

CS 2018.01.01.11

Bionatura Conference Series Vol 1. No 1. 2018

Publicación del IV CONGRESO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y
BIODIVERSIDAD IV CIBB y XV FORO INTERNACIONAL BANANERO

INVESTIGATION / RESEARCH

[Previos](#) / [Index](#) / [Next](#)

Identificación molecular del género *Passiflora* (*Passifloraceae*), en la región norte del Ecuador mediante el método DNA Barcoding

Molecular identification of the genus *Passiflora* (*Passifloraceae*), in the northern region of Ecuador using the DNA Barcoding method

Marco Cerna¹, Jorge Miño²

Available in : <http://dx.doi.org/10.21931/RB/CS/2018.01.01.11>

RESUMEN

El género *Passiflora* o también llamado flor de la pasión, en el Ecuador se tiene registros de 95 especies, en esta investigación se colectaron al azar muestras de especies de este grupo ubicados en la región norte del Ecuador en las provincias de: Pichincha, Santo Domingo, Napo, Tungurahua, Cotopaxi; en pisos altitudinales que van desde los 400 hasta los 2800 m.s.n.m, las muestras fueron identificadas a nivel de especie mediante comparación con vouchers del Herbario Nacional del Ecuador QCNE, para la identificación molecular se extrajo el ADN mediante el método de Doyle y Doyle, seguidamente se amplificó un segmento del gen *matK* mediante la técnica PCR convencional, los productos PCR fueron secuenciados mediante la técnica Sanger, las secuencias fueron analizadas con las herramientas Blast y Boldsystem para identificar a que especie corresponden, siendo Blast la mejor herramienta para identificación. A continuación se realizó un análisis filogenético utilizando los segmentos del gen *matK* y la información del segmento *rcbL* que está disponible en Genbank, se elaboraron 3 árboles uno por cada segmento y uno concatenando los árboles construidos por el segmento

matk y el concatenado muestran similitud en la agrupación de especies en concordancia con la morfología.

Palabras Clave: *Passiflora*, *matK*, *rbcL*, ADN Bardcoding

ABSTRACT

The name of the genus *Passiflora* means flower of passion, in Ecuador exist 95 species of this genus, in this research, we took samples at random in these species of this group present in the northern region of Ecuador which were: Pichincha, Santo Domingo, Napo, Tungurahua, Cotopaxi; in altitudinal floors ranging from 400 to 2800 meters above sea level, the samples we identified at the species level by comparison with vouchers of the National Herbarium of Ecuador QCNE, in the other hand about the molecular identification, the DNA was extracted by the Doyle y Doyle method, then we amplified a segment of the *matK* gene using the conventional PCR technique, PCR products were sequenced using the Sanger technique, the sequences were analyzed with the Blast and Boldsystem tools to identify which species they correspond to, Blast being the best tool for identification. Next, a phylogenetic analysis was performed using the segments *matK* gene and *rbcL* segment information that is available in Genbank, 3 trees were constructed one for each segment and one concatenating the trees constructed by the *matk* segment and the concatenated one show similarity in accordance with the morphology, while the segment *rbcL* presented a differences.

Key words: *Passiflora*, *matK*, *rbcL*, ADN Bardcoding

INTRODUCCIÓN

El género *Passiflora* es el más importante de la familia *Passifloraceae*, debido a su representatividad y al número de especies que agrupa, estas son nativas del Norte, Centro y Sur América, se distribuyen en zonas tropicales que llegan hasta los 3000 m.s.n.m. ¹

Existen 534 nombres de especies aceptadas, con un grado de confiabilidad medio del 81,1 % y 18,9 % con bajo grado de confiabilidad, esto revela la necesidad de revisar el estatus de las especies con un sistema más eficiente como lo es el método DNA Barcoding, el cual utiliza segmentos estandarizados de ADN que tienen una variabilidad suficiente para discriminar a los individuos a nivel de especie. ²

Las especies de este género sufren múltiples hibridaciones debido a que estas se entrecruzan fácilmente y forman híbridos que no se han podido identificar siendo fundamental un análisis filogenético usando datos moleculares y con ello ver las relaciones de parentesco que estas presentan. ³

La identificación a nivel molecular resulta ser indispensable al momento de identificar especies pudiendo establecer nuevos datos taxonómicos; en la actualidad la técnica de DNA Barcoding se utiliza para determinar especies mediante el uso de segmentos de ADN cloroplástico que son *matK* y *rbcL* ⁴

El número de especies de este género se ha incrementado en las últimas décadas; es por eso que en este trabajo se ha planteado como objetivo principal la caracterización a nivel molecular de las especies del género *Passiflora*, presentes en la zona norte del Ecuador, mediante el uso del segmento *matK*, para justificar la publicación de nuevas especies o reagrupar aquellas que tienen diferencias morfológicas por su carácter híbrido. ⁵

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de especies

Antes de realizar la salida al campo, se hizo una visita al Herbario Nacional del Ecuador QCNE ubicado en la ciudad de Quito, con el objetivo de ubicar las especies del género *Passiflora* colectadas en el Ecuador, conocer su morfología y puntos de colección para determinar su distribución.

