



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE:**

BIÓLOGO

**Evaluación de un Protocolo no Destructivo para Obtención de Códigos de
Barra Mitocondriales de la Familia Chrysomelidae (Coleóptera) del Sur del
Ecuador.**

Autores:

Bermeo Duchi Jimmy Fernando

Ordóñez Sánchez Juan Santiago

Directora:

De la Cadena Mendoza Gissela, Ph.D.

Codirector:

Caroca Cáceres Rodrigo, Ph.D.

Cuenca – Ecuador

2023 - 2024

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a nuestras familias y amigos, por su apoyo incondicional a lo largo de estos años. Gracias por creer en nosotros, este logro es también suyo.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra profunda gratitud a todas las personas que nos han brindado su apoyo y orientación durante la realización de este trabajo de investigación

En primer lugar, agradecemos a nuestros tutores de tesis, Gissela De la Cadena y Rodrigo Caroca, por su orientación a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y experiencia fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo y para nuestro crecimiento académico y profesional.

Agradecemos especialmente a mis amigos, quienes estuvieron a nuestro lado brindándonos su apoyo, compartiendo ideas y experiencias.

Asimismo, agradecemos a Diego Montero, Daniela Ortiz, Samara Zeas, Francesco Bresciani, Samantha Ríos, Bladimir Pauta, Gabriela Pulgarín y Doménica Suconota de la Universidad del Azuay por la ayuda para llevar a cabo esta investigación.

Agradecemos a la Universidad del Azuay y al Vicerrectorado de Investigaciones, por el financiamiento al Proyecto de Investigación: “Actualización del conocimiento de la biodiversidad de insectos en el Ecuador con énfasis en los órdenes Coleoptera e Hymenoptera depositados en la Colección de Entomología de la Universidad del Azuay”.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
Índice de Tablas	v
Índice de Figuras	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	1
Metodología	3
Área de Estudio	3
Colecta de Especímenes	4
Separación y Clasificación de Individuos	5
Digitalización de Especímenes	5
Obtención y Procesamiento de ADN mitocondrial	5
Resultados	8
Resultados del Muestreo	8
Resultados del procesamiento de muestras	8
Discusión	15
Bibliografía	20
Anexos	28

Índice de Tablas

Tabla 1 Condiciones específicas utilizadas para la obtención de fragmentos de citocromo oxidasa <i>Cox 1</i> a través de PCR.	6
Tabla 2 Cantidad de Individuos capturados por distintos métodos y número seleccionado para posterior extracción de ADN.	8
Tabla 3 Resultados de las cuantificaciones de ADN de las extracciones y las purificaciones, valoración de los resultados obtenidos en los geles de electroforesis en cada procedimiento, y diluciones utilizadas para PCR.	9
Tabla 4 Tabla resumen del porcentaje de éxito general de cada proceso.	10
Tabla 5 Tabla de promedio y mediana general de la relación 260/280 y 260/230 de las extracciones y las purificaciones.	12
Tabla 6 Identificación morfológica e identificación molecular realizada con la base de datos del NCBI.	13

Índice de Figuras

Figura 1 Mapa de Geomorfología del Parque Nacional Río Negro	4
Figura 2 Geles de electroforesis de productos de PCR (A) y de las Purificaciones de los productos de PCR (B).....	11
Figura 3 Filogenia realizada con el método de Tamura-Nei en el programa Geneious prime.....	15

Índice de Anexos

Anexo 1 Lista de individuos colectados en el muestreo e individuos procesados en laboratorio..	28
Anexo 2 Láminas de individuos digitalizados.	31
Anexo 3 Se observa el porcentaje de éxito según si se obtuvo el producto esperado o no en los distintos procedimientos aplicados.....	54
Anexo 4 Tabla de relación 260/280 y 260/230 de las extracciones y las purificaciones	56

Resumen

Ecuador posee una de las mayores biodiversidades del mundo, albergando una gran variedad de especies y ecosistemas endémicos. Su estudio es fundamental para comprender los sistemas bióticos y promover su conservación. Este estudio evaluó un protocolo no destructivo para la obtención de códigos de barras mitocondriales de la familia Chrysomelidae en el sur de Ecuador. La metodología empleada permitió extraer y obtener ADN sin dañar los especímenes, manteniendo los rasgos morfológicos para su preservación en colecciones y uso en futuras investigaciones. Se procesaron un total de 48 morfotipos utilizando técnicas de PCR y secuenciación, logrando una tasa de éxito general del 87.5%, correspondiente a 42 secuencias en buen estado aportando así con material genético para el estudio de este grupo megadiverso en Ecuador. Debido a la variación en concentración de ADN recuperado, se recomienda realizar pruebas previas en laboratorio para mejorar la eficiencia de la amplificación mediante PCR y el protocolo de purificación ‘no comercial’. Además, es imprescindible realizar más estudios en este campo, ya que la información disponible del área en la base de datos del NCBI para el grupo examinado parece limitada. Aunque el marcador *Cox I* permitió corroborar la identificación morfológica en la mayoría de los casos, se observaron algunas discrepancias. En conclusión, la implementación de esta metodología puede mejorar notablemente los estudios de biodiversidad y conservación, especialmente en zonas previamente no estudiadas, de tal forma que se pueda enriquecer las bases de datos genéticas para futuras investigaciones.

Palabras claves: Chrysomelidae, No destructivo, Barcoding, Cox I, ADN mitocondrial.

Abstract

Ecuador has one of the greatest biodiversities in the world, harboring a wide variety of endemic species and ecosystems. Studying these species and ecosystems is fundamental to understanding biotic systems and promoting their conservation. This study evaluated a non-destructive protocol for obtaining mitochondrial barcodes of the Chrysomelidae family in southern Ecuador. The methodology employed allowed for the extraction and acquisition of DNA without damaging the specimens, thus maintaining morphological traits for preservation in collections and use in future research. 48 morphotypes were processed using PCR and sequencing techniques, achieving an overall success rate of 87.5%, which corresponded to 42 sequences in good condition. This provided genetic material for studying this megadiverse group in Ecuador. Due to the variation in the concentration of DNA recovered, it is recommended that prior laboratory tests be carried out to improve the efficiency of PCR amplification and the non-commercial purification protocol. Additionally, further studies in this field are imperative, as the information available for the area in the NCBI database for the group examined appears limited. Although the *Cox I* marker allowed for the corroboration of morphological identification in most cases, some discrepancies were observed. In conclusion, the implementation of this methodology can greatly enhance biodiversity and conservation studies, especially for the most important species.

Key words: Chrysomelidae, Non destructive, Barcoding, Cox I, Mitochondrial DNA.