	1553 T-G	-
P2C02	PRTO234	<i>M. deformis</i>	P4	942 C-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1-A09	PRTO110	<i>C. myanthum</i>	P7	101 G-T	108 T-G	118 T-G	143 G-T	298 G-A	411 T-G	592 A-C	-	-	-	-
P1-C10	PRTO140	<i>C. myanthum</i>	P3	481 A-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trnL - ndhJ														
C. Plato	Muestra	Especie	Pobl	Sustitución										
P2-G01	PRTO199	<i>E. parviflorum</i>	P1	175 A-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-D02	PRTO146	<i>E. parviflorum</i>	P2	294 T-G	339 A-G	371 C-A	414 A-G	658 C-A	700 A-G	724 A-C	743 T-C	-	-	-
P2-C02	PRTO234	<i>M. deformis</i>	P4	71 C-T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2-D05	PRTO184	<i>M. deformis</i>	P3	114 T-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2F02	PRTO181	<i>M. deformis</i>	P3	114 T-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P2C04	PRTO121	<i>M. deformis</i>	P1	705 A-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONCLUSIONES

El genoma del cloroplasto es una herramienta importante para estudios genéticos en plantas (Chang CC. *et al.*, 2006; Nock CJ. *et al.*, 2011; Samson N. *et al.*, 2007). Gracias al estudio de Taberlet *et al.* 1991 la amplificación de secuencias de ADN del cloroplasto mediante primers universales en una amplia gama taxonómica ha permitido estudiar la biología de poblaciones y filogenias intraespecíficas en algas, briófitos, pteridofita, gimnospermas y en el presente estudio inclusive las angiospermas. Por lo tanto, la universalidad de estos primers así como los propuestos por el grupo de Pintaud (Scarcelli *et al.*, 2011) fue confirmada en este trabajo: los pares de primers utilizados atpH-atpI, trnQ-rps16, trnL-trnF, trnL-ndhJ lograron amplificar exitosamente. Además los marcadores escogidos resultaron ser altamente informativos desde el punto de vista filogenético y permitieron identificar claramente géneros y especies.

Desde el punto de vista de variabilidad unos fueron más informativos que otros; en el caso de trnQ-rps16 éste presentó una extraordinaria variabilidad entre las secuencias analizadas y una alta riqueza en microsatélites lo que permitió establecer diferencias intraespecíficas.

En el caso de trnL-trnF las secuencias obtenidas para especies del género *Epidendrum* exhibieron una importante delección de 170 pares de bases.

En lo referente a la evolución genómica hemos accedido a una zona donde importantes eventos de dinamismo genómico tienen lugar.

La obtención de las secuencias de ADN cloroplástico de estas especies ofrece una gran oportunidad para la comprensión no solo de la evolución del genoma del cloroplasto, sino también de la diversidad genética de las especies al momento de establecer estrategias de conservación, Al ser *Masdevallia deformis* las más pobre en sus capacidades genómicas es necesario establecer estrategias emergentes de conservación para el mantenimiento de la variabilidad genética en las poblaciones

RECOMENDACIONES

Las recomendaciones a formular después de los resultados obtenidos de este componente son las de incrementar el número de secuencias analizadas positivas obtenidas por la técnica de PCR en cada una de las poblaciones de las especie analizadas y establecer de inmediato medidas de protección para *Masdevallia deformis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrett, C.F., Davis JI. (2012). The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. *Am J Bot* 99: 1513–1523.
- Beaman, T.F., Wood, J.J., Beaman, R.S. and Beaman, J.H. (2001). *Orchids of Sarawak*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah and Royal Botanic Gardens, Kew.
- Cao, Q-q., Zhen, Z., Jiang, J., Liu, Y-f., Feng, Y-q., Qin L. (2008). Chloroplast DNA analysis technology and its application in *Castanea*. *J Fruit Sci*. 25:396-399.
- Chang, C.C., Lin, H.C, Lin, I., Chow, T.Y., Chen, H.H, *et al.* (2006). The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. *Mol Biol Evol* 23: 279–291.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V., (2003). DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KWKS, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo). pp 69–89.
- Chase, M.W. (2005). Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Bot Mag* 22: 2–7.
- Chase, M.W., Palmer, J.D. (1989). Chloroplast DNA systematics of lilioid monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *Amer J Bot* 76:1720-1730.
- Chase, M.W. (2001). The origin and biogeography of Orchidaceae. In Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase M.W. and Rasmussen, F. eds. *Genera orchidacearum, Vol. II: Orchidoideae (part I)*. pp. 1-5. Oxford University Press, Oxford.
- Clegg, M., Gaut, B. S., Learn J.R., and Morton, B. R. (1994). Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 6795–6801.
- Dodson, C. (2005). *Native Ecuadorian Orchids*. Vol IV. pp. 66.
- Dodson, C., Luer, C., Romero, G., (2004). *Orchids of Ecuador*. For personal use only, do not circulate without permission of the authors. Version 2004-1.