Una vez obtenido los datos previamente descritos en el herbario QCNE, se realizó la salida de campo a los puntos marcados con el fin de obtener muestras de cada especie, los datos de colección se registraron en el libro de campo de Marco Cerna a partir del código 3366; a cada muestra se le asignó un número de colección, se registró la siguiente información: número de colección, fecha, datos geopolíticos, Nombre científico, nombre común, ubicación geográfica latitud, longitud, entre otros. Las muestras para obtención de ADN fueron hojas jóvenes, sanas y libres manchas y cicatrices, las muestras colectadas se depositan en fundas de papel kraft, con el respectivo número de colección. ⁶

Extracción de DNA

Para la extracción de ADN total se obtuvo a partir de muestras frescas, hojas jóvenes de las diferentes especies de *Passifloras*, colectadas en la zona Norte del Ecuador, para ello se realizó el protocolo de extracción simple de ADN foliar de Doyle y Doyle (1987), se colocaron 40 g de tejido foliar fresco en tubos eppendorf de 2 mL, previamente etiquetados con los números de referencia que se obtuvieron durante la recolección; a estas muestras se las pulverizó con la ayuda del nitrógeno líquido. A continuación se agregó 600 μ L de Buffer de Lisis (100 mM TrisCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8) y 500 mM NaCl) y se agitó con la ayuda de un vórtex para homogenizar la muestra, seguidamente se añadió 94 μ L de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 10 % y se mezcló por inversión 6 veces, posteriormente se procede a colocar los tubos eppendorf en un baño María durante 10 min a 65 °C, inmediatamente se agregó 118.5 μ L de acetato de potasio (K-acetato 5 M), se mezcló por inversión 6 veces, una vez homogenizada la muestra se colocó los tubos en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, en seguida se procede a transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL previamente etiquetados con los números de referencia, luego se adicionó 600 μ L de fenol: cloroformo en proporción (1:1), se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, después de este proceso se formaron dos fases, la fase superior se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y finalmente se agregó 360 μ L de isopropanol frío, se las mezcló suavemente por inversión 6 veces y se almacenó a -20° C por toda la noche.

Al siguiente día se procedió a centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm, después de lo cual se formó un pellet, se eliminó el sobrenadante y luego se lavó con etanol frío al 70 %, se añadió 400 μ L de etanol frío, se centrifugó por 3 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante, se realizó este proceso por tres veces. Para eliminar el solvente mezclado con el pellet se ubicó las muestras en un termo

bloque a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se re suspendió el pellet en 30 µL de TE 1X (10 mM TrisCl (pH 8) y 1 mM EDTA) que permite conservar el ADN obtenido. ⁷

Visualización del ADN extraído por medio de electroforesis horizontal

Para determinar la presencia de ADN, mediante la técnica de Electroforesis horizontal se preparó el gel de agarosa al 1 % (50 mL solución TBE 1x y 0.5 g de agarosa ultra pura de Invitrogen, calentada en microondas durante 1 min); cuando la temperatura de la agarosa alcanzó 38 °C, se colocó 5 µL de Sybr Safe de Invitrogen; antes de que se solidifique el gel es necesario ponerlo en el molde rectangular con el peine con el fin de marcarse los posillos donde se colocaran las muestras. Inmediatamente se procedió a agregar la solución TBE 1x hasta que cubra totalmente el gel, cuando la cámara estuvo lista se procedió a cargar las muestras, es decir se tomó 4 µL de ADN cloroplástico y 4 µL de tampón de carga “BLU” compuesto por Xileno Cianol (25 mg) y Sucrosa (4 g), en el caso de producto PCR se tomó 4 µL de producto PCR y 4 µL de tampón de carga “BLU”, antes de programar la cámara se preparó la muestra de la siguiente manera: se toman 3.5 µL de Ladder y 4 µL de tampón de carga “BLU” con la finalidad de observar las pares de bases, una vez cargadas las muestras, se procedió a setear la cámara de electroforesis horizontal Labnet a las siguientes condiciones a 90 Voltios por 40 min, visualizándose el resultado en el fotodocumentador Bio-imaging systems. ⁸

Amplificación y Secuenciación

Una vez extraído el ADN, se amplificó un segmento del gen Maturasa K *matK* presentando un tamaño de 730 pb; para lo cual se combinaron los siguientes elementos para un volumen total de 25 µL: 12.5 µL 2 x Phire Plant Direct PCR Master Mix, 1.25 µL Disolution Buffer, 0.5 µL primer forward *matK_1 RKIM* (ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC), 0.5 µL primer reverse *matK* (CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAGAG), 1 µl de ADN, 9.25 µL de agua libre de nucleasas; este protocolo se desarrolló usando un bloque frio **LightCycler® Centrifuge Adapters** - Roche en la cámara de flujo laminar **Espectrocom** con materiales previamente esterilizados.

