

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) en la región interandina del Ecuador mediante marcadores microsatélites

Dámaris Priscila Intriago Baldeón

Venancio Arahana, Ph.D., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Licenciada en
Biología

Quito, Mayo de 2013

**Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) en la región interandina del Ecuador mediante marcadores microsatélites

Dámaris Priscila Intriago Baldeón

Venancio Arahana, Ph.D.
Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

Ma. De Lourdes Torres, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

José Tobar, Msc.
Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.
Decana del Colegio de Ciencias Biológicas
Y Ambientales

Quito, Mayo de 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento, certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

.....

Nombre: Dámaris Priscila Intriago Baldeón

C. I.: 091618164-7

Fecha: Quito, Mayo de 2013

DEDICATORIA

Dedico esta tesis de grado a:

A Dios, mi madre, y mi hermana quienes son los pilares de mi vida; su apoyo e inmenso amor han constituido el motor que me ha permitido escalar todos los peldaños y sobrellevar cada uno de los retos que me he experimentado durante mi carrera universitaria. Por ustedes, he podido lograr mi más grande sueño: servir a la humanidad a través de la ciencia.

A mi padre, quien ya no se encuentra entre nosotros; él me inculco valores como la responsabilidad, la búsqueda incansable de la excelencia, y la perseverancia los cuales han sido elementos claves que me han dado la oportunidad de triunfar en muchos aspectos de la vida.

A mis familiares más cercanos quienes me han acompañado en cada etapa de mi vida y siempre han velado por mi bienestar, salud y felicidad.

Mil gracias a todos; ya son parte de este éxito personal.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios y a mi familia quienes me han apoyado incondicionalmente desde el inicio de mi carrera universitaria; me ayudaron a levantarme cada vez que caí, me animaron a seguir adelante sin importar lo difícil y duro que fuera el camino, y por ustedes he podido llegar a cumplir esta meta.

Quiero agradecer a los asistentes del laboratorio de Biotecnología Vegetal: Vivi, Bernardo, y Cris, quienes me guiaron y compartieron sus valiosos conocimientos durante la ejecución de este proyecto de investigación. Gracias por consejos y apoyo durante esos días difíciles cuando las cosas no salían como uno esperaba. Un sincero agradecimiento a José Tobar, por su valiosa colaboración durante la recolección de muestras para este estudio.

Quiero agradecer a Joely V., Sofía H. y Marce G., quienes compartieron conmigo algunas de sus horas de voluntariado; gracias por toda la ayuda prestada durante la realización de esta tesis de grado.

Quiero agradecer a mis mejores amigos/as (Andrea A., Cinthya B., Erika J., Ximena H., Katherine S., Leo O. y Alejandro M.), amigos/as y compañeros/as de la Universidad por haberme apoyado cada minuto durante esta larga travesía; ustedes hicieron que este trayecto fuera ameno e inolvidable.

Finalmente, quiero agradecer a mis maestros, Venancio Arahana, Ma. De Lourdes Torres y Paulina Andrade quienes me dieron la oportunidad de realizar una tesis en mi materia favorita, me iluminaron con amplia sabiduría a cada paso, y siempre estuvieron allí para ayudarme cuando se presentaba alguna eventualidad o existía alguna inquietud.

Gracias a su presencia y ayuda, este proyecto fue posible.

RESUMEN

Prunus serotina subsp. *capulí* es una especie arbórea, silvestre, y tetraploide que se distribuye a lo largo del continente Americano y habita el callejón interandino ecuatoriano. A pesar de su gran potencial económico en las industrias alimenticia, maderera, y médica, existe poca información acerca de la historia y el cultivo de la especie en el país.

Este trabajo es la segunda fase de una investigación que pretende evaluar la diversidad genética del capulí en Ecuador. La primera fase evaluó 127 accesiones de capulí en Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, y Chimborazo, mientras que la fase actual analizó 88 accesiones de capulí provenientes de Pichincha, Cañar y Azuay. Durante ambas fases, se emplearon 8 marcadores microsatélites heterólogos y altamente polimórficos (Guadalupe, 2013). En este trabajo, primero, se analizaron los datos correspondientes a las tres provincias por separado y luego, se procesaron los datos de las ocho provincias estudiadas en total. Se generaron dendrogramas con sus bootstraps, análisis de coordenadas principales (PCoA), y valores del índice de distancia genética (*F_{st}*).

El análisis molecular de las tres provincias muestra alta similitud genética entre individuos dentro de cada provincia, y una baja variabilidad genética interprovincial junto con un moderado-alto grado de diferenciación genética entre ellas siguiendo un patrón geográfico norte-sur. Por otro lado, el análisis molecular de las ocho provincias indica la presencia de una reducida variabilidad genética a lo largo de la sierra ecuatoriana, un nivel moderado de diferenciación genética entre provincias, y una distribución alélica siguiendo un patrón geográfico norte-centro-sur. Se requieren datos antropológicos y económicos actualizados para sustentar las hipótesis que pretenden explicar los resultados obtenidos.

