

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Vaccinium floribundum Kunth, reserva de antocianinas en los
páramos.

**Tesis previa a la obtención del título de Magíster en Biología de la
Conservación**

VIVIANA PAMELA CHILUISA UTRERAS

Quito, 2015

CERTIFICADO

Certifico que la tesis de Maestría en Biología de la Conservación de la candidata Ing. Viviana Pamela Chiluisa Utreras, ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Firma de la Directora de Tesis

Quito, 8 de Octubre de 2015

DEDICATORIA

A Dios, por ser el motor de mi vida.

A mis padres porque me han apoyado en todos los momentos buenos y malos del camino.

A mi esposo, que es mi compañero de vida.

A mis hermanos, cuñadas y sobrinos que me alientan cada día con su alegría.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Politécnica Salesiana por la beca otorgada para mi segunda maestría, el financiamiento para esta investigación y la confianza del P. Rector Javier Herrán.

A los Ing. Ivonne Vaca, Daniel Acurio, Sofía Peñaherrera y Javier Chicaiza por todo el apoyo brindado en el desarrollo de este proyecto.

A mi directora Dra. Doris Vela por colaborarme en la revisión de la tesis y al Dr. Santiago Espinoza, coordinador de la Maestría.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 GENERALIDADES DE <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.....	5
3.2 DISTRIBUCIÓN EN ECUADOR	6
3.2.1 MACHACHI	7
3.2.2 PINTAG	8
3.3 LAS ANTOCIANINAS	8
3.3.1 EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE ANTOCIANINAS	12
3.4 EXPRESIÓN GÉNICA	12
3.4.1 GEN/ENZIMA CHALCON SINTASA	15
3.4.2 GEN/ENZIMA DIHIDROFLAVONOL 4-REDUCTASA	15
3.4.3 GEN/ENZIMA ANTOCIANIDIN SINTASA	16
3.4.4 GEN/ENZIMA GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA	16
3.5 PCR EN TIEMPO REAL.....	17
3.5.1 ETAPAS DE LA PCR.....	19
3.6 JUSTIFICACIÓN.....	20
3.7 OBJETIVOS.....	23

3.7.1 OBJETIVO GENERAL	23
3.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.8 DISEÑO ESTADÍSTICO.....	24
3.8.1 HIPÓTESIS NULA.....	24
3.8.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA	24
3.9.1 VARIABLE DEPENDIENTE:	24
3.9.2 VARIABLES INDEPENDIENTES:.....	25
3.10 ANÁLISIS FACTORIAL.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 LUGAR DE ESTUDIO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	26
4.2 SELECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	27
4.3 EXTRACCIÓN DE RNA.....	27
4.4 TRANSCRIPCIÓN INVERSA	28
4.5 ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR	29
4.6 SELECCIÓN DE CEBADORES	30
4.7 CUANTIFICACIÓN EN RT-qPCR.....	31
4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
4.8.1 FACTORIAL 4X2.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

5.1 CURVA ESTÁNDAR DE <i>Vaccinium floribundum</i> CON EL GEN GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA.....	33
5.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA, CHALCON SINTASA, DIHIDROFLAVONOL 4-REDUCTASA, ANTOCIANIDIN SINTASA EN LA ESPECIE <i>Vaccinium floribundum</i>	34
5.3. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS DOS POBLACIONES DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA.	36
5.3.1 FACTORIAL 4X2.....	36
5.3.2 TEST DE DUNCAN	40
5.4 CONCLUSIONES.....	40
5.5 RECOMENDACIONES	42
6. LITERATURA CITADA.....	43
7. FIGURAS.....	50
8. TABLAS	58
9. ANEXOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth)	50
Figura 2. Provincia de Pichincha: poblaciones Machachi y Pintag	51
Figura 3. Ruta biosintética de antocianinas	52
Figura 4: Curva de amplificación de RT-qPCR	53
Figura 5: Curva estándar gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	54
Figura 6: Curvas de amplificación de los cuatro genes de la población de Machachi	55
Figura 7: Curvas de amplificación de los cuatro genes de la población de Pintag	56
Figura 8: Test de Duncan para comparación de medias	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias de cebadores forward y reverse de cada uno de los genes	58
Tabla 2. Concentraciones ng/uL de cDNA de los cuatro genes de la población de Machachi	59
Tabla 3. Concentraciones ng/uL de cDNA de los cuatro genes de la población de Pintag	60
Tabla 4. Resultados estadísticos del Factorial 4X2: ANOVA, población x gen	61
Tabla 5. Resultados estadísticos Test de Duncan. Poblaciones: Machachi y Pintag	62
Tabla 6. Resultados estadísticos Test de Duncan. Genes	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Planta de <i>V. floribundum</i> montada y etiquetada	64
Anexo 2. Certificación de la especie <i>V. floribundum</i> utilizada en la investigación	65

1. RESUMEN

La biología de la conservación es una ciencia práctica que requiere de una interacción entre todos los integrantes de la naturaleza, ésta es una ciencia multi e interdisciplinaria que necesita el aporte de especialistas en diferentes áreas que trabajen con una visión global de conservación. Es por esto que la biología molecular y la biotecnología presentan herramientas para fundamentar la preservación de las especies. Esta investigación se basa en el estudio de la expresión génica de antocianinas en *Vaccinium floribundum*, una especie nativa de alto valor para la conservación, la cual presenta propiedades antioxidantes y por tanto está siendo utilizada en aplicaciones terapéuticas, anticancerígenas, de antienvjecimiento y antitumorales. Además, podría ser considerada una especie de servicio ambiental para reforestación de páramos, ya que al ser una especie propia de los mismos se podría adaptar adecuadamente a las condiciones medioambientales sin causar efectos adversos como pastizales u otras especies dirigidas a ganadería.

Se logró analizar el nivel de expresión de cuatro genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas en *V. floribundum*, recolectadas en dos poblaciones de la Provincia de Pichincha. De acuerdo a los valores obtenidos con el análisis factorial 4x2 y el test de Duncan, se observó que no existen diferencias significativas entre las poblaciones, sin embargo existe una expresión diferencial entre los genes, generando los siguientes resultados para la población de Machachi: gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa presenta una concentración promedio de 648.59 ng/uL, seguido por el gen chalcon sintasa 143.71 ng/uL, luego el gen dihidroflavonol 4-reductasa 59.58 ng/uL y finalmente el gen antocianidin sintasa 39.39 ng/uL. Para la población de Pintag: gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa presenta una

concentración promedio de 667.32 ng/uL, seguido por el gen chalcon sintasa 157.22 ng/uL, luego el gen dihidroflavonol 4-reductasa 60.42 ng/uL y finalmente el gen antocianidín sintasa 44.40 ng/uL.

La expresión génica diferencial desempeña un papel fundamental en el proceso de diferenciación celular y en la regulación genética, por lo cual en este campo de investigación es de vital relevancia también el posterior estudio de las funciones específicas de los genes.

Palabras clave: Antocianinas, conservación, expresión génica, mortiño, *Vaccinium floribundum*.

2. ABSTRACT

Conservation biology is a practical science that requires interaction among all members of nature, this is a multi and interdisciplinary science that requires the contribution of specialists in different areas working with a global vision of conservation. That is why molecular biology and biotechnology have tools to support the conservation of species. This research is based on the study of gene expression of anthocyanins in *Vaccinium floribundum*, a native species of high conservation value, which has antioxidant properties and is therefore being used in therapeutic applications, anti-cancer, anti-aging and anti-tumor. Also, this species could be considered of environmental service for reforestation of wastelands, because as part of wastelands it could adapt to that environmental conditions without causing side effects such as grazing or other species used for livestock.

Expression levels of four genes involved in the biosynthesis of anthocyanins in *V. floribundum* collected in two sites of the province of Pichincha were analyzed. According to the values obtained with a 4x2 factorial analysis and Duncan test, we observed no significant differences between populations, but there is a differential expression between genes, generating the following results for the population of Machachi: gene glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase provide an average concentration of 648.59 ng/uL, followed by chalcon synthase gene 143.71 ng/uL, then dihydroflavonol 4-reductase gene 59.58 ng/uL and finally anthocyanidin synthase gene 39 ng/uL. For the population of Pintag: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene has an average concentration of 667.32 ng/uL, followed by chalcon synthase gene 157.22 ng/uL, then 4-reductase gene dihydroflavonol 60.42 ng/uL and finally anthocyanidin synthase gene 44.40 ng/uL.

Differential gene expression plays a key role in the process of cellular differentiation and gene regulation, so research in this field is of vital importance, also further study of the specific functions of genes.

Keywords: Anthocyanins, conservation, gene expression, mortino, *Vaccinium floribundum*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES DE *Vaccinium floribundum* Kunth

El género *Vaccinium* presenta alrededor de 420 especies, la gran mayoría se distribuyen en las laderas de las montañas en algunos de los países tropicales. Dentro de este grupo se encuentra el mortiño (*Vaccinium floribundum*), una especie que crece en condiciones silvestres en altitudes entre los 1800 y 3600 msnm (Roldán, 2012). En América del Sur el género *Vaccinium* está distribuido principalmente en la Cordillera de los Andes (Roldán, 2012). La Figura 1 muestra una planta de mortiño en su hábitat natural.

Según Pérez (2007), *V. floribundum* pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Ericales, esta especie es un frutal perteneciente a la familia de las Ericaceas. La planta de *V. floribundum* es un arbusto de máximo 1.5m de altura, ramificado con hojas alternadas, la inflorescencia posee racimos de 6 a 10 flores que miden 8mm de largo. Los frutos son bayas carnosas redondeadas con pigmentos de color violeta-azul con cubierta cerosa que poseen gran cantidad de polifenoles (Roldán, 2012).

Vaccinium floribundum es endémico del norte de América del Sur entre Colombia y Ecuador, es una especie nativa de los páramos ecuatorianos, de la cual no se conoce que existan cultivos comerciales, sino solamente parcelas de tierra donde la especie crece en forma silvestre (Roldán, 2012). Su consumo en Ecuador es cultural, generalmente en fruto fresco y procesado en mermeladas artesanales. El consumo del fruto fresco está destinado básicamente a la preparación de la tradicional colada morada, una bebida típica del país de los meses de octubre y noviembre en la época de Finados (Roldán, 2012).

Roldán (2012), afirma que “Si se piensa en el cultivo racional de esta fruta bajo condiciones de control de los recursos naturales, se puede afirmar que no tendría impacto negativo en el ambiente. Además por ser una especie propia de los páramos se la puede utilizar para forestación de los mismos”. Su producción simplemente radica en la recolección de frutos silvestres durante un par de meses, ya que su hábito de crecimiento produce una sola cosecha al año.

Se sugiere que al ser los páramos donde crece *V. floribundum* tan intervenidos por el sector agrícola, y la deforestación que se observa con el pasar de los años, sería muy lógico el impacto positivo que generaría una reforestación con especies nativas. Se considera además que *Vaccinium* podría ser susceptible de extinción en las siguientes décadas si no se realizan planes de manejo y conservación de la misma, inclusive por las erupciones volcánicas propias del país (Knoke *et al.*, 2009).

El mortiño no solo es un frutal de gran importancia para la conservación y cultura de nuestro país, sino que posee grandes propiedades nutricionales y aplicaciones por su alto contenido de compuestos fenólicos: las antocianinas (Hernández *et al.*, 2009).

3.2 DISTRIBUCIÓN EN ECUADOR

A *Vaccinium floribundum* se lo puede encontrar en los páramos altos de la Cordillera ecuatoriana, desde El Ángel en el Carchi hasta el Tambo en Cañar (Roldán, 2012). En el presente trabajo se analizaron dos poblaciones de la Provincia de Pichincha, Machachi y Pintag para rastrear la especie, observar en qué condiciones se encuentra y generar información para la toma de decisiones en lo que respecta a su conservación (Figura 2).

3.2.1 MACHACHI

El páramo de Machachi en el cantón Mejía de la provincia de Pichincha, está considerado como un bosque seco montano bajo cuya vegetación es típica de la región interandina con arbustos, frútices y yerbas. Además, se caracteriza por conservar arrayanes, cedros, podocarpus y unos pocos remanentes de *Polylepis* (De los Santos *et al.*, 2009). Las condiciones son propicias para la producción del género *Vaccinium*.

Esta zona posee un número importante de ríos que se derivan de las vertientes naturales de los nevados y páramos del cantón. En el sector oriental se observa la micro cuenca del río San Pedro, perteneciente a la subcuenca del río Guayllabamba, el que es sustentado por las vertientes de los volcanes Rucu Pichincha, Atacazo, Corazón, Illinizas, Rumiñahui, Sincholagua, Pasochoa, Ilaló y Cotopaxi (Ministerio de Defensa Nacional, 2013).

Su altitud promedio se extiende a los 3200m, las lluvias son abundantes entre los meses de enero hasta a abril, con una pluviosidad de hasta 1000mm, la temperatura media es de 14°C, la capacidad media de retención del agua en el suelo es de 300mm y la humedad relativa promedio del 75% (Ministerio de Defensa Nacional, 2013).