Una vez preparada la master mix se usó el termociclador *Labnet Multigene* con el siguiente programa: inicio de la desnaturalización 95 °C por un período de 5 min, a continuación 35 ciclos de: 95 °C por 40 seg, 52.8 °C para el temperatura de fusión por 30 seg, 72 °C por 1 min para la extensión inicial; al terminar los ciclos se produce la extensión final a 72 °C por 8 min, finalmente la etapa de mantenimiento a 4 °C. ⁹

La secuenciación de los productos PCR en esta investigación, se realizó por el método de SANGER, en la cual se identifica a los nucleótidos que forman parte de los segmentos amplificados, las muestras fueron enviadas en un volumen de 20 µL cuya concentración de masa fue de 95 ng/µL.

Consulta de base de datos en Boldsystems

Para completar la información filogenética del género se descargó secuencias del segmento *matK* de especies del genero *Passiflora* que no están presentes en la zona de colección, estas fueron *P. riparia*, *P. capsularis*, *P. sexflora*, *P. adenopoda*, *P. biflora*, *P. micropetala*, las cuales se encuentran presentes en el Ecuador; adicionalmente se obtuvieron secuencias del segmento *rbcL* se complementaron con las especies colectadas y amplificadas con el segmento *matK* y las siguientes especies: *P. auriculata*, *P. foetida*, *P. micropetala*, *P. punctata*, *P.trifasciata*, *P.vespertilio*.

Construcción del árbol filogenético

Para ello se utilizó el software MEGA 6, el primer paso fue alinear todas las secuencias obtenidas mediante el algoritmo Muscle, que identificó secuencias homólogas y permitió establecer el grado de similitud entre muestras analizadas.

10

Se elaboraron tres árboles filogenéticos, el primero usando un segmento del gen *matK*, el segundo árbol filogenético usando un segmento de gen *rbcL* y el tercero concatenado los dos segmentos *matK* y *rbcL*; usando el algoritmo NeighborJoiningTree, y el modelo de estimación de distancias de secuencias Jukes-Cantor y bootstrap de 1000 réplicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se colectaron 12 especies del género *Passiflora*, en la región norte del Ecuador, en cinco provincias Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Santo Domingo de los Tsáchilas y Napo los datos de colección se registraron en el libro de campo de Marco Cerna como se observa en la tabla 1.

Número de colección	Provincia	Espécimen	Altura (m.s.n.m)	Coordenadas
3432	Santo domingo de los Tsáchilas	<i>Passiflora edulis</i> Sims	739	00°35'S 079°22'W
3366	Tungurahua	<i>Passiflora ligularis</i> Juss	1800	01°24'S 078°22'W
3452	Pichincha	<i>Passiflora mixta</i> L.f.	3556	00°03'N 078°26'W
3451	Pichincha	<i>Passiflora tripartita</i> (Juss .) Poir.	2900	00°09'S 078°26'W
3397	Santo domingo de los Tsáchilas	<i>Passiflora quadrangularis</i> L.	820	00°33'S 079°15'W
3556	Santo domingo de los Tsáchilas	<i>Passiflora maliformis</i> L.	500	0°0'13,9' 'S 79°22'43,5 'W
3434	Cotopaxi	<i>Passiflora caerulea</i> L.	3178	0°45'6"S 0°45'13"W
3437	Napo	<i>Passiflora ambigua</i> Hemsl.	510	01°04'S 077°36'W
3804	Napo	<i>Passiflora alata</i> Curtis.	420	0°41'11.6"S 78°00'40.0"W
3805	Napo	<i>Passiflora macrophylla</i> Spruce ex Mast.	750	1°04'53.9"S 77°53'11.6"W
3806	Napo	<i>Passiflora tryphostemmatoides</i> Harms	850	1°13'11.7"S 78°05'35.9"W
3807	Pichincha	<i>Passiflora morifolia</i> Mast.	3117	0°04'04.9"N 77°51'04.8"W

Tabla 1 Listado de las especies colectadas del género *Passiflora* para este estudio

Identificación molecular

Extracción de ADN

Se obtuvo ADN de las 12 muestras colectadas mediante el método Doyle y Doyle modificado, las cadenas obtenidas tienen una longitud de banda mayor a 5000 pb el tamaño fue determinado mediante comparación con el marcador molecular “Lader O’Gener ruler” con un rango de 0.1 hasta 5 kb, como se muestra en la figura 13 ⁷