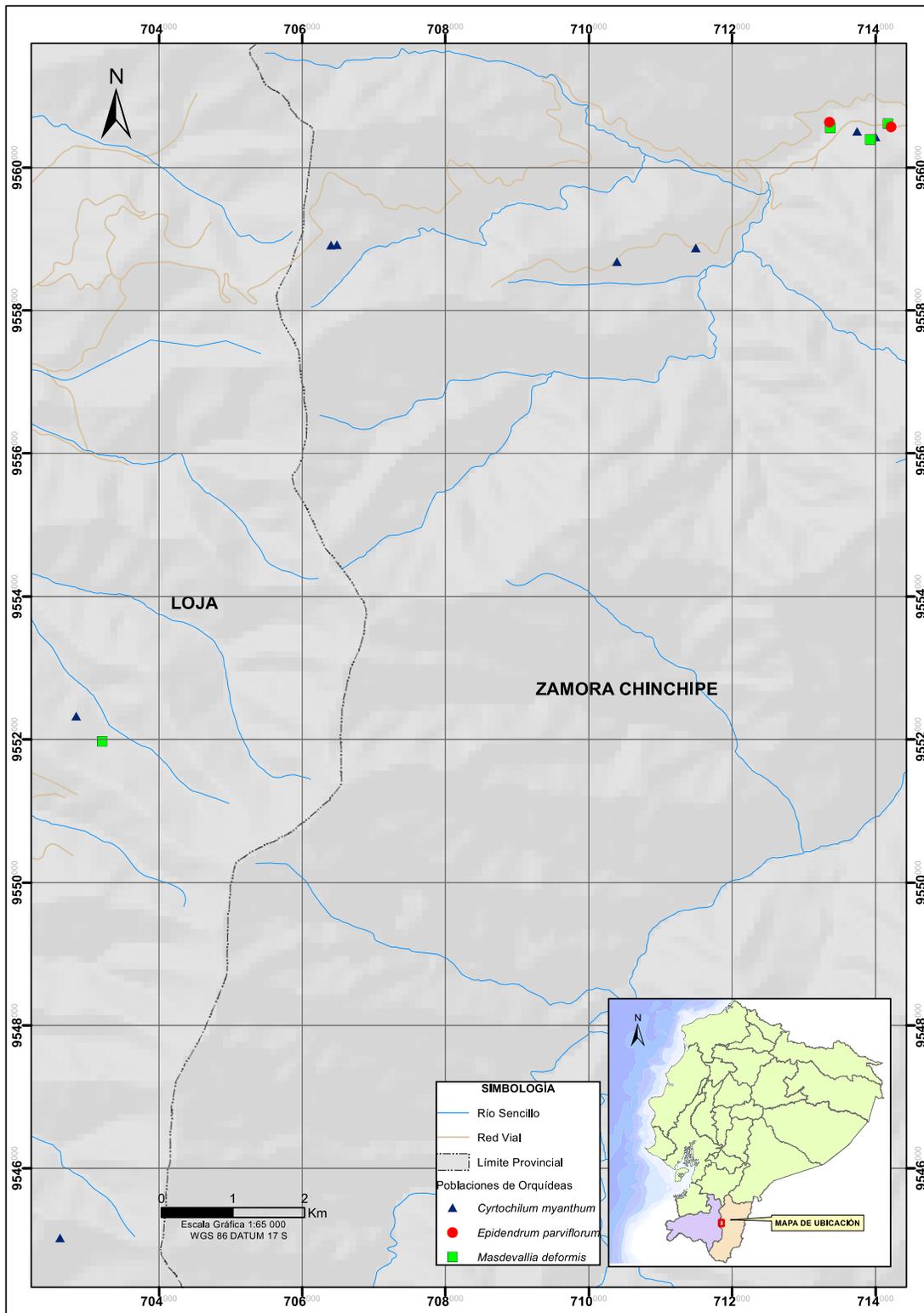
- Dong-Keun, Yi., Hae-Lim, Lee., Byung-Yun, Sun., Mi-Yoon, Chung., Ki-Joong. (2012). The Complete Chloroplast DNA Sequence of *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae); Comparative Evolutionary Analyses with Other Three Asterids. *Molecules and Cells*.
- Echt, C.S., DeVerno, L.L., Anzidei, M., and Vendramin, G.G. (1998). Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa* Ait. *Mol. Ecol.* 7, 307-316.
- Endara, L., León, S. (2007). Patrones de Endemismo de la Flora Endémica de Orquídeas Ecuatorianas. Second Scientific Conference on Andean Orchids. pp. 34.
- Gielly, L., & Taberlet, P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 769–777.
- Green, B.R. (2011) Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J* 66: 34–44.
- Meisel, J., and Woodward, C. (2005). Andean orchid conservation and the role of private lands: A case study from Ecuador. *Proceedings of the International Orchid Conservation Congress, May 12-16, 2004. Selbyana special issue.*
- Jorgensen, P., & León-Yáñez, S. (1999). *Catálogo de plantas vasculares del Ecuador.* Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Levinson, G., & Gutman, A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* 4: 203–221.
- Lilly, J. W., Havey, M. J., Jackson, S. A. and Jiang, J. (2001). Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants, *Plant Cell*, 13, 245 – 254.
- Linington, S., & Pritchard, H.W. (2001). Gene Banks. *Encyclopedia of Biodiversity.* Academic Press. Vol. 3: 165-181.
- Liu, Y., Huo, N., Dong, L., Wang, Y., Zhang, S., *et al.* (2013). Complete Chloroplast Genome Sequences of Mongolia medicine *Artemisia frigida* and Phylogenetic Relationships with Other Plants. *PLoS One* 8: e57533.
- Morton, B.R., & M.T. Clegg. (1993). A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcL* in the grass family (Poaceae). *Current Genetics* 24: 357–365.