La tierra es muy propicia para la siembra y cosecha de todas las especies de este ecosistema ya que presenta alto contenido en minerales producto de erupciones volcánicas, todas estas condiciones facilitan el crecimiento de consorcios microbianos que enriquecen el suelo en esta región.

3.2.2 PINTAG

Pintag en el Cantón Quito de la provincia de Pichincha, pertenece a la región bioclimática húmedo temperado, la cual corresponde a la formación ecológica bosque húmedo montano bajo cuyas características son: altitudes de 2500 a 3000 msnm; la precipitación pluvial es de hasta 2000 mm; la temperatura media anual está comprendida entre 12° y 18°C; las especies vegetales más comunes en la zona son: chilca, pumamaqui, aliso, hierba mora, nabo silvestre, llantén, tréboles y kikuyo (Valencia, 2011).

En general el suelo de la zona de Pintag, se caracteriza por ser de origen volcánico, por estar constituido de cenizas volcánicas y materiales piroclásticos tanto recientes como más antiguos, por lo cual no está fuera de lo común encontrar en varios perfiles suelos recientes sobre suelos antiguos enterrados, es decir, suelos producto de diferentes emisiones volcánicas (Valencia, 2011).

3.3 LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son metabolitos secundarios involucrados principalmente en la maduración de los frutos. Estos compuestos fenólicos se encuentran en las hojas, flores y sobretodo en los frutos de las plantas. Son incorporados al cuerpo humano en la ingesta diaria, por lo cual el mayor interés radica en los frutos de colores intenso azulados (Fernandes *et al.*, 2014).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos asociados en un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo

los principales: las antocianinas, las flavonas, los flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Zhang *et al.*, 2014).

En la ruta biosintética de flavonoides, la primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por chalcon sintasa y da origen a naringerina chalcona, iniciador de flavonoles y antocianinas. Esta misma reacción catalizada por la estilbeno sintasa deriva en la formación de estilbenos cuya función principal es la defensa de plantas ante patógenos (Chen *et al.*, 2012).

Las antocianinas son flavonoides con pigmentos responsables de los colores rojos intensos de las flores y frutos, una función importante es la dispersión de semillas que está implícita en la polinización de las plantas. Las moléculas de antocianinas sin azúcar se denominan antocianidinas. La intensidad del color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan. Algunos ejemplos son: pelargonidina (rojo naranja), cianidina (rojo púrpura) y delphinidina (azul púrpura) (Zhang *et al.*, 2014).

En la Figura 3 se observa la ruta biosintética propuesta por Chen *et al.* (2012) para la síntesis de las antocianinas y proantocianidinas en plantas, en la misma se pueden encontrar los genes propuestos para esta investigación. Las abreviaturas son: chalcon sintasa (CHS); flavanona 3-hidroxilasa (F3H); flavonoide 3-hidroxilasa (F3'H); flavonoide 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H); dihidroflavonol 4-reductasa (DFR); antocianidina sintasa (ANS); flavonoles sintasa (FLS); UDP-glucosa: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (GTs); antocianidina reductasa (ANR); leucoantocianidin reductasa (LAR); glutatión S-transferasa (GST); O-

metiltransferasas (OMTs); aciltransferasas (ACT); 3-desoxi-D-arabino-heptulosonate 7-fosfato sintasa (DAHPS); 3-deshidroquinata sintasa (DHQS); 3-deshidroquinato deshidratasa/shikimato 5-deshidrogenasa (DDH/SDH); shiquimato quinasa (SK).

En la figura 3 se observa que los compuestos en cuadro naranja pertenecen a la ruta de las antocianinas que tienen estrecha relación y terminan en los compuestos fenólicos flavonoides, ya que son metabolitos secundarios sintetizados a partir de moléculas de fenilalanina. Los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos y todos los productos finales se caracterizan por ser polifenoles que pueden clasificarse según las isomerizaciones y grupos funcionales en: chalconas, flavonas, flavonoles, antocianinas y taninos (Vasco *et al.*, 2009).

Del Valle (2005), menciona que este tipo de compuestos son los responsables de otorgar los colores rojo, azul y violeta. Su síntesis se genera a partir de la conversión de los precursores fenilalanina y acetato, mediante la vía metabólica del fenilpropanoide. Su acumulación se encuentra en las vacuolas, la biosíntesis es regulada por enzimas mediante transcripción.

Este tipo de compuestos son importantes por su amplia capacidad antioxidante (Aguilera *et al.*, 2011). Pueden ser utilizados en el diseño de alimentos nutraceuticos, por su capacidad de neutralizar radicales libres, responsables de algunas enfermedades degenerativas, muerte celular, cataratas, arteroesclerosis e inclusive cáncer (Martínez-Cruz *et al.*, 2011).

Según Schreckinger *et al.*, (2010) el interés en las bayas de América del Sur se ha incrementado debido a sus potenciales beneficios para la salud. En el estudio se caracterizó las antocianinas y proantocianidinas de *Vaccinium* y se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro*. El resultado fue la reducción en el proceso de adipogénesis, aumento en las propiedades anti-inflamatorias y una alta capacidad antioxidante medida en la capacidad de captación de radicales libres.

Algunos frutos pertenecientes a las familias Rosaceas, Vitaceae, Solanaceae, Ericaceae y Passifloraceae son ricos en antocianinas. La delfinidina, un compuesto precursor importante solo se encuentra en el mortiño y la pelargonidina en la frutilla. En la actualidad, la ingesta de antocianinas de las frutas se ha incrementado debido a la comercialización de nuevos extractos y jugos que revelan los beneficios a la salud de este consumo (Akagi *et al.*, 2009).

Hoy en día, en la industria se utilizan compuestos sintéticos que ocasionan daños a la salud, por lo que se propone sustituir este tipo de compuestos por aquellos de origen natural (Guerra *et al.*, 2006), como por ejemplo extractos de distintas frutas como el mortiño, mora, fresa y frambuesa, los cuales pueden generar coloraciones intensas generando un aspecto más atractivo para la comercialización de nuevos productos (Norberto *et al.*, 2013).

Lamentablemente, las antocianinas no son tan estables químicamente, generando cambios estructurales durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje. Son afectadas por la luz, cambios en pH, temperatura, oxidación y la presencia de otros compuestos. El conocimiento de todos estos factores es de vital importancia para una eficaz extracción y purificación.

3.3.1 EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas según Leyva (2009), son moléculas polares por lo que son muy solubles en dichos solventes. Los métodos químicos convencionales empleados para su extracción implican el uso de solventes ácidos. Comúnmente es realizada por una repetida maceración o molido con pequeñas cantidades de HCl en metanol o etanol a temperatura ambiente o en casos complejos en frío usando ácidos débiles para evitar la degradación del pigmento y posteriormente una purificación (Nascimento *et al.*, 2008).

En la actualidad, los métodos moleculares que son técnicas más finas han permitido la detección exacta de moléculas orgánicas como las antocianinas, pudiendo aislar DNA o RNA de alta pureza, visualizar su estado, amplificar una región específica utilizando *Taq polimerasa*, cebadores y oligonucleótidos que hibridan la cadena complementaria a la secuencia que se va a amplificar y observar finalmente su expresión génica (Wilhelm *et al.*, 2003).

3.4 EXPRESIÓN GÉNICA

El estudio de la genética y la biología molecular en plantas ha proporcionado herramientas para guiar la preservación, esfuerzos en restauración de hábitats y a minimizar el riesgo de extinción por la conservación de especies como entidades dinámicas, capaces de evolucionar de cara a las condiciones cambiantes (Primack *et al.*, 2001).

Se considera que la aplicación de estas herramientas a las especies raras y comunes permiten inclusive tener una idea de su resiliencia, potencial evolutivo y su capacidad de

supervivencia; además con un enfoque renovado en estudios genéticos cuantitativos y expresión génica se fundamenta la toma de decisiones en conservación (Kramer *et al.*, 2009).

Se utiliza el término expresión génica para describir la producción de RNAm de una célula. Todas las células de un organismo poseen igual genoma, pero no todos sus genes presentan los mismos procesos de transcripción y traducción en un ciclo celular, sólo algunos de ellos se activan y codifican para proteínas, mientras que otros son reprimidos o silenciados (Thieman, 2010).

En la biosíntesis de antocianinas para el género *Vaccinium* se sabe que se encuentran envueltos en su expresión alrededor de ocho genes o más (Martz *et al.*, 2010), de los cuales en el presente trabajo serán analizados cuatro: chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, se escogieron estos genes ya que han sido estudiados con anterioridad en investigaciones con distintas especies que también presentan pigmentos violetas, se menciona que los niveles de transcripción de dichos genes controlan en mayor proporción la expresión de antocianinas (Viljoen *et al.*, 2013). Por costos, tiempo y la dificultad de encontrar información sobre *V. floribundum* se ha decidido trabajar con estos cuatro genes.

La evaluación de RNAm mediante métodos clásicos requiere una gran cantidad de muestra, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un fuerte impacto desde su creación, sin embargo, su uso en la cuantificación de RNAm ha sido problemática, principalmente por la naturaleza exponencial de la reacción, donde pequeñas diferencias en la amplificación pueden alterar de manera significativa el rendimiento del amplicón.

En los últimos años se ha desarrollado una nueva tecnología *in silico* que permite la cuantificación eficaz de los amplicones, en la que se emplean moléculas fluorescentes, que mediante la unión a los ácidos nucleicos permiten valorar la cantidad de DNA presente en cada ciclo, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), disminuye considerablemente el tiempo de los experimentos y aumenta notablemente la especificidad y sensibilidad de los mismos (Bonilla *et al.*, 2002).

El término expresión génica abarca el proceso desde la activación del gen hasta que la enzima llega al sitio preciso y realiza su función, de tal manera dicha proteína pasa a favorecer la expresión del fenotipo. El nivel de expresión de todo gen puede ser analizado con gran efectividad mediante la detección y cuantificación.

La actividad de todo gen empieza con la transcripción, proceso que consiste en la síntesis de una molécula de RNA utilizando una cadena molde de DNA que se extiende desde una secuencia promotora hasta una secuencia terminadora; esta reacción es catalizada por la enzima RNA polimerasa (Rodríguez, 2006). Todos los genes se expresan de manera diferente ya que estos se encienden o apagan en diferentes momentos del ciclo de vida de un organismo. Además, la regulación de los mismos varía según la función de cada uno, ellos toman el nombre de la enzima que codifican.

Las técnicas moleculares permiten determinar la estructura génica de las poblaciones y los patrones de expresión en dos niveles de la información genética; toda esta información es de vital importancia para la toma de decisiones en el ámbito de la conservación de especies de interés (Cobos, 2014).

3.4.1 GEN/ENZIMA CHALCON SINTASA

Chalcon sintasa o naringenina-chalcona sintasa (CHS) es una enzima ubicua en las plantas superiores como mecanismo de defensa natural y como intermediario de síntesis en la ruta de los flavonoides. Esta enzima cataliza la conversión de 4-cumaroil-CoA y malonil-CoA a chalcona naringenina (Dao *et al.*, 2011). CHS actúa como un eje central para las demás enzimas implicadas en la ruta de los flavonoides. Se ha demostrado que estas enzimas interactúan a través de interacciones proteína-proteína.

El gen CHS se expresa normalmente en las plantas, pero también puede ser objeto de la expresión inducida a través de la luz UV y como respuesta a patógenos, inductores, heridas y estrés. Dao *et al.* (2011), revelan que la expresión de este gen disminuye debido a la inhibición post-transcripcional de la CHS a través de una mayor tasa de degradación del RNAm.

3.4.2 GEN/ENZIMA DIHIDROFLAVONOL 4-REDUCTASA

La dihidroflavonol 4-reductasa pertenece a la familia de las oxidorreductasas, por lo cual el nombre sistemático de esta clase de enzimas es cis-3,4-leucopelargonidina: NADP⁺ 4-oxidorreductasa, otros nombres en uso común incluyen dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), reductasa dihidromiricetina y reductasa dihidroquercetina. Esta enzima participa en la biosíntesis de los flavonoides, las antocianidinas, los pigmentos vegetales comunes.

Katsumoto (2007), ha manipulado genéticamente rosas para la adición de un gen de DFR y la generación del pigmento azul, en un esfuerzo por crear una rosa azul, que se vendería en todo el mundo generando incalculables réditos económicos a la compañía.

3.4.3 GEN/ENZIMA ANTOCIANIDIN SINTASA

La ruta biosintética de las antocianinas, incluye la reacción que convierte a la leucoantocianidina a antocianidina, siendo esta la primera fase en la formación de metabolitos coloreados. Se han descrito genes en varias especies de plantas que expresan una enzima competente para catalizar dicha reacción de biosíntesis y que se determina con el nombre de antocianidin sintasa. La ANS, actúa como una enzima oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato convirtiendo su sustrato incoloro (flavan-3,4-diol) en una molécula fuertemente coloreada, la antocianidina (Almarza, 2002).