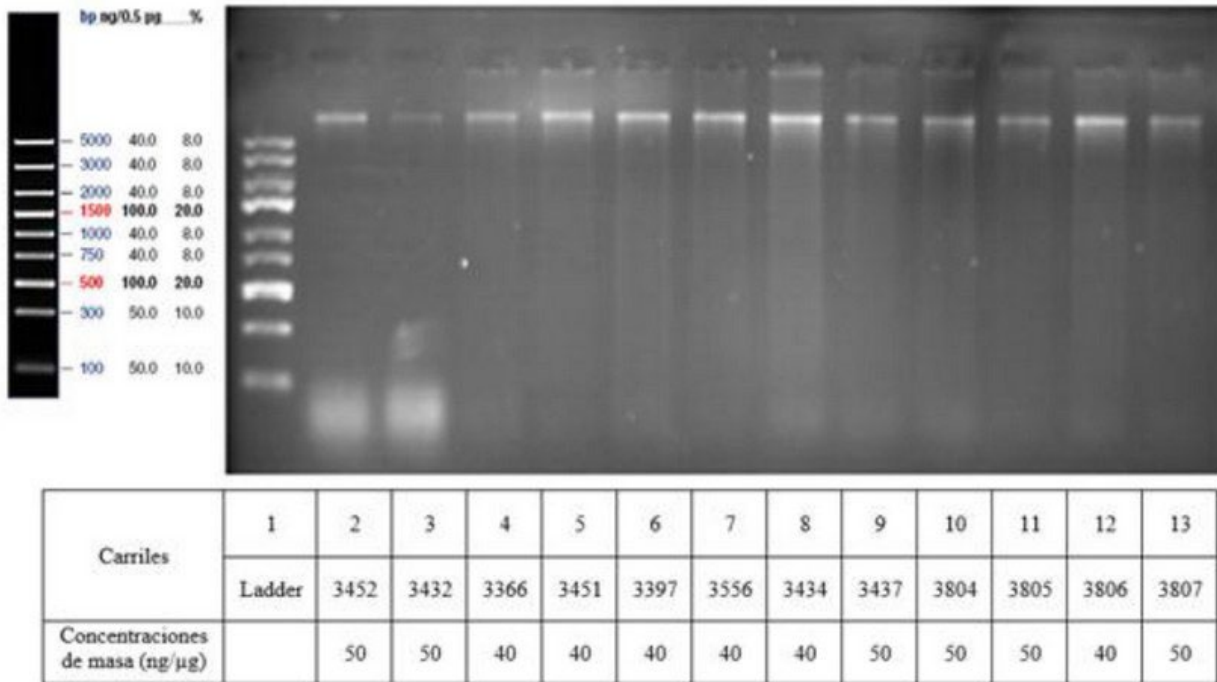


Figura 1 Gel de electroforesis de ADN

Amplificación del segmento matK de las especies colectadas mediante la técnica PCR convencional.

La longitud de las moléculas de ADN presentan un promedio de 765 pb, como se muestra en la figura 14, en comparación con el trabajo de Mazo (2011), referente a estudios de Exsiccados de Orquídeas, obtuvo segmentos con 730 pb para el gen matK. ⁹

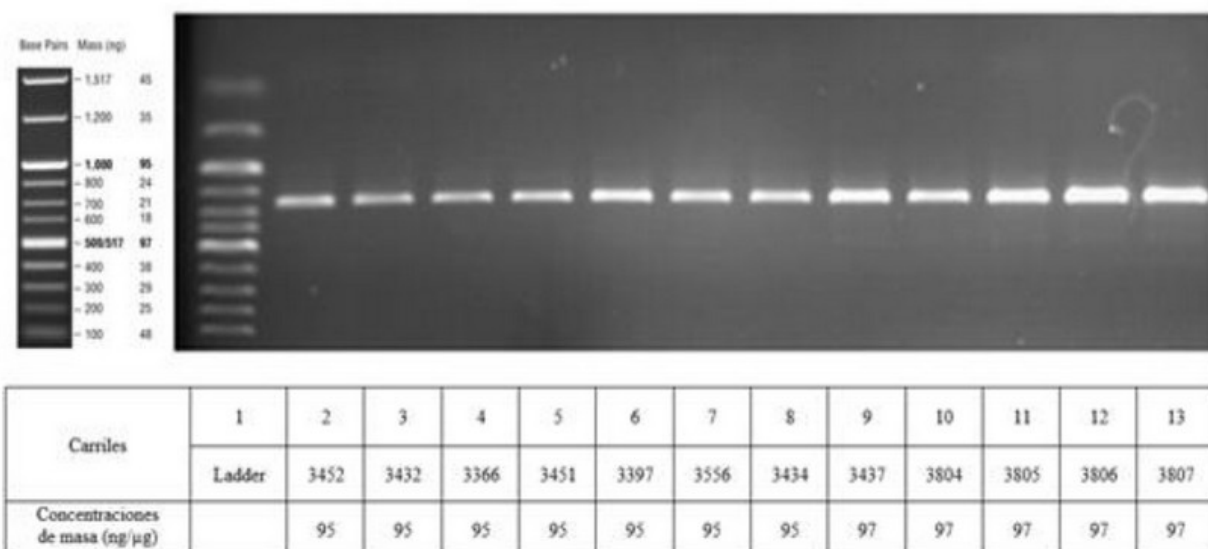


Figura 2 Gel de electroforesis de productos PCR

Identificación de secuencias por medio del software Blast y Boldsystems

Se procedió a identificar las secuencias amplificadas del segmento *matK*, estas fueron analizadas con el software Blast, como resultado se obtuvo la identidad de las especies: *Passiflora edulis*, *P. quadrangularis*, *P. actinia*, *P. caerulea*, *P. maliformis*, *P. quadrangularis*, *P.aurantioides*, *P. cincinnata* y *Passiflora* spp. con una identidad por encima del 98 %, en contraste con, *P. adenopoda* y *P. gardneri* presento una identidad del 94 % siendo muy bajo pero estas especies se encuentran en el mismo género.