ABSTRACT

Prunus serotina subsp. *capulí* is a wild arboreal tetraploid species which is widely distributed throughout America and inhabits the Ecuadorian highlands. Regardless of its high economic potential in the food, timber, and medical industries, there is little information available concerning the history and development of this crop in Ecuador.

This study is the second phase of a research project that evaluates the genetic diversity of *capulí* in Ecuador. The first phase evaluated 127 *capulí* accessions from Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, and Chimborazo, whereas this phase evaluated 88 *capulí* accessions from Pichincha, Cañar, and Azuay. Both phases used 8 heterologous and highly polymorphic microsatellite markers (Guadalupe, 2013). During this study, data from the three provinces were evaluated, separately. Later on, data from the eight provinces evaluated during both phases of the project were analyzed as a whole. Dendrograms with their respective bootstrap analysis, principal coordinate analyses (PCoA) and *Fst* genetic distance index values were generated.

The molecular analysis for the three provinces showed high genetic similarity among individuals inside each province, and low genetic variability between provinces together with a moderate-high level of genetic distance among them following the geographical pattern north-south. On the other hand, the molecular analysis for the eight provinces indicated a reduced genetic variability throughout the Ecuadorian highlands, a moderate level of genetic distance between provinces, and an allelic distribution that follows the geographical pattern north-central-south. Updated anthropological and economic data are required to support the hypothesis that try to explain these results.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUCCIÓN	14
1.1 <i>Prunus serótina</i>	14
1.1.1 Taxonomía: (Fam. Rosaceae; Gen. <i>Prunus</i>).....	14
1.1.2 Distribución geográfica.....	15
1.1.3 Historia.....	17
1.1.4 Morfología externa y genética de la variedad ecuatoriana (<i>P. serotina</i> subsp. capulí (Cav.) McVaugh).....	18
1.1.5 Usos y aplicaciones de la especie.....	20
1.2 Diversidad genética: concepto, importancia a nivel de especie, aplicaciones y métodos de evaluación.....	22
1.3 Marcadores Moleculares.....	26
1.3.1 Definición, clasificación y aplicaciones.....	26
1.3.2 Marcadores moleculares de tipo microsatélite (SSR).....	29
1.4 Estudios sobre diversidad genética mediante marcadores moleculares realizados en <i>Prunus serótina</i> y/o otras especies del género <i>Prunus</i> : información disponible en la actualidad.....	34
2 OBJETIVO GENERAL	36
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 ÁREA DE ESTUDIO	36
5 JUSTIFICACIÓN	37
6 MATERIALES	39
6.1 Fase de campo: colección de accesiones de capulí.....	39
6.2 Extracción de DNA.....	39
6.3 Cuantificación de DNA.....	39
6.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	40
6.5 Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR.....	40
6.6 Electroforesis en geles de acrilamida.....	41
6.7 Tinción de Plata.....	42
6.8 Fotografía de geles.....	42
7 MÉTODOS	43
7.1 Colección de accesiones de capulí y toma de datos en campo.....	43
7.2 Extracción, cuantificación y evaluación del DNA proveniente de las accesiones.....	44
7.3 Selección de Primers y amplificación de regiones microsatélite (SSR) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	46
7.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.....	47
7.5 Toma de datos y análisis estadísticos.....	49
8 RESULTADOS	51
8.1 Total de muestras de DNA obtenidas.....	51

8.2	Diversidad genética presente en las tres provincias del presente estudio y las ocho provincias estudiadas en las investigaciones actual y preliminar.	51
8.3	Análisis de agrupamientos de las accesiones de capulí de tres provincias: Pichincha, Azuay, y Cañar.....	54
8.4	Análisis de agrupamientos para las accesiones de capulí de ocho provincias del Ecuador: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, y Azuay.	56
9	DISCUSIÓN	58
9.1	Amplificación con 8 primers SSR heterólogos.	58
9.2	Análisis de la diversidad genética presente en las tres provincias estudiadas: Pichincha, Azuay y Cañar.....	58
9.3	Análisis global de la diversidad genética presente en las ocho provincias estudiadas en el estudio preliminar y la presente investigación: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay..	65
10	CONCLUSIONES	72
11	RECOMENDACIONES	74
12	BIBLIOGRAFÍA	75
13	TABLAS	81
14	FIGURAS	92
15	ANEXOS	109