- Nock, C.J, Waters, D.L, Edwards, M.A., Bowen, S.G., Rice, N., *et al.* (2011). Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification. *Plant Biotechnol J* 9: 328–333.
- Olmstead, R. G., & J. D. Palmer. (1994). Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany* 81: 1205–1224.
- Pan, I.C., Liao, D.C., Wu F.H., Daniell, H., Singh, N.D., *et al.* (2012). Complete Chloroplast Genome Sequence of an Orchid Model Plant Candidate: *Erycina pusilla*
- Perry, A. S., and K. H. Wolfe. (2002). Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *Journal of Molecular Evolution* 55: 501–508.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Mcnicol, J.W., Machray, G.C., Doyle, J.J., Tingey, S.V., and Rafalski, J.A. (1995). Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Curr. Biol.* 5, 1023-1029.
- Raubeson, L.A., Jansen, R.K. (2005). Chloroplast genomes of plants. In: Henry RJ, editor. *Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants.* Cambridge: CAB International. pp. 45–68.
- Royal Botanic Garden, Kew. Science & Horticulture. What are orchids. *Major Groups, Families and Genera: Orchidaceae.* Consultado el 7/3/2009.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., MuUisKB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487—491.
- Samson, N., Bausher, M.G., Lee, S.B., Jansen, R.K., Daniell, H. (2007). The complete nucleotide sequence of the coffee (*Coffea arabica* L.) chloroplast genome: organization and implications for biotechnology and phylogenetic relationships amongst angiosperms. *Plant Biotechnol J* 5: 339–353.
- Shaw, J., Lickey, E., Schilling, E. and Small, R. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94(3): 275-288.
- Shaw, J., and R. L. Small. (2005). Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*, Rosaceae). *American Journal of Botany* 92: 2011–2030.
- Simpson, M. G. (2006). *Plant systematics* . Academic Press, Amsterdam.