Las secuencias también fueron analizadas con el software Boldsystem, el cual no dio resultados iguales o mayores al 98 % de identidad, lo que nos indica que no tiene registros de estas especies en su banco de datos.

Número de colección	BLAST		BOLDSYSTEMS	
	Espécimen	Identidad (%)	Espécimen	Similitud (%)
3432	<i>Passiflora edulis</i>	98	<i>Passiflora glandulosa</i>	84.15
3366	<i>Passiflora caerulea</i>	98	<i>Passiflora quadrangularis</i>	88.85
3452	<i>Passiflora adenopoda</i>	94	<i>Passiflora adenopoda</i>	94.56
3451	<i>Passiflora</i> spp. Tokuoka	98	<i>Passiflora</i> spp. Tokuoka	86.50
3397	<i>Passiflora quadrangularis</i>	99	<i>Passiflora quadrangularis</i>	84.05
3556	<i>Passiflora actinia</i>	98	<i>Passiflora</i> spp.	97.86
3434	<i>Passiflora caerulea</i>	98	<i>Passiflora ambigua</i>	92.21
3437	<i>Passiflora maliformis</i>	99	<i>Passiflora glandulosa</i>	94.47
3804	<i>Passiflora quadrangularis</i>	100	<i>Passiflora quadrangularis</i>	75.56
3805	<i>Passiflora gardneri</i>	94	<i>Passiflora menispermifolia</i>	82.95
3806	<i>Passiflora aurantioides</i>	100	<i>Passiflora aurantioides</i>	91.84
3807	<i>Passiflora cincinnata</i>	99	<i>Passiflora murucuja</i>	81.57

Tabla 2 Resultados de identidad de especies colectadas

Filogenia en base al marcador *matK*

El árbol filogenético se construyó a partir de 18 secuencias de las cuales 12 fueron especies colectadas y 6 se obtuvieron de la base de datos Gene Bank; como se observa en la figura 15, el árbol muestra cinco clados para el género *Passiflora*, incluyendo una especie de referencia perteneciente a un grupo externo.