Las herramientas moleculares han generado valiosa información para la quimiotaxonomía vegetal, la cual utiliza la ingeniería de flavonoides como marcadores para descifrar relaciones taxonómicas y filogenéticas; estas también se han usado como índice de control de calidad en la industria de alimentos. Almarza, 2002 menciona que, “La ruta metabólica que conduce a la formación de las antocianinas en distintas especies de plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Perilla frutescens*, *Sorghum bicolor* y otras, está regulada a nivel de la expresión del gen que codifica la enzima antocianidin sintasa (ANS)”.

3.4.4 GEN/ENZIMA GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es una enzima llamada también 3-fosfogliceraldehído y abreviada como G3P, es un compuesto importante que aparece como intermediario en varias vías metabólicas. Durante la fotosíntesis, por ejemplo, se producen 2 moléculas de glicerato-3-fosfato (GP) en el primer paso de la reacción dependiente de fotones de luz, cuando el sustrato ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) y el CO₂ se carboxila en la reacción

catalizada por la enzima Rubisco. El GP se convierte en D-gliceraldehído-3-fosfato (G3P) utilizando para ello la energía del ATP y el poder reductor del cofactor NADPH, como parte del ciclo en fase oscura, ciclo de Calvin (Jaakola, 2013).

Regularmente se considera que el G3P es el primer producto de la fotosíntesis y que puede ser usado como nutriente intermedio. En plantas, para la selección de genes control, ha sido evaluado como gen de referencia. Los genes de control más empleados son: β -actin, Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, hipoxantina guanina phosphoribosil-transferasa y 16S del RNA ribosomal, ya que son aquellos que presentan las concentraciones más elevadas, por lo que permiten la normalización de una curva estándar y generan datos confiables (Huggett *et al.*, 2005).

El gen control se evalúa frente a todos los genes presentes en el estudio. Genes que presentan una variación inter e intragrupo mínima, son los considerados más estables y por ende los seleccionados como genes control. Según Martz *et al.*, (2010) se trabaja en *Vaccinium* con el gen Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa ya que presenta las concentraciones más elevadas dentro del género.

3.5 PCR EN TIEMPO REAL

“La técnica de PCR en Tiempo Real basada en la amplificación *in vitro* del ADN tiene la ventaja que lleva a cabo los procesos de detección y cuantificación en el mismo vial y en cada etapa de la reacción” (Chiluisa-Utreras *et al.*, 2014).

Todo el proceso de la cuantificación de la PCR en tiempo real se realiza en un solo equipo que es un termociclador que resulta ser un espectrofluorómetro, de esta manera se

disminuye el riesgo de contaminación en el laboratorio y permite aumentar el rendimiento de trabajo, es claro que esta técnica presenta muchas más ventajas a los métodos tradicionales de análisis de expresión génica, donde se utilizaban geles de agarosa para realizar electroforesis y obtener simplemente un resultado cualitativo. Este moderno sistema presenta dos componentes: elementos ópticos asociados al termociclador y moléculas fluorescentes que proporcionan la determinación del amplicón a lo largo de cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (Vinueza-Burgos, 2009).

La cuantificación de RNAm es un proceso complicado ya que mínimas diferencias en la amplificación pueden afectar de manera importante el rendimiento del amplicón, por lo que en las últimas décadas se describió una nueva tecnología que permite la cuantificación efectiva de los amplicones de cDNA, en la cual se emplean marcadores que gracias a su fluorescencia emitida en cada ciclo refleja la concentración de producto amplificado, como el SYBR Green I, que mediante la unión a ácidos nucleicos de doble cadena permite valorar la cantidad de DNA complementario presente (Wong *et al.*, 2005).

Debido a su sensibilidad, rapidez, exactitud y especificidad, el método de RT-qPCR puede ser utilizado para analizar la expresión génica de un modo más preciso que las técnicas convencionales, permitiendo obtener medidas cuantitativas en pequeñas cantidades de muestras que pueden ser valiosas en la detección de genes de interés, en el diagnóstico de enfermedades genéticas, metabólicas, autoinmunes, entre otras aplicaciones (Valasek *et al.*, 2005).

En la Figura 4, se muestra una curva de amplificación de PCR en tiempo real en donde se observa un valor umbral que se refiere a un nivel de fluorescencia a partir del cual la señal alcanza un valor por encima del ruido de fondo y el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral se conoce como Crossing point o punto de cruce (Cp) o threshold cycle o ciclo umbral (Ct). Se considera que la amplificación y cuantificación es positiva si sobrepasa ese umbral y que es negativa si la curva se mantiene por debajo de él.

Es así, como el Cp obtenido en una muestra, se puede comparar con el de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas con cantidades conocidas de DNA para la cuantificación del objetivo (Kubista *et al.*, 2006).

El Cp o Ct es un valor X que determina el número de ciclos en el que la muestra se amplifica, es decir el punto de detección para una cuantificación absoluta, donde los valores matemáticos son inversamente proporcionales a la cantidad de DNA identificado, a menor Cp más concentración.

3.5.1 ETAPAS DE LA PCR

La reacción en cadena de la polimerasa presenta tres etapas, la primera es la desnaturalización, en donde se da la separación de la doble cadena de DNA por ruptura de los puentes de hidrógeno, esto se consigue gracias al incremento de temperatura que oscila entre los 90 a 95°C, sin embargo temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para templados ricos en G y C (Hanna *et al.*, 2005).

En la segunda etapa se necesita disminuir la temperatura a un rango de entre 55 a 65°C para que se pueda realizar la alineación de los primers con el molde. La temperatura y el

tiempo requerido para esta fase dependen de la composición, tamaño y concentración de los cebadores amplificadores y de la diana que se está trabajando (Lodish *et al.*, 2006).

En la tercera etapa, la taq DNA polimerasa incorpora nucleótidos y realiza la copia a partir de la cadena de DNA previamente desnaturalizada. La temperatura óptima de trabajo de esta enzima es a 72°C ya que alcanza su máxima actividad. Una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Después de cada ciclo el número de copias obtenidas se duplica, por lo que después de alrededor de 30 ciclos ya se tiene aproximadamente 1 millón de copias nuevas de DNA (Mullis *et al.*, 2006).

3.6 JUSTIFICACIÓN

En Ecuador la producción del mortiño es netamente silvestre por lo que es difícil encontrarlo en el mercado todo el año. Al ser una especie nativa se considera que podría ser utilizada para la reforestación de páramos y es una opción de cultivo agrícola para los campesinos de la Sierra Central del país (Roldán, 2012).

Además, se busca mostrar a este fruto nativo como una alternativa comercial frente a otras especies introducidas que son consideradas en algunos casos como invasivas. El mortiño se presenta como un fruto de consumo cultural cuya conservación está asociada también a las raíces de nuestro país.

Por otro lado, el mortiño es un fruto que posee propiedades funcionales importantes debido a su alto contenido de compuestos fenólicos (Gaviria *et al.*, 2003). Las antocianinas se

presentan en forma de pigmentos rojos, púrpuras y azules en flores, frutos, bayas y hojas con diferentes estructuras químicas (Guerra *et al.*, 2006). El interés por dichos pigmentos antociánicos y su investigación científica se ha incrementado en los últimos años, debido a factores como el color que confieren a los productos que las contiene y sus propiedades nutricionales y medicinales enfocadas a la reducción de enfermedades coronarias, cardiovasculares (Vasco *et al.*, 2008), neurológicas, cáncer, diabetes y procesos inflamatorios (Garzón, 2008).

Debido al creciente costo de la medicina curativa, la medicina preventiva, que es rentable, se ha convertido en vital para mejorar la salud en las sociedades occidentales en distintos entornos socioeconómicos. Recomendaciones de alimentación con especies nutraceuticas representan un medio viable de protección contra las enfermedades, existen un sinnúmero de investigaciones científicas que atribuyen a las especies ricas en antocianinas propiedades benéficas muy importantes (Kruger *et al.*, 2014).

Está comprobado que las antocianinas y proantocianidinas protegen al organismo contra la inflamación ya que inhiben los factores de transcripción que se unen a las regiones promotoras de genes que codifican para proteínas pro-inflamatorias. Además, en estudios *in vitro* e *in vivo* se ha reportado el aumento de la capacidad antioxidante celular por captación de radicales libres. En ratas de laboratorio, realizando una dieta suplementada con arándanos, se obtuvo una disminución en la presión arterial, una mejora de la disfunción endotelial y una reducción en la actividad arterosclerótica en los animales (Kruger *et al.*, 2014).

Los análisis moleculares tienen amplias aplicaciones en la gestión de la biodiversidad y son una herramienta potente para fundamentar la conservación y monitoreo de las especies endémicas y poblaciones naturales (Thomsen *et al.*, 2014). Una de las técnicas utilizadas para observar los patrones de expresión génica o los transcriptomas es la RT-qPCR (reverse transcriptase quantitative PCR) (Wang, Z. *et al.*, 2014), los elementos a utilizarse son exactamente iguales que en una PCR convencional pero se adiciona una sustancia marcada con un fluorocromo y se utiliza un termociclador que alberga sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, lo cual permite cuantificar la concentración de uno o más productos específicos (Rivas, 2010).

Otras técnicas implementadas para la conservación de las especies de interés biológico y/o comercial son la criopreservación, el cultivo *in vitro* y los bancos de germoplasma las cuales permiten almacenar información genética de especies vulnerables, en riesgo de extinción o con problemas. Estas metodologías podrían ser aplicadas posteriormente para la conservación de la especie *V. floribundum* la cual es fuente de antocianinas, compuestos de gran interés biomedicinal (Reed *et al.*, 2000).

La evaluación del nivel y la distribución de la diversidad genética dentro de una especie vegetal aporta información vital con respecto a su historia evolutiva y es fundamental para la gestión de la conservación efectiva y práctica; varios aspectos de la biología de la conservación, como la pérdida de la diversidad genética, la restauración de las poblaciones amenazadas y la preservación objetiva de las mismas sólo pueden ser abordadas con estudios de genética detallada y biología molecular, la pérdida de la diversidad genética puede ser observada entre poblaciones y podría conducir a una disminución de la capacidad de una

especie para hacer frente a los cambios del entorno y fluctuaciones demográficas, tanto a corto como a largo plazo (Zhang *et al.*, 2010).

El aporte de esta investigación, contribuirá a posteriores análisis relacionados con la expresión génica de antocianinas en especies de interés para la conservación. En base a este estudio, el cual es novedoso y pionero en el país, se puede pensar inclusive en aplicaciones industriales, medicinales, de recuperación de páramos y prácticas en el mejoramiento de especies (Li *et al.*, 2012) y la comercialización de productos agrícolas para el beneficio de los pobladores cercanos, inclusive para exportación.

3.7 OBJETIVOS

3.7.1 OBJETIVO GENERAL: Cuantificar en *Vaccinium floribundum* Kunth la expresión de los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, involucrados en la biosíntesis de antocianinas, en dos poblaciones de la Provincia de Pichincha.

3.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Cuantificar las concentraciones de cDNA para generar una curva estándar y llegar a evaluar la cantidad de antocianinas que contiene *Vaccinium floribundum*.
- Determinar los niveles de expresión de los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa para antocianinas en esta especie.

- Comparar los niveles de expresión de los genes para antocianinas en dos poblaciones de *Vaccinium floribundum* de la provincia de Pichincha.

3.8 DISEÑO ESTADÍSTICO

3.8.1 HIPÓTESIS NULA

En *Vaccinium floribundum* se expresan al mismo nivel los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa involucrados en la biosíntesis de antocianinas en dos poblaciones de la Provincia de Pichincha.

3.8.2 HIPÓTESIS ALTERNATIVA

En *Vaccinium floribundum* se expresan en diferentes niveles los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa involucrados en la biosíntesis de antocianinas en dos poblaciones de la Provincia de Pichincha.

3.9 VARIABLES

3.9.1 VARIABLE DEPENDIENTE:

Concentración (ng/uL) de cDNA: Es la medición de la cantidad de RNA extraído y transcrito a DNA complementario obtenido de un fruto de *Vaccinium floribundum* mediante PCR en Tiempo Real para determinar la cantidad de antocianinas.

3.9.2 VARIABLES INDEPENDIENTES:

- Dos poblaciones de la Provincia de Pichincha: Pintag y Machachi con frutos maduros de *Vaccinium floribundum*
- Cuatro Genes para análisis de la expresión: chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

3.10 ANÁLISIS FACTORIAL

En los análisis factoriales se pueden analizar los efectos principales de las variables, así como sus interacciones. Sus ventajas se enmarcan en la eficiencia del uso de los recursos y tiempo disponible ya que las evaluaciones son más cercanas a la realidad (Sánchez-Otero, 2013).

Para los análisis moleculares el factor tiempo de dedicación en el laboratorio es de vital importancia ya que en una molécula tan inestable con el RNA unas cuantas horas pueden bastar para perder una reacción, la contaminación es otro factor de relevancia y finalmente el recurso económico debe ser bien utilizado ya que cada uno de los reactivos que se utilizan en los laboratorios de biología molecular son de un costo bastante elevado.