- Small R. L., J. A. Ryburn R. C. Cronn T. Seelanan and J. F. Wendel (1998). The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* 85: 1301–1315.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Tien, X., Li, D.Z. (2002). Application of DNA sequences in plant phylogenetic study. *Acta Bot Yunnan* 24: 170–184.
- Webster, P. (1992). *Oncidium subtribe*. In *The Orchid Genus Book* Hunters Breeze, USA.
- Wu, C.S., Lin, C.P., Hsu, C.Y., Wang, R.J., Chaw, S.M. (2011). Comparative chloroplast genomes of Pinaceae: insights into the mechanism of diversified genomic organizations. *Genome Biol Evol* 3: 309–319.
- Wu, F.H., Chan, M.T., Liao, D.C., Hsu, C.T., Lee, Y.W., *et al.* (2010). Complete chloroplast genome of *Oncidium Gower Ramsey* and evaluation of molecular markers for identification and breeding in *Oncidiinae*. *BMC Plant Biol* 10:68-80.
- Yang, J.B., Tang, M., Li, H.T., Zhang, Z.R., Li, D.Z. (2013). Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. *BMC Evol Biol* 13: 84.

ANEXOS

Anexo 1: Mapa de poblaciones de especies



Anexo 2: Tabla de extracción de ADN.