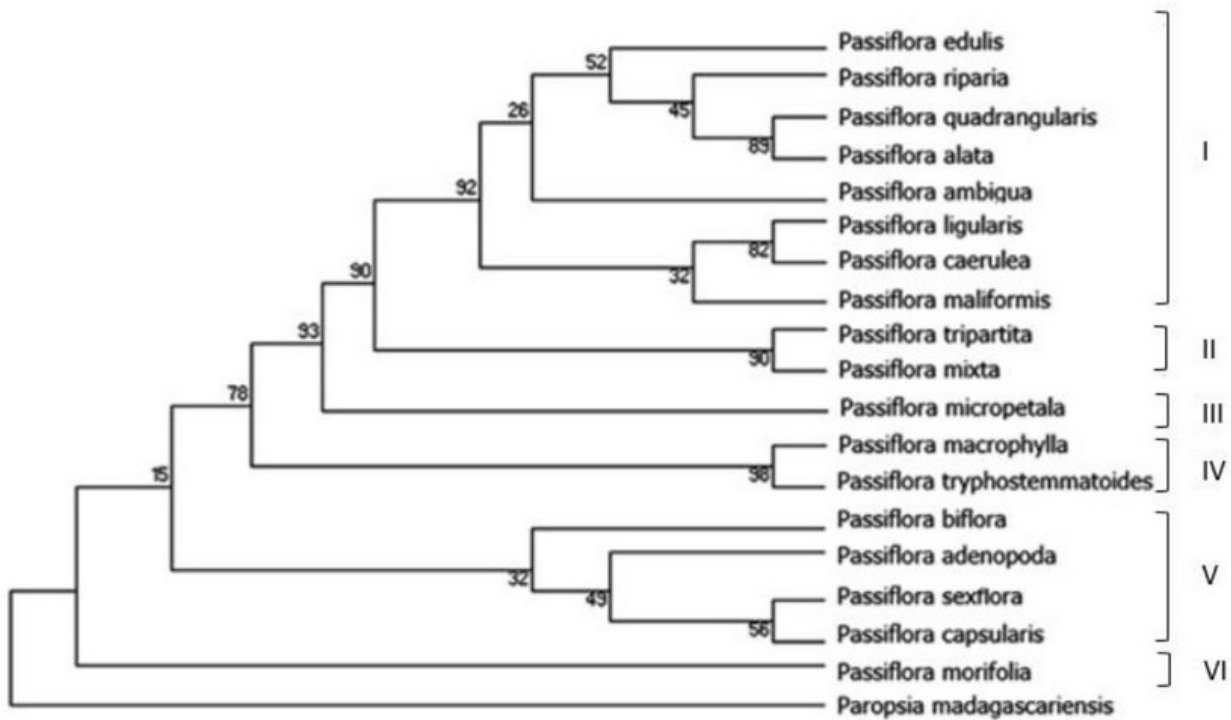


Figura 3 Árbol filogenético mediante el test Neighbor-Joining en la segmento *matK*

Passiflora biflora y *P. adenopoda* forma un grupo vecino al clado 1, mientras que en este estudio se los ubica en el grupo IV¹². Además la especie *P. Ambigua* la ubican en el cuarto grupo, en este estudio se ubica en el grupo 1.¹³

En base a este árbol se determina que el grupo 1 es el más evolucionado mientras que el grupo 5 es el más antiguo o basal, representado por la especie *P. morifolia* presente en la provincia de Pichincha, esta puede ser la zona de dispersión del género.

Árbol Filogenético por medio del marcador *rbcL*

El árbol filogenético se construyó con 19 secuencias del marcador *rbcL* de especies del género *Passiflora* presentes en Ecuador, estas secuencias fueron descargadas de la Biblioteca virtual Gene Bank; como se observa en la figura 16, el árbol muestra cinco clados, incluye una especie de referencia perteneciente a un grupo externo.

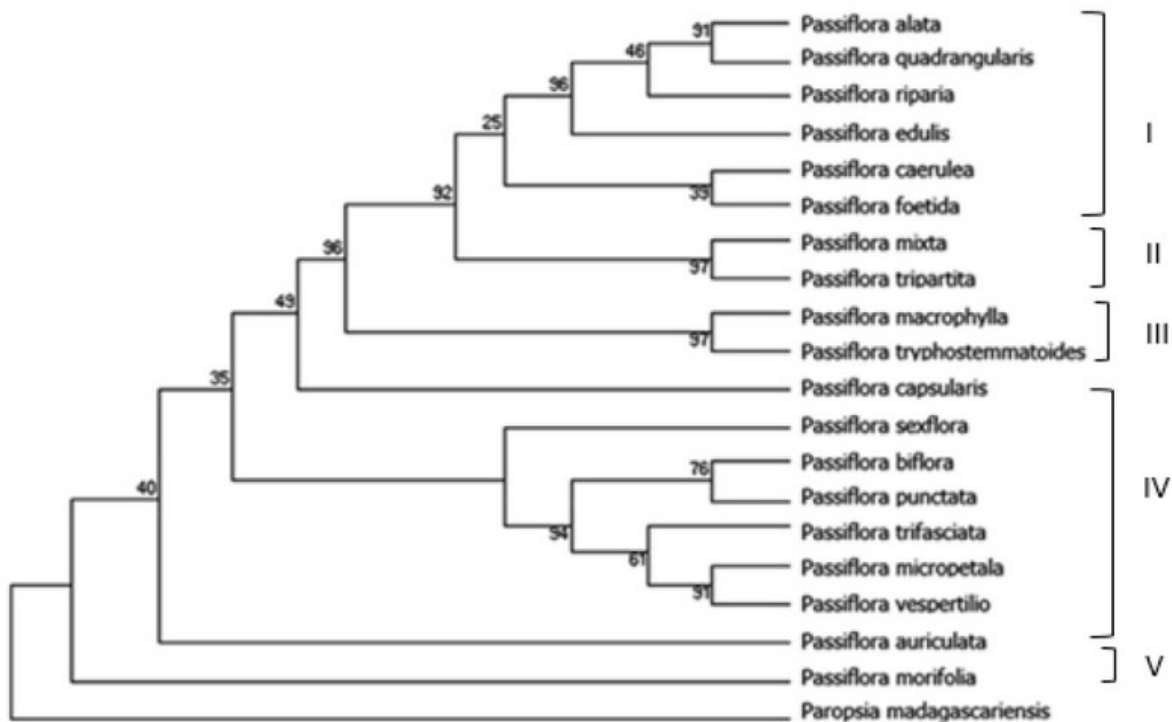


Figura 4 Árbol filogenético mediante el test Neighbor-Joining en la segmento *rbcl*

P. punctata, *P. biflora*; *P. vespertilio* y *P. micropetala* en el segundo clado en presente trabajo se ubican en el cuarto clado ¹⁴. Además *P. sexflora* y *P. capsularis* se ubican en cuarto clado, en este trabajo *P. capsularis* se ubica en un grupo vecino. ¹⁵

Árbol Filogenético concatenado los marcadores *matK* y *rbcl*

El árbol filogenético se construyó a partir de las secuencias del gen *matK* y *rbcl* concatenadas, pertenecientes a 14 especies del género *Passiflora*, como se observa en la figura 17, el árbol muestra cuatro clados, incluye una especie de referencia perteneciente a un grupo externo.