Es importante entonces con un criterio técnico realizar la mejor planificación acompañada de un buen diseño experimental en donde las repeticiones del ensayo sean las adecuadas tomando justamente los criterios de recursos y tiempo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LUGAR DE ESTUDIO Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Los frutos maduros de *V. floribundum* fueron colectados en dos poblaciones silvestres de la Provincia de Pichincha:

- Población de Machachi del cantón Mejía con coordenadas geográficas 0°31'04.8"S 78°37'07.4"W y altitud 3200 msnm.
- Población Pintag del cantón Quito con coordenadas geográficas 0°24'00.0"S 78°24'00.0"W y altitud 3000 msnm.

Se colectaron, según la normativa INEN para recolección de alimentos, 1kg de frutos maduros de cada población nativa que fueron colocados en un mini tanque de Nitrógeno líquido. En base a los criterios de investigación para análisis moleculares donde se toma en cuenta, tiempo y costos, se determinaron los siguientes atributos para el estudio:

Unidad experimental: 1 tubo eppendorf de 1.5ml que contiene 50µl de RNA extraído de frutos maduros de plantas al azar de *V. floribundum* de cada una de las dos poblaciones.

Unidad de estudio: Machachi y Pintag.

Intervalo de toma de muestras: 1 mes.

Número de ensayos por muestra: 1 ensayo

Número de análisis por ensayo: 2 análisis, detección y cuantificación de expresión génica.

Número de repeticiones: 10 repeticiones por muestra.

4.2 SELECCIÓN Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la selección de las muestras a colectarse de *V. floribundum*, se consideró el color oscuro de la piel de los frutos maduros y que su tamaño se aproxime a 1 cm de diámetro, además los arbustos sobrepasaron el 1.2m de altura. Aunque estos páramos son altamente intervenidos, se pueden encontrar pocas poblaciones nativas de la especie objeto de estudio.

Se realizaron dos salidas al campo con especialistas botánicos, durante los meses de Octubre y Noviembre del año 2014 y una en el mes de Enero del 2015, tiempo adecuado en el que se puede encontrar las muestras.

En el laboratorio se realizó el montaje de la planta (Anexo 1), para obtener la certificación de la especie por parte del especialista responsable del Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana (Anexo 2).

Para la preservación de las muestras, los frutos maduros de *V. floribundum* se colocaron en criotubos de 50ml, los cuales fueron mantenidos en un tanque de Nitrógeno Líquido a -197°C , hasta la extracción del ácido ribonucleico (RNA).

4.3 EXTRACCIÓN DE RNA

Se utilizó PureLink[®] RNA Mini Kit (Ambion, Life), según las indicaciones del fabricante, comenzando con una maceración de la muestra con hielo seco, posteriormente se colocaron 500mg de la muestra macerada en un tubo eppendorf. Se adicionó 1ml de dicha solución en el tubo que contiene la muestra macerada, se centrifugó por 2min a $12000 \times g$ y se transfirió 1ml del sobrenadante a un tubo nuevo para colocar 500ul de etanol al 70%, se llevó

el tubo al vórtex, se traspasó 700µl a un tubo de columna y se llevó a la centrifuga por 15s, se descartó el líquido y se realizó este procedimiento por duplicado; una vez realizado este procedimiento se adicionó 700µl de Buffer de lavado I y se llevó a la centrifuga por 15s a 12000 x g, se descartó el líquido y se llevó el tubo de columna a un nuevo tubo de colección.

Se adicionó 700µl de Buffer de lavado II y se llevó a la centrifuga por 15s a 12000 x g, este procedimiento se realiza por duplicado también para alcanzar una óptima limpieza, se descarta el líquido y se lleva el mismo tubo de columna a la centrifuga por 2min a 12000 x g.

Finalmente, la columna se colocó en un tubo de recuperación, se adicionó 50µl de Agua libre de RNAsas para realizar la elución y se llevó a la centrifuga por 2min a 12000 x g, se le adicionó 1µl de Protector de Inhibición de RNAsas (Roche) y se lo conservó a -20°C, para ser procesado el mismo día.

4.4 TRANSCRIPCIÓN INVERSA

Para la obtención de cDNA, se utilizó el Kit de transcripción inversa: Transcriptor First Strand cDNA synthesis Kit (Roche), según las indicaciones del fabricante. Se preparó la Master Mix de transcripción inversa en un microtubo eppendorf con 4µl del vial 2 (Transcriptor RT Reacción Buffer(5x)), 0.5µl del vial 3 (Protector RNase Inhibitor), 2µl vial 4 (Deoxynucleotide Mix), 0.5µl del vial 1 (Transcriptor reverse Transcriptase) y se obtuvo 7µl de la Master Mix para cada reacción.

Se colocaron los 7µl de la Master Mix en el microtubo junto con la anterior preparación que salió del termociclador convencional. Se llevó el microtubo al termociclador

convencional (Labnet) utilizando un protocolo de 10min a 25°C, 55°C por 30min, 85°C por 5min y el enfriamiento al ∞ a 4°C, finalmente se obtuvo el cDNA el cual se cuantificó en el fluorómetro Qubit[®] 2.0.

4.5 ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

Se prepararon soluciones seriadas del cDNA anteriormente obtenido de un fruto maduro de *V. floribundum* de la colecta de Machachi, y se trabajó con el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa para mantenerlo como una curva patrón.

Las muestras se cuantificaron utilizando Qubit[®] 2.0 Fluorometer con el Qubit[®] DNA Assay Kit (Life), según las indicaciones del fabricante, se realizó la lectura con el programa dsDNA High Sensitivity, aplicando la fórmula para la cantidad de muestra utilizada en la cuantificación obteniendo así concentraciones específicas que serán incorporadas al equipo RT-qPCR para el análisis de la expresión de los genes de interés.

Con el cDNA cuantificado, se realizó una amplificación utilizando el Light Cycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche), con los primers del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa para ingresar los datos en el software del equipo Light Cycler 2.0 (Roche).

El protocolo de amplificación se realizó en base al tipo de organismo y secuencia de estudio, con valores de longitud de onda, número de ciclos, número de muestras y temperaturas por tiempo.

En este experimento se realizó la programación de cuantificación absoluta, donde se ingresan los datos obtenidos de las concentraciones mediante el Qubit, las cuales son los controles estándares positivos para las subsiguientes análisis de las muestras de interés.

Se inicia la corrida de amplificación dando como resultado final la curva estándar de concentración de cDNA del gen control, con el cual se compararán las siguientes muestras para su cuantificación en ng/uL.

Finalmente se debe considerar como indica el manual del equipo que los valores de error y eficiencia de la curva deben estar entre 0.0 y 0.3 puntos y 1.8 y 2.2 puntos respectivamente; para posteriormente ser utilizada en las corridas de la RT-qPCR para cuantificación de muestras con concentración desconocida. Las curvas estándar con el gen control son la base para la cuantificación en el equipo de RT-qPCR según Huggett *et al* (2005).

4.6 SELECCIÓN DE CEBADORES

En la tabla 1, se presentan las secuencias de los primers forward y reverse de cada uno de los cuatro genes que se analizaron en la presente investigación. Estos fueron seleccionados a partir de referencias bibliográficas, dichas referencias tienen relación con estudios de expresión génica en el género, ya que al no estar descrito el genoma de *V. floribundum* no existe información con respecto a la especie.

4.7 CUANTIFICACIÓN EN RT-qPCR

Se preparó la Master Mix Light Cycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) previamente con 14µl del tubo 1a que contiene la taq polimerasa en el tubo 1b que contiene la mezcla de reacción.

Para la mezcla maestra de cada una de las muestras, se estandarizó el protocolo de 20 µl de volumen final, con 9.8 µl de H₂O ultra pura con 0.6 µl del primer forward, 0.6 µl del primer reverse, en una concentración de 10 micromolar, más 4 µl de la Master Mix y 5 µl de cDNA de *V. floribundum* obtenido anteriormente; considerando que se requiere un control negativo y un positivo por cada uno de los genes se prepararon 2 capilares más (Roche).

En el caso de los controles negativos se sustituyó los 5µl de muestra por 5µl de H₂O ultra pura y para los controles positivos se utilizó un cDNA con el que se estandarizó la curva; los capilares (Roche) se los centrifugó cuidadosamente a 12000 x g por 15s para asegurar que la muestra esté en el fondo del mismo y se realice una correcta lectura.

Para el protocolo de amplificación se programó en el Software Light Cycler 4.0 (Roche): desnaturalización inicial a 95°C, 1 ciclo, luego se proceda a 65 ciclos de desnaturalización a 95°C, hibridación a 60°C y la extensión a 72°C para llegar finalmente al último paso de enfriamiento por 1 ciclo a una temperatura de 4°C. Finalmente para lograr tener los datos cuantitativos, se debe importar la curva estándar externa anteriormente guardada.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.8.1 FACTORIAL 4X2

Se realizó una evaluación factorial en el programa Infostat de los cuatro genes: chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa involucrados en la biosíntesis de antocianinas en *V. floribundum* y las dos poblaciones de la Provincia de Pichincha; es decir con este análisis se puede reportar en los datos, la interrelación de cada una de las variables independientes: cada uno de los genes y todos los genes con cada una de las poblaciones y con las dos poblaciones.

Por medio del Análisis de Varianza (ANOVA), se comprueba si dos o más promedios de dos o más grupos de datos son similares o existe alguno que difiera significativamente de los demás (Yáñez, 2007).

Se llevó a cabo además el Test de Duncan para comparar el grado de similitud en la expresión de los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, involucrados en la biosíntesis de antocianinas y la relación entre las dos poblaciones, puesto que dicha prueba estadística sirve para probar todas las diferencias entre medias y cuya exigencia que hay que tomar en cuenta, es que el número de repeticiones sea constante.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CURVA ESTÁNDAR DE *Vaccinium floribundum* CON EL GEN GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA.

Se generó la curva estándar a partir de las concentraciones de cDNA de *V. floribundum* con el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Esta se convirtió en la curva control para la cuantificación de los genes de interés: chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Estas muestras, además, se utilizaron como controles positivos en las siguientes corridas de la RT-qPCR.

La Curva Estándar generada fue efectiva ya que se obtuvo una eficiencia de 2.121 puntos y un error de 0.202 puntos, los cuales se encuentran en los rangos aceptables que requiere el termociclador LightCycler 2.0, con lo que se concluye que los datos obtenidos son confiables.

La figura 5, muestra gráficamente la curva, en la que el eje de las X representa la concentración logarítmica de los datos de las diluciones seriadas que fueron obtenidas con anterioridad en el Qubit, el eje de las Y representa el CP o crossing point en el que las muestras generaron la amplificación; la recta de color azul es la línea de tendencia entre los dos ejes y representa la normalización de la curva.

Como en el trabajo de Jaakola *et al.*, (2002) en bilberry y Martz *et al.*, (2010) para *V. myrtillus*, el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa es uno de los genes que permiten la

normalización de una curva estándar y genera datos confiables, lo cual se pudo comprobar en vista que este gen presenta las concentraciones más elevadas con respecto a los otros.

5.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA, CHALCON SINTASA, DIHIDROFLAVONOL 4-REDUCTASA, ANTOCIANIDIN SINTASA EN LA ESPECIE *Vaccinium floribundum*.

En la tabla 2, se puede observar cada una de las concentraciones que se obtuvo de los cuatro genes para las muestras colectadas en la población de Machachi, así como también sus promedios y en la tabla 3 las concentraciones y resultados para la población de Pintag.

En los dos casos, el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa presenta las concentraciones más elevadas con un promedio de 648.59 ng/uL para Machachi y 667.32 ng/uL para Pintag, por lo cual al igual que Martz *et al.*, (2010) confirmamos que este es el gen control.

El gen chalcon sintasa es el que sigue en concentración en las dos poblaciones; con un promedio de 143.71 ng/uL para el caso de Machachi y 157.22 ng/uL para Pintag, luego el gen dihidroflavonol 4-reductasa con un promedio de 59.58 ng/uL para Machachi y 60.42 ng/uL para la población de Pintag y finalmente el gen antocianidin sintasa con un promedio de 39.29 ng/uL para la población de Machachi y 44.40 para Pintag. En la investigación de Viljoen *et al.*, (2013) en *Clivia miniata*, se encontró que existe una alta correlación en la expresión de chalcon sintasa y dihidroflavonol 4-reductasa que sugiere que estos genes están sujetos a

coordinar la regulación de antocianinas en la especie, es decir que los dos genes tienen acción directa en el proceso de traducción regulando los productos finales.

En la Figura 6, se puede observar una de las repeticiones para las curvas de amplificación de los cuatro genes de la población de Machachi, esta curva es inversamente proporcional a la concentración ya que mientras la curva se eleva en un ciclo menor, la cantidad del objetivo será mayor.