Muestra	Especie	Pobl.	Con.	Muestra	Especie	Pobl.	Con.	Muestra	Especie	Pobl.	Con.
PRTO001	<i>E. parviflorum</i>	P1	9.8 ng/ul	PRTO158	<i>E. parviflorum</i>	P2	5.1 ng/ul	PRTO203	<i>C. myanthum</i>	P7	4.3 ng/ul
PRTO005	<i>E. parviflorum</i>	P1	10.8 ng/ul	PRTO162	<i>E. parviflorum</i>	P2	6.7 ng/ul	PRTO204	<i>C. myanthum</i>	P7	3.7 ng/ul
PRTO102	<i>C. myanthum</i>	P7	6.2 ng/ul	PRTO163	<i>C. myanthum</i>	P4	6.3 ng/ul	PRTO205	<i>C. myanthum</i>	P7	10.1 ng/ul
PRTO103	<i>C. myanthum</i>	P7	15.7 ng/ul	PRTO164	<i>C. myanthum</i>	P1	6.7 ng/ul	PRTO206	<i>C. myanthum</i>	P7	4.2 ng/ul
PRTO109	<i>C. myanthum</i>	P7	4.2 ng/ul	PRTO166	<i>C. myanthum</i>	P1	4.8 ng/ul	PRTO213	<i>C. myanthum</i>	P1	4.0 ng/ul
PRTO110	<i>C. myanthum</i>	P7	8.4 ng/ul	PRTO168	<i>C. myanthum</i>	P1	10.4 ng/ul	PRTO214	<i>C. myanthum</i>	P1	5.8 ng/ul
PRTO120	<i>M. deformis</i>	P1	11.7 ng/ul	PRTO169	<i>C. myanthum</i>	P1	8.9 ng/ul	PRTO217	<i>C. myanthum</i>	P1	10.5 ng/ul
PRTO121	<i>M. deformis</i>	P1	13.6 ng/ul	PRTO170	<i>C. myanthum</i>	P1	15.7 ng/ul	PRTO220	<i>C. myanthum</i>	P1	3.7 ng/ul
PRTO122	<i>M. deformis</i>	P1	4.6 ng/ul	PRTO171	<i>C. myanthum</i>	P6	4.9 ng/ul	PRTO222	<i>C. myanthum</i>	P2	4.2 0.20
PRTO123	<i>M. deformis</i>	P1	5.7 ng/ul	PRTO173	<i>C. myanthum</i>	P6	2.8 ng/ul	PRTO223	<i>C. myanthum</i>	P2	16.8 ng/ul
PRTO125	<i>M. deformis</i>	P1	2.9 ng/ul	PRTO175	<i>C. myanthum</i>	P6	2.4 ng/ul	PRTO224	<i>C. myanthum</i>	P2	7.0 ng/ul
PRTO132	<i>M. deformis</i>	P2	5.3 ng/ul	PRTO176	<i>E. parviflorum</i>	P2	2.7 ng/ul	PRTO225	<i>C. myanthum</i>	P2	10.1 ng/ul
PRTO133	<i>M. deformis</i>	P2	5.5 ng/ul	PRTO177	<i>C. myanthum</i>	P5	3.7 ng/ul	PRTO231	<i>C. myanthum</i>	P6	22.7 ng/ul
PRTO134	<i>M. deformis</i>	P2	2.8 ng/ul	PRTO178	<i>C. myanthum</i>	P5	3.5 ng/ul	PRTO233	<i>C. myanthum</i>	P6	9.5 ng/ul
PRTO135	<i>M. deformis</i>	P2	5.1 ng/ul	PRTO179	<i>C. myanthum</i>	P5	2.3 ng/ul	PRTO234	<i>M. deformis</i>	P4	3.4 ng/ul
PRTO136	<i>C. myanthum</i>	P3	3.7 ng/ul	PRTO180	<i>C. myanthum</i>	P5	3.1 ng/ul	PRTO235	<i>C. myanthum</i>	P8	3.9 ng/ul
PRTO138	<i>C. myanthum</i>	P3	6.4 ng/ul	PRTO181	<i>M. deformis</i>	P3	3.7 ng/ul	PRTO236	<i>C. myanthum</i>	P8	3.7 ng/ul
PRTO139	<i>C. myanthum</i>	P3	7.7 ng/ul	PRTO182	<i>M. deformis</i>	P3	3.8 ng/ul	PRTO237	<i>C. myanthum</i>	P8	4.7 ng/ul
PRTO140	<i>C. myanthum</i>	P3	4.0 ng/ul	PRTO183	<i>M. deformis</i>	P3	3.7 ng/ul	PRTO238	<i>C. myanthum</i>	P8	6.2 ng/ul
PRTO141	<i>C. myanthum</i>	P3	10.8 ng/ul	PRTO184	<i>M. deformis</i>	P3	4.6 ng/ul	PRTO239	<i>C. myanthum</i>	P8	3.1 ng/ul
PRTO142	<i>C. myanthum</i>	P3	8.4 ng/ul	PRTO185	<i>M. deformis</i>	P3	3.7 ng/ul	PRTO240	<i>C. myanthum</i>	P8	2.4 ng/ul
PRTO144	<i>C. myanthum</i>	P3	16.5 ng/ul	PRTO186	<i>M. deformis</i>	P3	6.1ng/ul	PRTO241	<i>C. myanthum</i>	P8	4.4 ng/ul
PRTO145	<i>C. myanthum</i>	P3	0.9 ng/ul	PRTO187	<i>M. deformis</i>	P3	2.7 ng/ul	PRTO242	<i>C. myanthum</i>	P8	3.2 ng/ul
PRTO146	<i>E. parviflorum</i>	P2	6.0 ng/ul	PRTO188	<i>M. deformis</i>	P3	5.0ng/ul	PRTO243	<i>C. myanthum</i>	P8	2.8 ng/ul
PRTO147	<i>E. parviflorum</i>	P2	5.8 ng/ul	PRTO189	<i>M. deformis</i>	P3	2.5 ng/ul	PRTO244	<i>C. myanthum</i>	P8	3.7 ng/ul
PRTO148	<i>E. parviflorum</i>	P2	6.1 ng/ul	PRTO191	<i>M. deformis</i>	P3	3.5 ng/ul	PRTO245	<i>C. myanthum</i>	P8	3.2 ng/ul