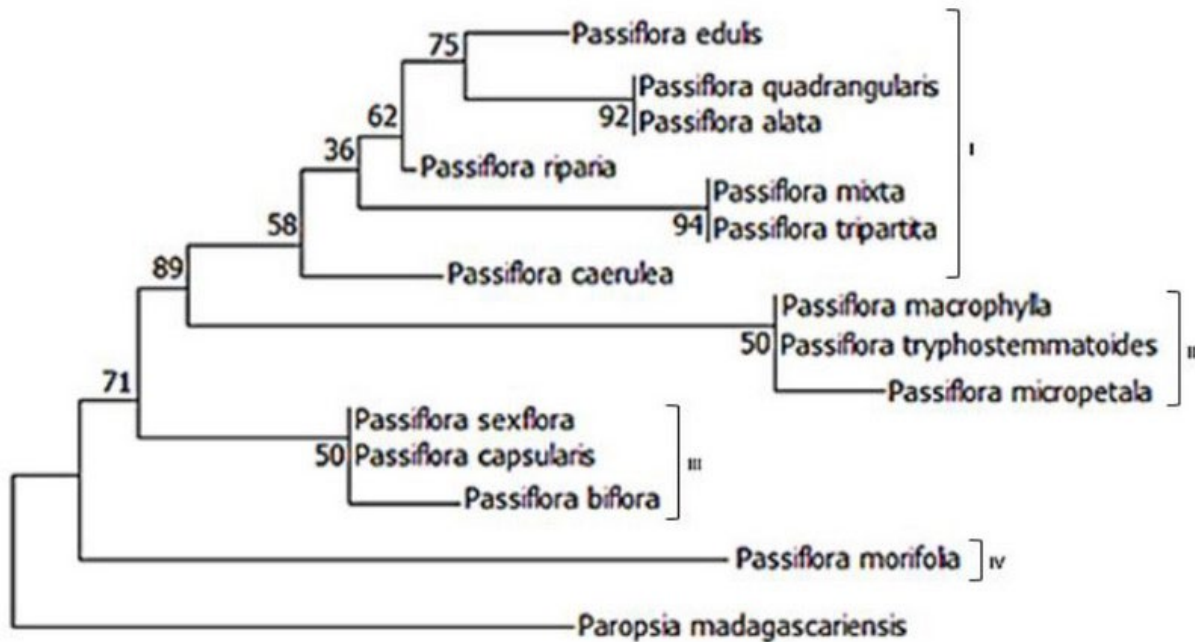


Figura 5 Árbol filogenético mediante el test Neighbor-Joining concatenando las secuencias *matK* y *rbcL*

El árbol concatenado por los segmentos *matK* y *rbcL* tiene una conformación similar al árbol construido por el segmento *matK*, es decir no existe variación en la conformación de grupos, solo presentan ligeros cambios en los soportes de rama, comparando estos resultados con los obtenidos encontramos similitud y coherencia en la distribución de los grupos. ¹³

Passiflora quadrangularis y *P. alata* en su morfología son similares, difieren en que las hojas en *P. alata* presenta en la hoja ocho nervios laterales mientras que *P. quadrangularis* presenta diez nervios laterales. ¹⁶

En segundo lugar, se tuvo el soporte entre *P. tripartita* y *P. mixta* la morfología entre las dos especies es bastante similar diferenciándose en los extremos de los pedúnculos y los filamentos del hipantio, es decir a simple vista son idénticos. ¹⁷

Por otro lado el soporte entre *P. macrophylla* y *P. tryphostemmatoides* son morfológicamente idénticos se diferencian en el tamaño del polen es decir *P. macrophylla* tiene un tamaño grande de 50 μm mientras que *P. tryphostemmatoides* tiene un tamaño mediano de 20 μm pero la conformación es la misma oblato esferoidal. ¹⁸

Mientras que el soporte entre *Passiflora verperilio* y *P. micropetala* las hace

diferentes únicamente la forma de la hoja *P. verpertilio* presenta la hoja en forma de opuesta en contraste con *P. micropetala* presenta forma alterna, adicionalmente se tiene que *P. biflora* y *P. punctata* pertenecen al mismo subgénero denominado Decaloba, se asemejan en los frutos pequeños y de color purpura. ¹⁹

P. morifolia es decir se alejó tempranamente del grupo, su característica que la hace diferente a las demás es el fruto de color azul. ¹⁴

CONCLUSIONES

Se colectaron 12 de especies distribuidas en 5 provincias, la mayor abundancia de especies del género *Passiflora* se encuentra en las regiones cuyos pisos altitudinales van desde entre 400 y 2800 m.s.n.m estas fueran identificadas a nivel de especie, presentan características comunes como son los tallos glabros, zarcillos, semillas planas provistas de una cutícula siendo la característica principal es que todas las semillas son de negro.