Se observan cuatro curvas que representan los cuatro genes en estudio, más la curva del control negativo, ésta es la de color azul que se observa casi lineal hasta el final de la corrida sin punto Cp. La curva de color verde representa el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa con un punto Cp de casi 27 ciclos presenta una concentración de 727.10 ng/uL; la curva roja representa el gen chalcon sintasa con un Cp de 38 ciclos presenta una concentración de 120.20 ng/uL; la curva de color café representa el gen dihidroflavonol 4-reductasa con un Cp de 47 ciclos presenta una concentración de 52.70 ng/uL y finalmente la curva negra representa el gen antocianidin sintasa con un Cp de 60 ciclos presenta una concentración de 39.40 ng/uL.

En la Figura 7 se muestra una de las repeticiones de las curvas de amplificación de los cuatro genes de la población de Pintag, más la curva de color azul que se observa casi lineal hasta el final de la corrida sin punto Cp, es el control negativo.

La curva de color verde representa el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa con un punto Cp de casi 25 ciclos presenta una concentración de 780 ng/uL; la curva celeste

representa el gen chalcon sintasa con un Cp de 32 ciclos presenta una concentración de 189.90 ng/uL; la curva de color café representa el gen dihidroflavonol 4-reductasa con un Cp de 46 ciclos presenta una concentración de 56 ng/uL y finalmente la curva negra representa el gen antocianidin sintasa con un Cp de 59 ciclos presenta una concentración de 44.30 ng/uL.

En las dos poblaciones, el gen antocianidin sintasa es el que presenta el nivel de expresión más bajo. Es posible que, como expresa Aguilera *et al.*, (2011), algunos frutos pertenecientes a la familia de las Rosaceas, Vitaceae, Solanaceae, Ericaceae y Passifloraceae son ricos en antocianinas, pero por ejemplo en el caso del mortiño particularmente la delfinidina es codificada por otro gen, el F3'5'H (flavonoide 3'5'-hidroxilasa) y es un compuesto precursor importante que podría encontrarse en mayor proporción en comparación con la antocianidin sintasa (Efrose *et al.*, 2010).

5.3. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LAS DOS POBLACIONES DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA.

5.3.1 FACTORIAL 4X2

Utilizando el programa Infostat se realizó el análisis entre los cuatro genes y las dos poblaciones, cuyos resultados se muestran en la tabla 4. No hay diferencias significativas entre las dos poblaciones de estudio con $F = 0.47$ y un $p = 0.4965$, con un nivel de confianza del 95%. Estos resultados coinciden con la investigación de Rui *et al.*, (2011) y Wang, L *et al.*, (2014), quienes comprobaron que la concentración de antocianinas y flavonoides en las bayas de *Vaccinium uliginosum* de siete localidades en las montañas de Khingan aumentaban únicamente cuando existía una variación amplia en la altitud.

En el análisis de los genes para las dos poblaciones, en la tabla 4 se muestra una diferencia altamente significativa con $F = 433.24$ y un $p < 0.0001$, con un nivel de confianza del 95%. Estos datos concuerdan con las observaciones de Jaakola *et al.*, (2002) en bilberry, donde en las primeras etapas de desarrollo de la baya, la procianidina y la quercetina fueron los principales flavonoides, pero sus niveles disminuyeron drásticamente durante el progreso de maduración y durante las últimas etapas de ésta. El contenido de antocianinas aumentó fuertemente y fueron los principales flavonoides en la baya madura. Por tanto, se observa una correlación entre la acumulación de antocianinas y la expresión de los genes de la vía de los flavonoides durante la maduración de las bayas.

Cada uno de los genes presenta una función determinante en cada etapa de crecimiento y maduración de la especie y realizando el presente análisis entre las dos poblaciones se puede concluir que en la etapa de maduración cuando el fruto presenta una coloración violeta oscura y mide alrededor de 1cm de diámetro los genes que más se expresan son gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y chalcon sintasa.

En la ruta biosintética de las antocianinas en plantas, se observa en la Figura 3 que una de las enzimas que primero se produce es CHS (chalcon sintasa), luego DFR (dihidroflavonol 4-reductasa) y al final ANS (antocianidin sintasa), con lo que se podría asumir que la expresión génica es directamente proporcional a la formación de las mismas; es decir se presentará una expresión diferencial en la concentración según el estadio de la planta y según la especie (Rouholamin *et al.*, 2015).

Los genes reguladores de antocianinas se encontraron por primera vez en *Zea mays* y luego en muchas otras especies tales como *Arabidopsis*, boca de dragón, petunia y granada. Los resultados de este estudio mostraron que el perfil de expresión de G3P gen regulador es diferente con respecto a los otros tres genes, lo que sugiere que esta proteína puede promover la coloración del mortiño. Por otra parte, se puede concluir que las poblaciones con fenotipos de frutos de colores similares tienen un nivel de expresión génica similar entre estos cuatro genes (Rouholamin *et al.*, 2015).

Los genes estructurales se pueden agrupar en dos grandes conjuntos respecto a la posición en la vía y la regulación de la expresión, al principio de la biosíntesis genes como: CHS, CHI y F3H y los genes biosintéticos finales tales como los genes DFR y ANS. Como CHS, CHI y F3H son necesarios para la síntesis de precursores de antocianidina y derivados de flavona y de flavonoles, el resultado de esta investigación podría ser debido al hecho que los frutos contenían más de estos derivados. En contraste, genes biosintéticos finales se encontraban en menor concentración y podría ser por el hecho de que estos genes sólo son necesarios para la síntesis de antocianinas y proantocianidinas (Yuan *et al.*, 2013).

En la tabla 5, los resultados del test de Duncan con un nivel de confianza del 95%, donde se realizó una comparación de medias mostraron que las dos poblaciones, Machachi y Pintag, son consideradas como un solo grupo A, ya que no son significativamente diferentes; mientras que, la comparación entre los genes, tabla 6, presentó tres grupos: antocianidin sintasa y dihidroflavonol 4-reductasa formaron el grupo A por la baja concentración que se encontró, chalcon sintasa formó el grupo B y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa formó el grupo C ya que presentó una alta concentración.

En la tabla 4, en el ANOVA para el análisis de población por gen se obtuvo un $F = 0.08$ y un $p = 0.9688$, con un nivel de confianza del 95%, el cual indica que no existe diferencias significativas entre este modelo. Chen *et al.* (2012) y Wang, L. *et al.*, (2014), declaran que los altos niveles de antocianinas se presentan en base a factores internos como es el grado de maduración y externos como humedad, temperatura y luz los cuales pueden ser promotores o inhibidores de los factores de transcripción involucrados en la biosíntesis de antocianinas.

En comparación con otras especies Deighton *et al.*, (2000), por ejemplo menciona que *Rubus niveus* posee alto contenido de antocianinas (1.186 g/kg) solamente proveniente del jugo y que aumenta según el grado de maduración. La mora posee una capacidad antioxidante superior al de otras frutas y se considera que el mortiño, otro fruto rico en antocianinas presenta mayor concentración en mg/L que otros extractos obtenidos por ejemplo la flor de Jamaica o el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*).

Con esta investigación se comprueba que hay una similitud en la expresión de los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa entre las poblaciones de *V. floribundum* y que los niveles de expresión de genes están asociados a factores internos y también a los externos de cada especie. Con todo esto y conociendo que la variabilidad y diversidad génica entre poblaciones es muy importante para evitar su extinción, se cree de vital importancia considerar un plan de manejo de esta especie en los páramos ecuatorianos (Sexton, 2002). Según la Constitución de la República del Ecuador, una de las más verdes del planeta, respalda a la biología de la conservación en vista que presenta en su Art. 14.- “Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad

del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados (CRE, 2008).

5.3.2 TEST DE DUNCAN

Para corroborar los datos obtenidos en el análisis de la varianza (ANOVA), se utilizó un test de Duncan, con un nivel de confianza del 95%. En la Figura 8 se puede observar gráficamente las barras A para los genes antocianidin sintasa y dihidroflavonol 4-reductasa que están asociados por presentar bajas concentraciones promedio de cDNA, la barra B para chalcon sintasa y la barra C gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa que presenta altas concentraciones de cDNA. Los resultados indican tres grupos discretos similares a los del ANOVA.

5.4 CONCLUSIONES

Se logró cuantificar en *V. floribundum* los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa involucrados en la biosíntesis de antocianinas, en dos poblaciones de la Provincia de Pichincha, obteniendo resultados confiables gracias a la estandarización del protocolo y el correcto y aséptico trabajo en el laboratorio.

Se acepta la hipótesis alternativa, la cual menciona que: En *V. floribundum* se expresan en diferentes niveles los genes chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, antocianidin sintasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa involucrados en la biosíntesis de antocianinas nativas en dos poblaciones de la Provincia de Pichincha.

Se generó una curva estándar por medio de las concentraciones de cDNA con parámetros adecuados, que permitió llegar a evaluar la cantidad de antocianinas que contiene *V. floribundum*.

Se concluye que no existen diferencias significativas entre las poblaciones, pero si entre los genes objeto de estudio, al comparar los niveles de expresión de los genes para antocianinas en las poblaciones de Machachi y Pintag para *V. floribundum*.

El uso de la biología molecular como herramienta de gestión de la biodiversidad permite fundamentar la conservación y el monitoreo de las especies endémicas y poblaciones naturales, al aportar a la toma de decisiones para la preservación de las mismas.

Vaccinium floribundum, es reserva de antocianinas en los páramos y presenta una expresión diferencial entre los genes estudiados. Con mayores análisis con respecto a la función de cada uno de estos y otros genes, se podría llegar a confirmar la importancia de la preservación de esta especie.

La cuantificación de la expresión de los genes reguladores y estructurales del mortiño, que codifican para antocianinas en el fruto, ofrece información importante sobre la estructura genética, lo cual permite implementar programas de conservación para la especie. Además,

estos resultados aportarán para la gestión del cultivo y la ingeniería de antocianinas para la producción de colorantes y otros sinnúmeros de productos.

5.5 RECOMENDACIONES

Analizar la factibilidad de otros proyectos relacionados con la expresión génica en diferentes estadios de la fruta y en otras especies de interés comercial, industrial, biomédical y de conservación.

Realizar mayor investigación con respecto a la expresión de cada uno de los genes que codifican para antocianinas en mortiño, en vista de su alta importancia como biomoléculas antioxidantes, anticancerígenas y para la conservación de ésta y otras especies.

Generar análisis de funcionalidad de proteínas, para poder abarcar datos de proteómica en el país y sustentar con más fundamentos la conservación de especies nativas o endémicas con reservas de antocianinas u otros compuestos fenólicos.

Hay que tomar en cuenta también, que existen algunos factores de transcripción que actúan como reguladores de la biosíntesis en las vías de las proantocianidinas y antocianinas que hay que seguir estudiando.

6. LITERATURA CITADA

- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., Meza J. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. Vol XIII, Num 2: 16 - 22.
- Almarza, J. 2002. Determinación de los niveles de expresión del gen (ans) de la antocianidina sintetasa en cultivares criollo e híbrido de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de los Andes. Merida, Venezuela.
- Akagi, T., Ikegami, A., Tsujimoto, T., Kobayashi, S., Sato, A., Kono, A., Yonemori K. 2009. DkMyb4 Is a Myb Transcription Factor Involved in Proanthocyanidin Biosynthesis in *Persimmon Fruit*. *Plant Physiol*. Vol. 151: 2028–2045.
- Bonilla, E., Párraga, M., López, L., Escolar, F., del Mazo, J. 2002. Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real. *Bioquímica*. Vol. 27, Num 1: 3- 7.
- Chen, Q., Yu, H., Tang, H., Wang, X. 2012. Identification and expression analysis of genes involved in anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis in the fruit of blackberry. *Scientia Horticulturae*, 141: 61–68.
- Chiluisa-Utreras, V., Coba, J., Echeverría, A. 2014. Determinación por PCR en Tiempo Real de *Escherichia coli* en muestras de comida rápida. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 19(1): 44-50. ISSN: 1390-3799.
- Cobo, M., 2014. Estudio de diversidad genética de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) en tres provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi. Tesis de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos. Universidad San Francisco de Quito. Pichincha, Ecuador.
- Constitución de la República del Ecuador 2008. Asamblea Nacional. Extraído de http://www.asambleanacional.gob.ec/documentos/constitucion_de_bolsillo.pdf. 20 de Octubre de 2014.
- Dao, T., Linthorst, H., Verpoorte, R. 2011. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev* 10 (3): 397–412.