PRTO149	<i>E. parviflorum</i>	P2	6.3 ng/ul	PRTO192	<i>M. deformis</i>	P3	5.0 ng/ul	PRTO246	<i>C. myanthum</i>	P8	19.6 ng/ul
PRTO150	<i>E. parviflorum</i>	P2	3.6 ng/ul	PRTO193	<i>E. parviflorum</i>	P1	2.4 ng/ul	PRTO247	<i>C. myanthum</i>	P8	21.0 ng/ul
PRTO151	<i>E. parviflorum</i>	P2	5.2 ng/ul	PRTO195	<i>E. parviflorum</i>	P1	5.4ng/ul	PRTO248	<i>C. myanthum</i>	P8	21.9 ng/ul
PRTO152	<i>E. parviflorum</i>	P2	7.1 ng/ul	PRTO197	<i>E. parviflorum</i>	P1	6.9 ng/ul	PRTO252	<i>C. myanthum</i>	P8	4.0ng/ul
PRTO153	<i>E. parviflorum</i>	P2	8.4 ng/ul	PRTO198	<i>E. parviflorum</i>	P1	5.4 ng/ul	PRTO254	<i>C. myanthum</i>	P8	5.8ng/ul
PRTO154	<i>E. parviflorum</i>	P2	9.9 ng/ul	PRTO199	<i>E. parviflorum</i>	P1	4.6 ng/ul	PRTO256	<i>C. myanthum</i>	P9	3.5 ng/ul
PRTO155	<i>E. parviflorum</i>	P2	3.5ng/ul	PRTO200	<i>C. myanthum</i>	P4	7.9 ng/ul	PRTO257	<i>C. myanthum</i>	P9	3.4 ng/ul
PRTO156	<i>E. parviflorum</i>	P2	3.9 ng/ul	PRTO201	<i>C. myanthum</i>	P4	2.5 ng/ul	PRTO258	<i>C. myanthum</i>	P9	5.6 ng/ul
PRTO157	<i>E. parviflorum</i>	P2	13.5 ng/ul	PRTO202	<i>C. myanthum</i>	P4	13.1 ng/ul	PRTO259	<i>C. myanthum</i>	P9	4.3 ng/ul

Anexo 3: Tabla de resultados de PCR y secuenciación por cada marcador cloroplástico.

Muestra	Especie	Población	PCR				Secuenciación			
			trnQ-rps16	atpH-atpl	trnF-trnL	trnL-ndhJ	trnQ-rps16	atpH-atpl	trnF-trnL	trnL-ndhJ
PRTO001	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1	x		x	x		x	x	x
PRTO005	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1	x	x	x	x		x	x	x
PRTO102	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7	x	x	x					
PRTO103	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7	x	x	x					
PRTO109	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7		x	x	x				
PRTO110	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7	x	x	x	x	x		x	
PRTO120	<i>Masdevallia deformis</i>	P1	x	x	x		x			
PRTO121	<i>Masdevallia deformis</i>	P1	x	x	x	x	x			x
PRTO122	<i>Masdevallia deformis</i>	P1	x	x	x					
PRTO123	<i>Masdevallia deformis</i>	P1	x	x	x	x	x		x	
PRTO124	<i>Masdevallia deformis</i>	P1	x		x					
PRTO125	<i>Masdevallia deformis</i>	P1		x		x				
PRTO132	<i>Masdevallia deformis</i>	P2	x	x	x	x	x		x	
PRTO133	<i>Masdevallia deformis</i>	P2	x	x	x	x		x	x	
PRTO134	<i>Masdevallia deformis</i>	P2	x	x	x	x	x	x		x
PRTO135	<i>Masdevallia deformis</i>	P2	x	x	x					
PRTO136	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3	x	x	x					
PRTO138	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3	x	x	x		x			
PRTO139	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3	x	x	x	x				
PRTO140	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3	x	x	x				x	
PRTO141	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3		x	x	x				
PRTO142	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3		x	x					
PRTO144	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3	x	x	x					
PRTO145	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P3		x	x	x				
PRTO146	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2	x	x	x	x			x	x
PRTO147	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2	x	x	x					
PRTO148	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2		x	x					
PRTO149	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2	x				x			
PRTO150	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2	x	x						
PRTO151	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2								
PRTO152	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2								
PRTO153	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2		x	x	x		x		
PRTO154	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2								
PRTO155	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2		x	x	x		x		
PRTO156	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2		x	x			x		