Se probó el método de ADN BARCODING para la identificación molecular del género *Passiflora* siendo un método efectivo y moderno logrando clasificar a las especies de mejor manera mediante el segmento *matk* presentando muchos polimorfismos permitiendo la discriminación de especies.

El árbol filogenético concatenado elaborado con los segmentos *matK* y *rbcL*, estableció clados más precisos, se obtuvo una gran similitud con el árbol realizado por el segmento *matK*, se denoto que *P. morifolia* siendo el punto de dispersión del género en la provincia de Pichincha es la especie menos evolucionada mientras que *P. edulis*, *P. quadrangularis* y *P. alata* son la especies más moderna del género sus puntos de diversificación son en las zonas tropicales.

REFERENCIAS

1. Cerón C. Bases para el estudio de la flora ecuatoriana. Universitaria, editor. Quito; 2015. 20-25 p.
2. List TP. The Plant List [Internet]. Version 1.1. 2013. Available from: <http://www.theplantlist.org/>

3. Hansen A, Gilbert A, Jansen R. Origin and evolutionary relationships in Passiflora. In 1999. p. 73.
4. Krosnick S, Ford A, Freudenstein. Taxonomic Revision of Passiflora subgenus Tetrapathea including the Monotypic Genera Hollrungia and Tetrapathea (Passifloraceae), and a New Species of Passiflora. Systematic Botany; 2009. p. 375–85.
5. Jørgensen P, Muchhala N, MacDougal J. Passiflora unipetala, a new bat-pollinated species of Passiflora supersect. Tacsonia (Passifloraceae). Novon; 2012. p. 174–9.
6. Instituto Nacional de Biodiversidad. Protocolo de manejo de colecciones de plantas vasculares proyecto “desarrollando capacidades compartiendo tecnología para la gestión de la biodiversidad en Centroamérica. 2008;5–7.
7. Rivas P, Salazar P. Comparación de la variabilidad genética de tres regiones de ADN cloroplástico y una nuclear en el ishpingo (*O. quixos*) proveniente de 5 provincias de la Amazonía ecuatoriana [Internet]. Universidad Politécnica Salesiana sede Quito; 2017. Available from: <https://www.dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4400/1/UPS-ST000985.pdf>
8. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J Vis Exp [Internet]. 2012;(62):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546956>
9. Cauz L, Munhoz C, Rodde N, Cauet S, Santos A, Penha H, et al. The Chloroplast Genome of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) Assembled from Long Sequence Reads: Structural Organization and Phylogenomic Studies in Malpighiales. Front Plant Sci [Internet]. 2017;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00334/full>
10. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725–9.
11. Mazo L. Evaluación Y Comparación De 3 Protocolos De Extracción Y Amplificación Del Adn Contenido En Exsiccados De Orquídeas Conservadas En Colecciones De Herbario. Vol. 53. 2011.

12. Tokuoka T. Molecular phylogenetic analysis of Passifloraceae sensu lato (Malpighiales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *J Plant Res.* 2012;
13. Yockteng R, Nadot S. Infrageneric phylogenies: A comparison of chloroplast-expressed glutamine synthetase, cytosol-expressed glutamine synthetase and cpDNA maturase K in *Passiflora*. *Mol Phylogenet Evol.* 2004;31(1):397–402.
14. Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM, et al. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *Am J Bot.* 2003;90(8):1235.
15. Bernal N, Ocampo J, Hernández J. Caracterización y análisis de la variabilidad genética de la granadilla (*Passiflora ligularis* juss.) en Colombia empleando marcadores microsatélites. *Rev Bras Frutic* [Internet]. 2014;36(3):586–97. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000300010&lng=es&tlng=es
16. León J. Botánica de los cultivos tropicales. Agroamérica. IICA, editor. San José de Costa Rica; 2000. 139 p.
17. Ocampo J, Coppens d'Eckenbrugge G, Jarvis A, Risterucci A, Feldmann P, Scheldeman X. Study of the genetic diversity of genus *Passiflora* L. (Passifloraceae) and its distribution in Colombia. 2008.
18. Barrios L. Estudios de la diversidad de passifloraceae en los departamentos de Caldas, Chocó, Nariño, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca (Colombia), apoyado en los análisis ecogeográficos, palinológicos y citogenéticos. Universidad Nacional de Colombia; 2005.
19. Esquerre B, Rojas C, Llatas S, Delgado G. El género *Passiflora* L. (Passifloraceae) en el Departamento de Lambayeque, Perú. [Internet]. Chiclayo; 2014. p. 65. Available from: http://www.biolveg.uma.es/abm/Volumenes/vol39/39_Esquerre-Ibanez_et_al.pdf

Marco Cerna¹, Jorge Miño²

¹ *Dirección de carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales sede Quito.
Universidad Politécnica Salesiana. Autor de correspondencia.
mcerna@ups.edu.ec*