- Deighton, N., Brennan, R., Finn, C., Davies, H., 2000. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol 80, Num 9: 1307 - 1313.
- Del Valle, G., González, A., Báez, R. 2005. Antocianinas en Uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol 28 (4): 359-368.
- De los Santos, M., Zapperi, P. 2009. El cambio climático y sus implicancias territoriales en Machachi. Instituto Panamericano de Geografía e Historia. Extraído de www.cepeige.org/Revista3/El%20CAMBIO%20CLIMATICO%203.pdf. 24 de Enero de 2015.
- Efrosee, R., Ciobotari, G., Morariu, A., Pascu, D., Branza, M., Sfichi-Duke L. 2010. The use of qRT-PCR approach for comparative phenylpropanoid gene expression studies in two *Rubus* spp. Romania: POS CCE.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., De Freitas, V., Mateus, N. 2014. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of functional foods* 7: 54–66.
- Garzón, G. 2008. Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión. *Acta biol. Colomb*, 27 - 36.
- Gaviria, C., Cifuentes, O. 2003. Evaluación de la capacidad antioxidante y del poder de tinción de extractos metanólicos de algunas frutas tropicales. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Gobierno de la Provincia de Pichincha. 2015. Caracterización Cantonal y Parroquial: Provincia de Pichincha. Quito – Ecuador. Extraído de www.ecuadornoticias.com/2015/05/mapa-de-la-provincia-de-pichincha.html. 17 de Abril de 2015.
- Guerra, M., Ortega, G. 2006. Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. *ICIDCA N.2. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 35 - 44.

- Hanna, S., Connor, C., Wang, H. 2005. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science* 70 (3): 49-53.
- Hernández, M., Lobo, M., Medina, C., Cartagena, J., Delgado, O. 2009. Comportamiento de la germinación y categorización de la latencia en semillas de mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). Redalyc.org.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes & Immunity*, 279 - 284.
- Jaakola, L. 2013. New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in Plant Science*. Vol 18 (9): 477 – 483.
- Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A., Torronen, R., Karenlampi, S., Hohtola A. 2002. Expression of Genes Involved in Anthocyanin Biosynthesis in Relation to Anthocyanin, Proanthocyanidin, and Flavonol Levels during Bilberry Fruit Development. *American Society of Plant Biologists*. Vol 130 (2): 729 – 739.
- Katsumoto., Y. 2007. Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin. *Plant Cell Physiol*. 48 (11): 1589–1600.
- Knoke, T., Calvas, B., Aguirre, N., Román-Cuesta, R., Günter, S., Stimm, B., Weber, M., Mosandl, R. 2009. Can tropical farmers reconcile subsistence needs with forest conservation? *Frontiers in Ecology and the Environment* 7: 548–554.
- Kramer, A., Havens, K. 2009. Plant conservation genetics in a changing world *Trends in Plant Science*. Vol 14 (11): 599 – 607.
- Kruger, M., Davies, N., Myburgh, K., Lecour, S. 2014. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. *Food Research International* 59: 41–52.
- Kubista, M., Andrade, J., Bengsston, M., Foorotan, M., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sthåhlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, Vol 27: 95-125.

- Leyva, D. 2009. Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Tesis de Ingeniería en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.
- Li, X., Sun, H., Pei, J., Dong, Y., Wang, F., Chen, H., Sun, Y., Wang, N., Li, H., Li, Y. 2012. De novo sequencing and comparative analysis of the blueberry transcriptome to discover putative genes related to antioxidants. *Gene* 511: 54–61.
- Lodish, H., Berk, Matsudaria, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2006. *Biología Celular y Molecular*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Martínez-Cruz, N., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M., Morales-Rubio, M. 2011. Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl. (zarzamora). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Vol 42, Num 4: 66-71.
- Martz, F., Jaakola, L., Julkunen-Tiitto, R., Stark, S. 2010. Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Leaves in Northern Europe Following Foliar Development and Along Environmental Gradients. *J Chem Ecol*.
- Ministerio de Defensa Nacional 2013. Memoria Técnica Cantón Mejía. Generación de geoinformación para la gestión del territorio a nivel nacional escala 1:25.000. Clima e hidrología. Extraído de app.sni.gob.ec. 17 de Marzo de 2015.
- Mullis, K., Faloona, F. 2006. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Nascimento, L., Stringheta, P., Alves, F. 2008. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres* 55(4): 297-304.
- Norberto, S., Silva, S., Meireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C. 2013. Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *Journal of Functional Foods* 5: 1518 –1528.
- Primack, R., Rozzi, R., Feinsinger, P. 2001. *Fundamentos de Conservación Biológica. Perspectivas Latinoamericanas*.
- Reed, B., Brennan, R., Benson E. 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application. *SIDALC*: 470-472. ISBN 92-9043-428-7.

- Rivas, F. 2010. Análisis de la expresión del gen PR-1, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Rodríguez, D. S. 2006. Análisis de datos de Expresión Genética mediante técnicas de Biclustering. Extraído de <https://www.lsi.us.es/docs/doctorado/memorias/Memoria-v2.pdf>. 7 de Diciembre de 2014.
- Roldán, S. 2012. Caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del mortño (*Vaccinium floribundum* Kunth) de la comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi. Tesis de Ingeniería Agroindustrial. Escuela Politécnica Nacional. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Rouholamin, S., Zahedi, B., Nazarian-Firouzabadi, F., Saei, A. 2015. Expression analysis of anthocyanin biosynthesis key regulatory genes involved in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Scientia Horticulturae* 186: 84–88.
- Rui, L., Ping, W., Qing-qi, G., Zhen-yu W. 2011. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry. *Food Chemistry* 125: 116–120.
- Sánchez-Otero, J. 2013. Introducción al Diseño Experimental. Impreso en Ecuador.
- Sexton, D. 2002. Gestión Social de los Recursos Naturales y Territorios. Consorcio Camaren. CICDA.
- Schreckinger, M., Wang, J., Yousef, G., Lila, M., Gonzalez de Mejía, E. 2010. Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J. Agric. Food Chem*, 58 (16): 8966–8976.
- Thieman, W. 2010. Introducción a la Biotecnología pp. 46 - 47. Madrid – España, PEARSON.
- Thomsen, P., Willerslev E. 2014. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*. Elsevier.
- Valasek, M., Repa J. 2005. "The power of real-time PCR". *Adv Physiol Educ* 29 (3): 151-159.

- Valencia, C. 2011. Estudio edafológico y agrológico con fines de planificación agropecuaria en la hacienda “La Valencia” ubicada en la parroquia Pintag, cantón Quito, provincia de Pichincha. Tesis de Ingeniería Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 111: 816–823.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., Kamal-Eldin, A. 2009. Chemical Composition and Phenolic Compound Profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) *J. Agric. Food Chem* 57: 8274–8281.
- Viljoen, C., Snyman, M., Spies, J. 2013. Identification and expression analysis of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase in *Clivia miniata*. *South African Journal of Botany* 87: 18–21.
- Vinueza-Burgos, C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *Revista Electrónica de Veterinaria*. Vol 10, N.2: 1 - 13.
- Wang, L., Su, S., Wu, J., Du, H., Li, S., Huo, J., Zhang, Y., Wang, L. 2014. Variation of anthocyanins and flavonols in *Vaccinium uliginosum* berry in Lesser Khingan Mountains and its antioxidant activity. *Food Chemistry* 160. 357–364.
- Wang, Z., Jiang, C., Wen, Q., Wang, N., Tao, Y., Xu, L. 2014. Deep sequencing of the *Camellia chekiangoleosa* transcriptome revealed candidate genes for anthocyanin biosynthesis. *Gene* Vol 538 (1): 1-7.
- Wilhelm, J., Pingoud, A. (2003). Real-Time Polymerase Chain Reaction. *ChemBioChem*, 1120 - 1128.
- Wong, M., Medrano, J. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques* Vol 39: 1-11.
- Yáñez, P. 2007. Biometría y Bioestadística: Analizando la Estructura Numérica de la Información en Proyectos Biológicos y Ecológicos. Universidad Politécnica Salesiana. Quito – Ecuador.

- Yuan, Y., Ma, X., Shi, Y., Tang, D. 2013. Isolation and expression analysis of six putative structural genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Tulipa fosteriana*. *Scientia Horticulturae* 153: 93–102.
- Zhang, D., Gao, L., Yang, Y. 2010. Genetic diversity and structure of a traditional Chinese medicinal plant species, *Fritillaria cirrhosa* (Liliaceae) in southwest China and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 236–242.
- Zhang, Y., Butelli, E., Martin, C. 2014. Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 19:81–90.

7. FIGURAS



Figura 1. Planta de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), en su hábitat natural en el páramo de Machachi.

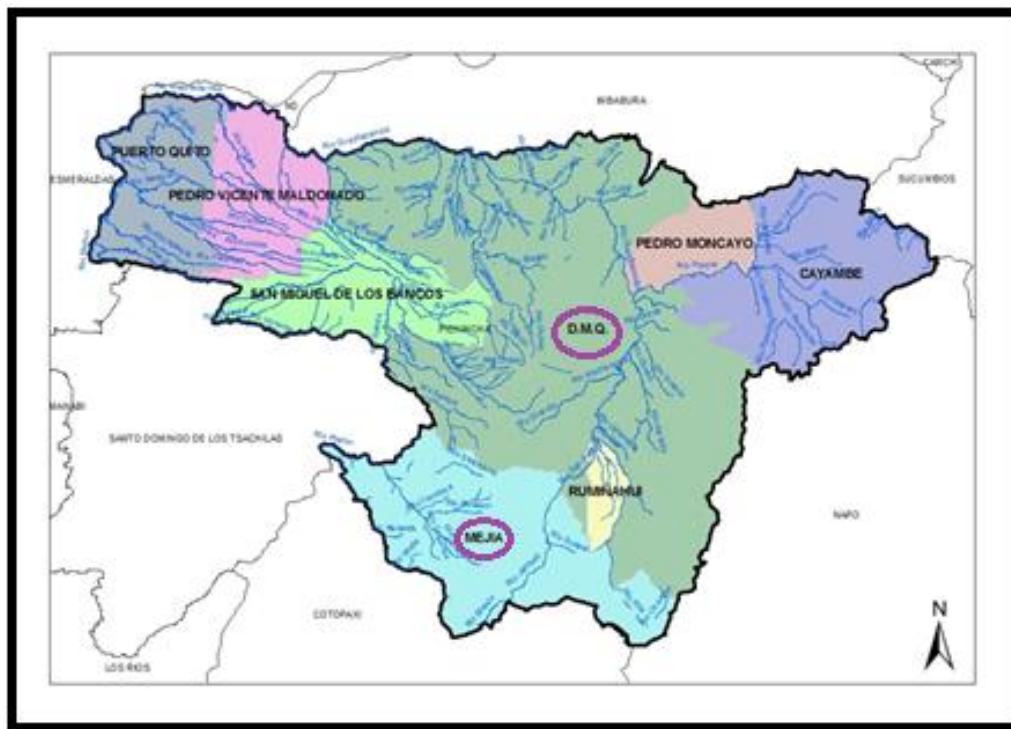


Figura 2. Provincia de Pichincha, cantón Mejía, población de Machachi y cantón Quito, población de Pintag, delimitada con su red hídrica, en escala 1:25.000 (Gobierno de Pichincha, 2015).

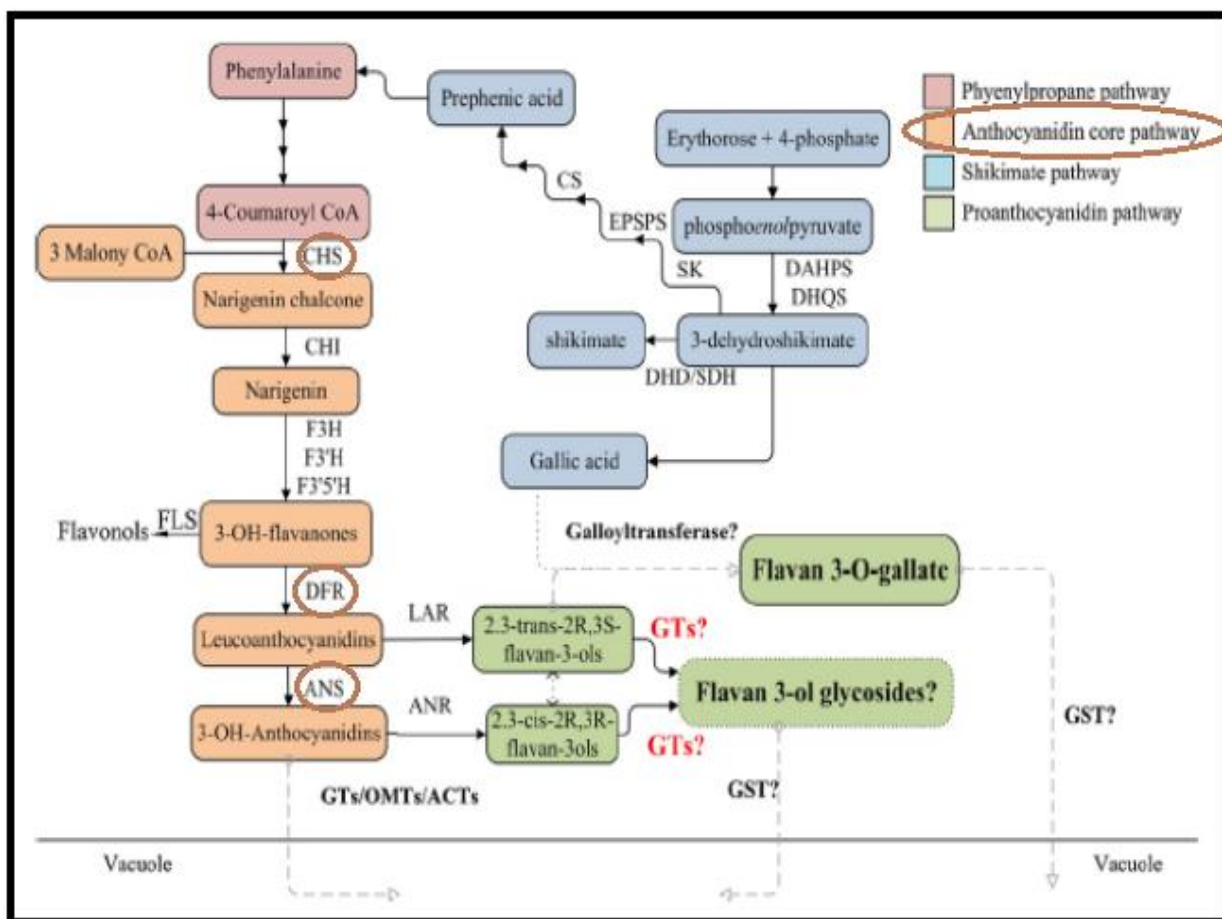


Figura 3. Ruta biosintética de las antocianinas en plantas a partir de la molécula de fenilalanina, que pasa por la vía del fenilpropanoide. Enzimas implicadas en la investigación: CHS (chalcon sintasa), DFR (dihidroflavonol 4-reductasa), ANS (antocianidin sintasa) (Chen *et al.*, 2012).