PRTO157	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2		x	x	x			x		x
PRTO158	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2			x						
PRTO162	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2									
PRTO163	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P4	x	x	x				x		
PRTO164	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x	x	x	x	x		
PRTO165	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x		x						
PRTO166	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x	x	x	x	x		
PRTO167	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x		x						
PRTO168	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x		x	x			x		
PRTO169	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x		x	x	x	x	x		
PRTO170	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x	x	x	x	x		
PRTO171	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P6	x	x	x						
PRTO173	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P6		x							
PRTO175	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P6		x							
PRTO176	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P2	x	x	x				x		
PRTO177	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P5		x	x	x					
PRTO178	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P5		x							
PRTO179	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P5		x	x	x					
PRTO180	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P5		x	x	x					
PRTO181	<i>Masdevallia deformis</i>	P3	x	x	x	x			x	x	x
PRTO182	<i>Masdevallia deformis</i>	P3	x	x	x						
PRTO183	<i>Masdevallia deformis</i>	P3		x							
PRTO184	<i>Masdevallia deformis</i>	P3	x	x	x	x			x		x
PRTO185	<i>Masdevallia deformis</i>	P3		x	x	x					
PRTO186	<i>Masdevallia deformis</i>	P3	x	x	x	x					
PRTO187	<i>Masdevallia deformis</i>	P3									
PRTO188	<i>Masdevallia deformis</i>	P3		x	x	x					
PRTO189	<i>Masdevallia deformis</i>	P3									
PRTO190	<i>Masdevallia deformis</i>	P3									
PRTO191	<i>Masdevallia deformis</i>	P3									
PRTO192	<i>Masdevallia deformis</i>	P3									
PRTO193	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1									
PRTO193	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1									
PRTO195	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1		x		x			x		
PRTO197	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1	x	x	x	x					x
PRTO198	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1									
PRTO199	<i>Epidendrum parviflorum</i>	P1		x	x	x			x		x
PRTO200	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P4		x	x	x					
PRTO201	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P4		x	x	x					
PRTO202	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P4	x	x	x	x					
PRTO203	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7		x	x	x					
PRTO204	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7		x		x					
PRTO205	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7				x					
PRTO206	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P7	x	x	x	x					
PRTO210	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x		x	x	x	x			

PRTO211	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x					
PRTO212	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x	x				
PRTO213	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x	x		x		
PRTO214	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x	x	x		x	x		
PRTO215	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1	x		x					
PRTO217	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1				x		x		
PRTO220	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P1		x	x	x				
PRTO222	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P2	x		x	x	x	x		
PRTO223	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P2	x	x	x			x		
PRTO224	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P2	x		x		x	x	x	
PRTO225	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P2	x		x	x	x	x	x	
PRTO231	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P6	x	x						
PRTO233	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P6		x		x				
PRTO234	<i>Masdevallia deformis</i>	P4		x	x	x		x		x
PRTO235	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO236	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO237	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO238	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO239	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO240	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO241	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO242	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO243	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO244	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO245	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO246	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO247	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO248	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8								
PRTO250	<i>Masdevallia deformis</i>	P5								
PRTO252	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8	x	x		x				
PRTO254	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P8	x	x	x	x				
PRTO256	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P9	x			x				
PRTO257	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P9	x	x	x	x				
PRTO258	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P9	x	x	x	x				
PRTO259	<i>Cyrtochilum myanthum</i>	P9	x		x	x				