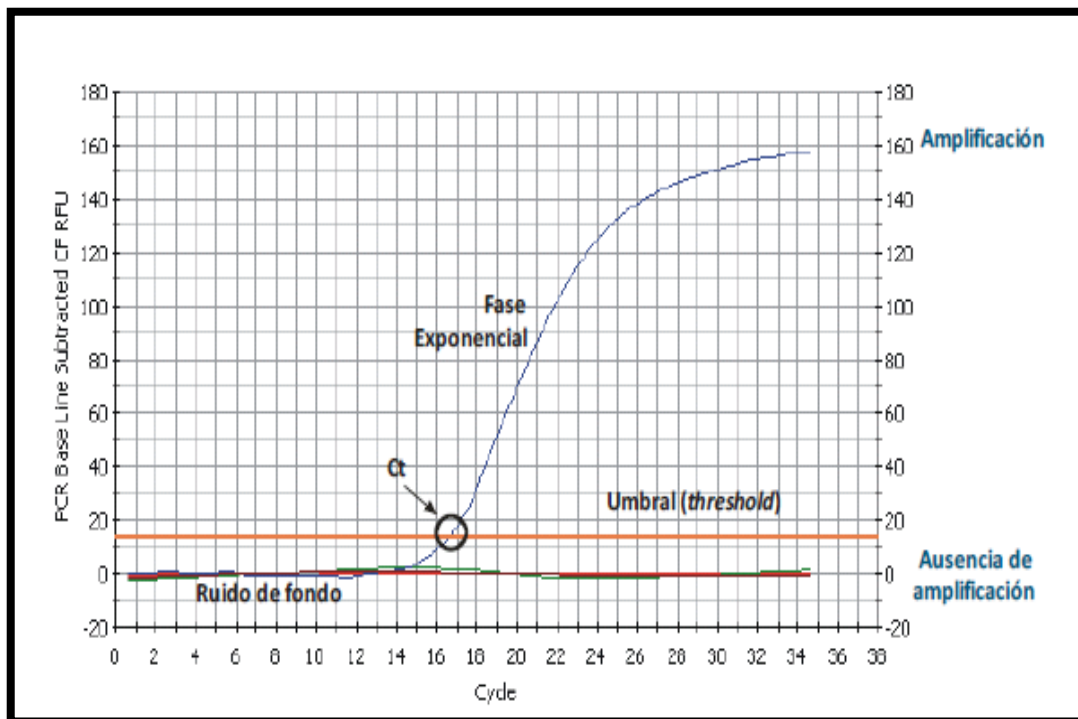


Figura 4. Curva de Amplificación para detección y cuantificación de PCR en Tiempo Real, punto Ct o Cp donde se define el número de ciclos por fluorescencia (Hanna *et al.*, 2005).

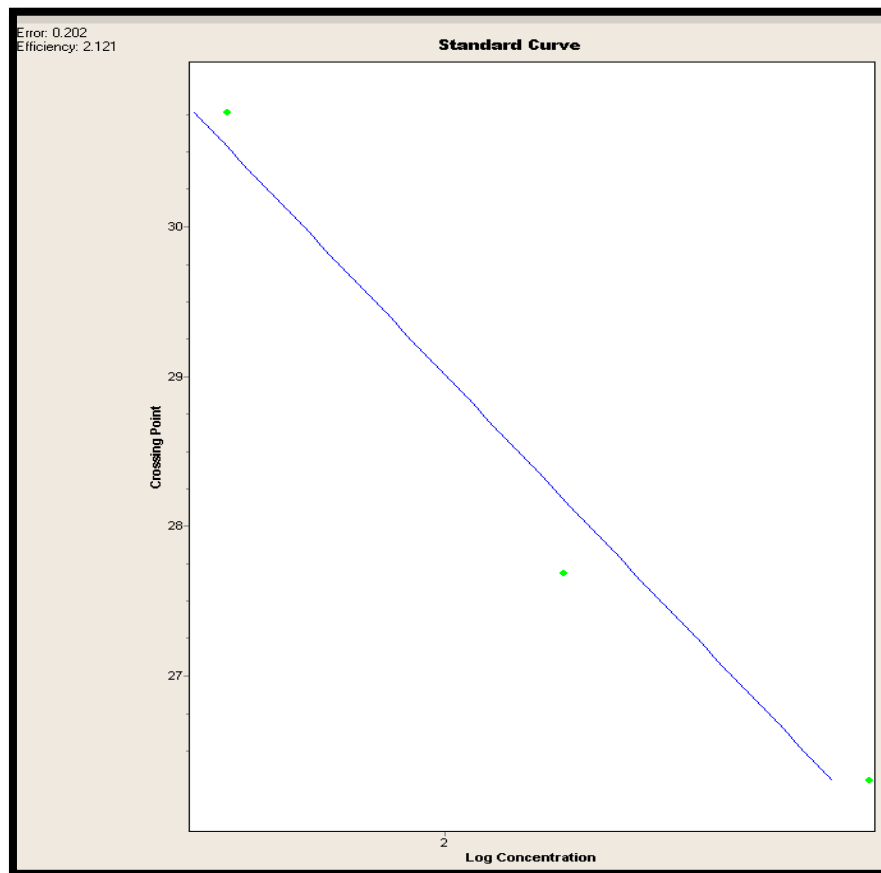


Figura 5. Curva Estándar para *V. floribundum* con el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, los puntos verdes son concentraciones conocidas: altas, medias y bajas de las diluciones seriadas del cDNA como control positivo para el cálculo de la misma. Error y eficiencia en parámetros adecuados.

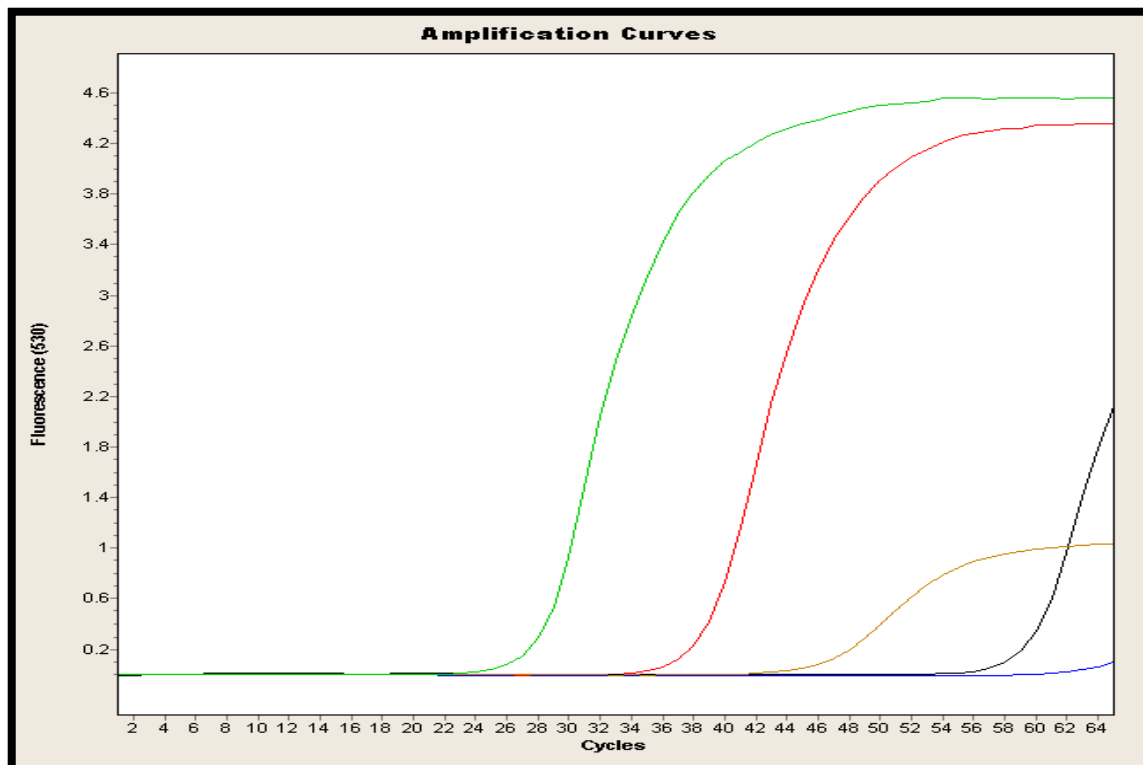


Figura 6. Curvas de Amplificación de los cuatro genes de la población de Machachi: curva verde representa al gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, la curva roja el gen chalcon sintasa, la curva de color café el gen dihidroflavonol 4-reductasa, la curva negra representa el gen antocianidin sintasa y la azul es el control negativo del ensayo.

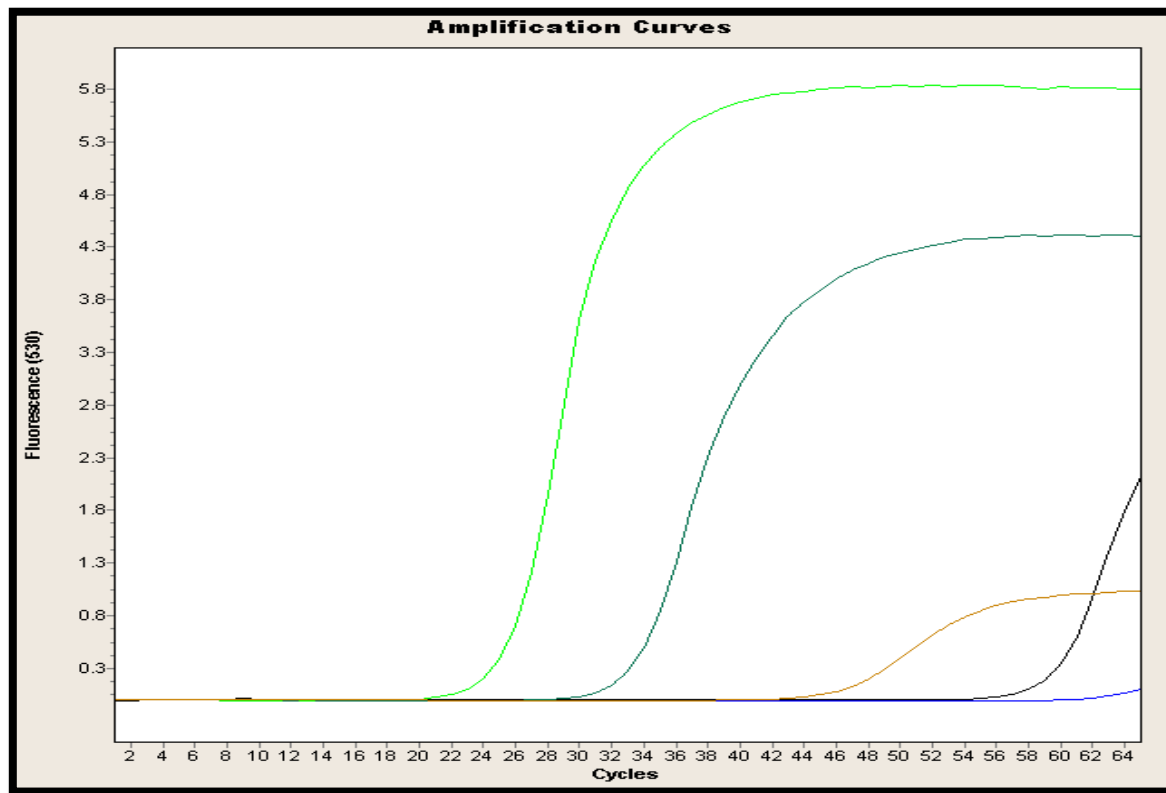


Figura 7. Curvas de Amplificación de los cuatro genes de la población de Pintag: curva de color verde representa el gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, la curva celeste el gen chalcon sintasa, la curva café el gen dihidroflavonol 4-reductasa, la curva negra representa el gen antocianidin sintasa y la azul es el control negativo del ensayo.

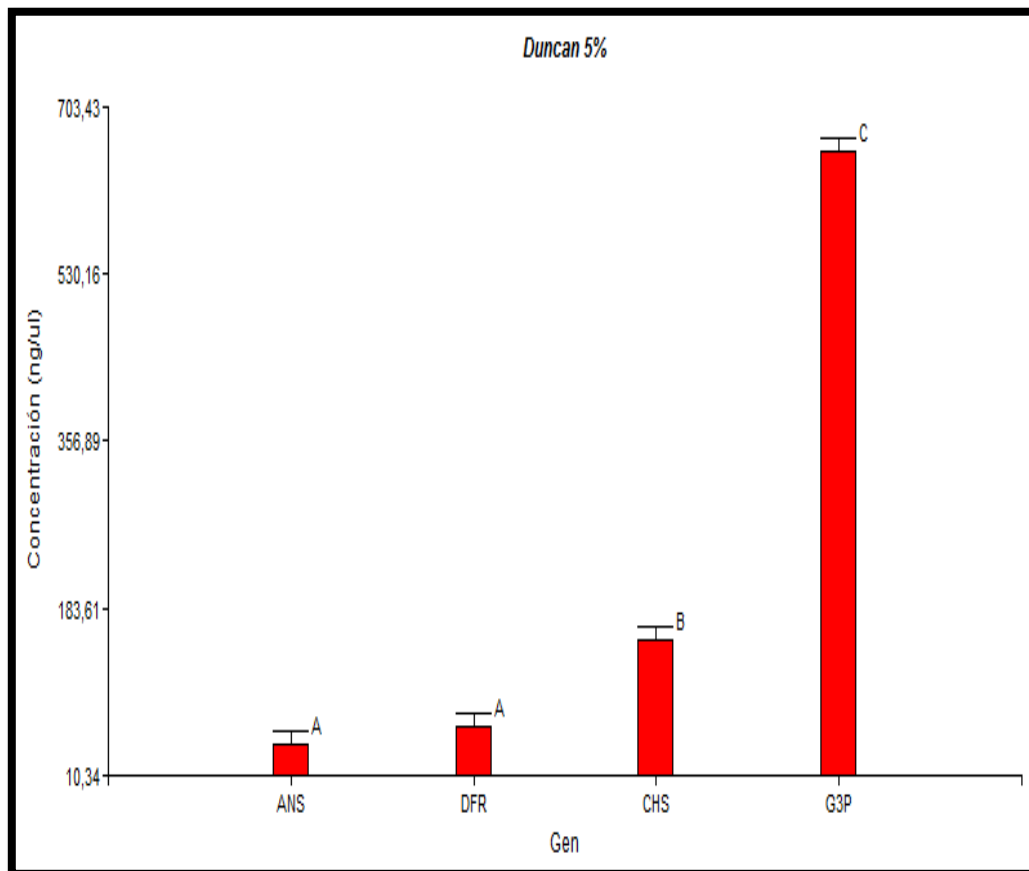


Figura 8. Test de Duncan para comparación de medias según las concentraciones de cDNA de genes en ng/ml. Se muestran tres asociaciones, A: gen antocianidin sintasa (ANS) y gen dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), B: chalcon sintasa (CHS) y C: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3P).

8. TABLAS

Tabla 1. Secuencias de cebadores forward y reverse de cada uno de los cuatro genes analizados: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, dihidroflavonol 4-reductasa, chalcon sintasa y antocianidin sintasa (Martz *et al.*, 2010).

Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	
Forward	Reverse
5' CAAACTGTCTTGCCCCACTT 3'	5' CAGGCAACACCTTACCAACA3'
Dihidroflavonol 4-reductasa	
Forward	Reverse
5' GAAGTGATCAAGCCGACGAT 3'	5' ATCCAAGTCGCTCCAGTTGT3'
Chalcon sintasa	
Forward	Reverse
5' CCAAGGCCATCAAGGAATG 3'	5'TGATACATCATGAGTCGCTTC3'
Antocianidin sintasa	
Forward	Reverse
5' TCTTCTACGAGGGCAAATGG 3'	5' ACAGCCCATGAAATCCTGAC3'

Tabla 2. Concentraciones (ng/uL) de cDNA de la población de *V. floribundum* de Machachi de los cuatro genes: chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, antocianidin sintasa y sus promedios.

Machachi				
GENES				
	Chalcon	Dihidroflavonol 4-	Gliceraldehído 3-	Antocianidin
Repeticiones	sintasa	reductasa	fosfato deshidrogenasa	Sintasa
1	120.20	52.70	727.10	39.40
2	163.20	54.27	720.80	36.50
3	160.40	57.06	627.00	33.60
4	210.88	58.20	401.00	38.30
5	120.00	54.26	639.00	57.70
6	145.50	56.35	633.00	48.30
7	124.00	52.77	459.90	20.00
8	130.00	51.30	712.60	35.80
9	143.60	73.20	739.70	48.80
10	119.30	85.72	825.80	34.50
Promedio	143.71	59.58	648.59	39.29

Tabla 3. Concentraciones (ng/uL) de cDNA de la población de Pintag de *V. floribundum* de los cuatro genes: chalcon sintasa, dihidroflavonol 4-reductasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, antocianidin sintasa y sus promedios.

Pintag				
GENES				
	Chalcon	Dihidroflavonol	Gliceraldehído 3fosfato	Antocianidin
Repeticiones	sintasa	4-reductasa	deshidrogenasa	Sintasa
1	189.90	56.00	780.00	44.30
2	130.00	59.00	823.00	42.30
3	140.00	55.50	596.00	44.20
4	160.00	41.60	560.00	39.90
5	199.54	51.30	573.00	40.80
6	155.50	58.35	653.00	50.30
7	144.00	72.77	479.90	40.00
8	160.40	55.70	732.60	38.80
9	163.60	78.20	749.90	58.80
10	129.30	75.82	725.80	44.60
Promedio	157.22	60.42	667.32	44.40

Tabla 4. Resultados estadísticos del Factorial 4X2: ANOVA con un nivel de confianza del 95%. Población por gen.

CUADRO DE ANÁLISIS DE LA VARIANZA				
F.V.	SC	CM	F	p-valor
Modelo	5077773.22	725396.17	185.78	< 0.0001
Población	1823.76	1823.76	0.47	0.4965
Gen	5074971.65	1691657.22	433.24	< 0.0001
Población x Gen	97.81	325.94	0.08	0.9688
Error	281135.39	3904.66		
Total	5358908.62			

Tabla 5. Resultados estadísticos Test de Duncan con un nivel de confianza del 95%.
Poblaciones: Machachi y Pintag.

TEST DE DUNCAN ALFA = 0,05			
Población	Medias	N	E.E.
Machachi	222.79	40	9.88 A
Pintag	232.34	40	9.88 A

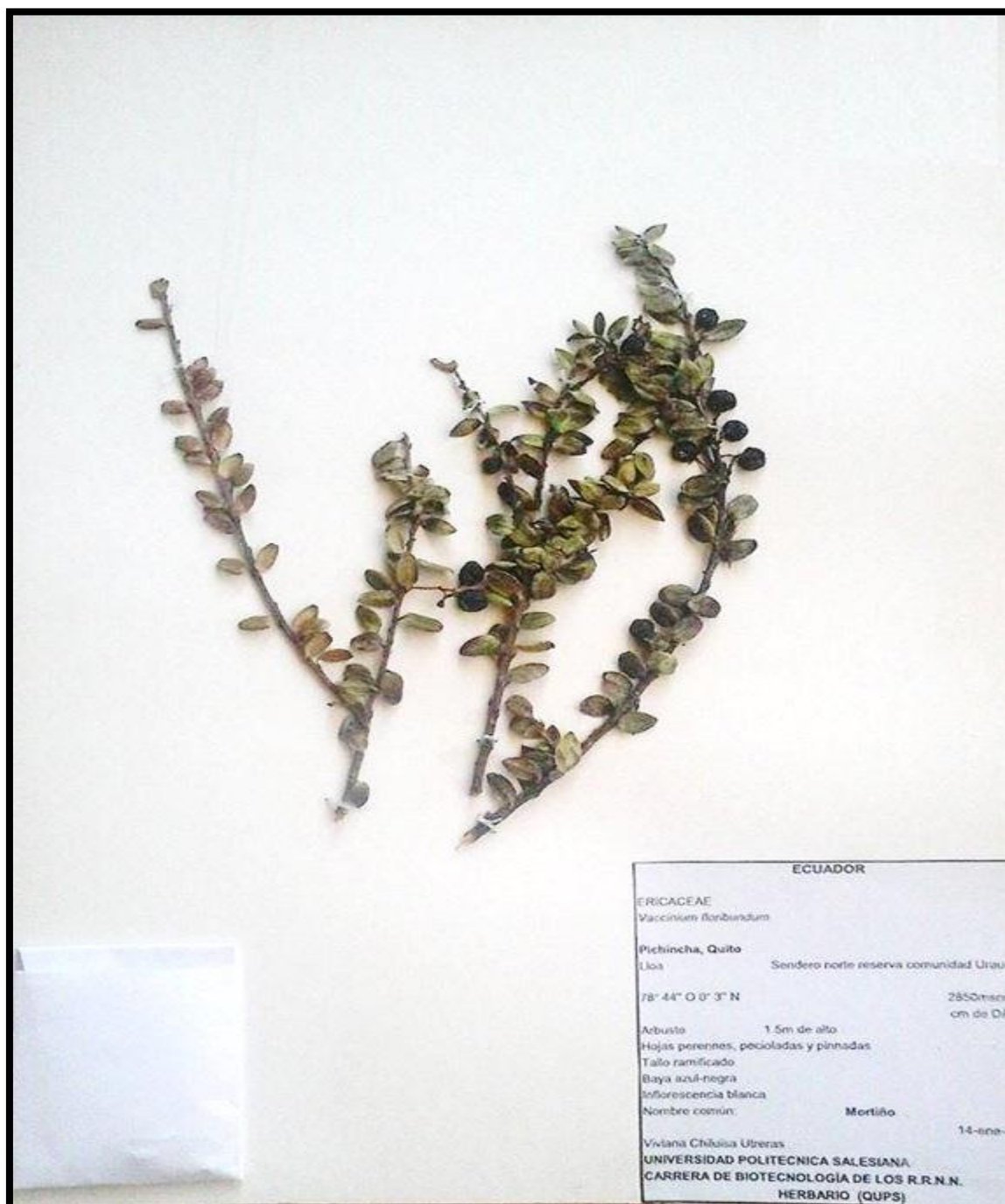
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 6. Resultados estadísticos Test de Duncan con un nivel de confianza del 95%. Genes: antocianidin sintasa (ANS), gen dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), gen chalcon sintasa (CHS) y gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3P).

TEST DE DUNCAN ALFA = 0,05			
Gen	Medias	N	E.E.
ANS	41.85	20	13.97 A
DFR	60.00	20	13.97 A
CHS	150.47	20	13.97 B
G3P	657.96	20	13.97 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

9. ANEXOS



Anexo 1. Planta de *V. floribundum* montada y etiquetada.



9 de marzo del 2015

CERTIFICACIÓN

Mediante la presente certifico que la muestra N° 001, colectada por la Ing. Viviana Chiluisa, colectada en Pichincha, Machachi; a 3200 msnm, corresponde a la especie:

***Vaccinium floribundum* Kunth**

ERICACEAE

Es todo cuanto puedo certificar y autorizo a la Ing. Viviana Chiluisa, hacer uso de este certificado.

Atentamente,



Dr. Marco Cerna
BIOLOGO – BOTANICO
DOCENTE INVESTIGADOR
UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES
Quito, Campus El Girón, Bloque "B" Isabel La Católica N23-52 y Madrid*PBX (02) 223-6175 Ext: 2606
Teléfono directo:(02) 3962878 * c-electrónico: mcerna@ups.edu.ec

Anexo 2. Certificación de la especie *V. floribundum* utilizada en la investigación.



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas

Email: ecb@puce.edu.ec
Av. 12 de Octubre 1076 y Roca
Apartado postal 17-01-2184
Telf: 2991.685
Fax: (593-2) 2991 687
Quito - Ecuador

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE MAESTRÍAS Y DOCTORADOS PhD

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Viviana Pamela Chiluisa Utreras, con CC # 171316825-8, autora del trabajo de graduación intitulado: “*Vaccinium floribundum* Kunth, reserva de antocianinas en los páramos”, previa a la obtención del grado académico de MAGÍSTER EN BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 8 de Octubre de 2015.

Viviana Pamela Chiluisa Utreras

171316825-8