TABLAS

Tabla 1. Primers SSR heterólogos y altamente polimórficos seleccionados para el análisis de diversidad genética en individuos de <i>Prunus serotina</i> subsp. <i>capulí</i> . de ocho provincias de la sierra ecuatoriana (Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay).....	81
Tabla 2. Número de accesiones colectadas e información obtenida a partir los análisis moleculares realizados para las tres provincias analizadas en el presente estudio, las cinco provincias evaluadas durante la primera fase de la investigación (*representa información obtenida de Guadalupe, 2013), y el conjunto de ocho provincias incluidas en ambas fases.....	82
Tabla 3. Cuadro comparativo que relaciona el número total de alelos para cada uno de los ocho primers SSR reportado por estudios preliminares y los valores registrados durante el presente estudio. En color rojo, se señalan los primers en los que este estudio registró un número total de alelos menor a los valores previamente reportados.....	83
Tabla 4. Valores del Índice de distancia genética (<i>F_{st}</i>) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones provenientes de las tres provincias analizadas.....	84
Tabla 5. Valores del Índice de distancia genética (<i>F_{st}</i>) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones provenientes de las ocho provincias analizadas en la primera y segunda fases de esta investigación.....	85
Tabla 6. Valores del Índice de distancia genética (<i>F_{st}</i>) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones correspondientes a las provincias de la zona Norte y las provincias de la zona Sur de la región interandina del Ecuador (Figura 1).....	86
Tabla 7. Valores del Índice de distancia genética (<i>F_{st}</i>) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones correspondientes a las provincias de la zona Norte, las provincias de la zona Central y las provincias de la zona Sur de la región interandina del Ecuador (Figura 1).....	87
Tabla 8. Coeficientes de similitud UPGMA obtenidos a partir de los dendrogramas elaborados con los datos obtenidos de las tres provincias analizadas en el presente estudio, las cinco provincias evaluadas durante la primera fase de la investigación (*representa información obtenida de Guadalupe, 2013) , y el conjunto de ocho provincias incluidas en ambas fases.....	88
Tabla 9. Resumen de las accesiones que conforman cada uno de los clusters (agrupamientos) identificados en el dendrograma que relaciona los datos correspondientes a las tres provincias analizadas en el presente estudio: Pichincha (PIC), Cañar (CAN), y Azuay (AZU) (Figura 14).....	89
Tabla 10. Resumen de las accesiones que conforman cada uno de los clusters (agrupamientos) identificados en el dendrograma que relaciona los datos correspondientes a las ocho provincias analizadas en la primera y segunda fases de la investigación: Carchi (CAR), Imbabura (IMB), Pichincha (PIC), Cotopaxi (C), Tungurahua (T), Chimborazo (H), Cañar (CAN), y Azuay (AZU) (Figura 16).....	90

Tabla 11. Valores de Bootstrap representativos para agrupamientos por provincia (Pichincha, Cañar y Azuay), para las tres provincias analizadas en el presente estudio, y para las ocho provincias incluidas en la primera y segunda fases de la investigación. Para que un agrupamiento sea representativo, debe poseer un valor de bootstrap que sea superior al 70%. *-Datos obtenidos durante la primera fase de la investigación (Guadalupe, 2013).
.....91

FIGURAS

- Figura 1.** Mapa georeferenciado de la región continental de la República del Ecuador que muestra las ocho provincias analizadas durante la primera y segunda fases de esta investigación. No se tomaron en cuenta las provincias de Bolívar y Loja (marcadas con un círculo azul). El software empleado fue ARCGIS v. 10.
.....92
- Figura 2.** Registro del nuevo alelo A1 perteneciente al primer F encontrado en dos accesiones de la provincia de Pichincha (PIC 003 y PIC 006-Anexo 1).
.....93
- Figura 3.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer A. Los 10 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....94
- Figura 4.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer B. Los 4 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....95
- Figura 5.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer C. Los 8 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....96
- Figura 6.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer D. Los 5 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....97
- Figura 7.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer F. 3 de los 4 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....98
- Figura 8.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer G. Los 7 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....99
- Figura 9.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer I. Los 4 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....100
- Figura 10.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del primer L. Los 7 alelos correspondientes se muestran en la foto.
.....101
- Figura 11.** Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de la provincia de Pichincha.....102

Figura 12. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de la provincia de Cañar.....	103
Figura 13. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de la provincia de Azuay.....	104
Figura 14. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de Pichincha, Cañar y Azuay.....	105
Figura 15. PCoA que muestra relaciones de similitud entre accesiones provenientes de las provincias analizadas durante el presente estudio: Pichincha (color naranja), Cañar (color amarillo), y Azuay (color verde claro).....	106
Figura 16. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las ocho provincias analizadas durante la primera y segunda fases de esta investigación: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay.....	107
Figura 17. PCoA que muestra relaciones de similitud entre accesiones estudiadas durante la primera y segunda fases de esta investigación: Carchi (color rojo), Imbabura (color azul), Pichincha (color naranja), Cotopaxi (color verde oscuro), Tungurahua (color morado), Chimborazo (color celeste), Cañar (color amarillo), y Azuay (color verde claro).....	108

ANEXOS

Anexo 1. Registro de las 88 accesiones de <i>Prunus serotina</i> subsp. <i>capulí</i> provenientes de las provincias de Pichincha, Azuay y Cañar que fueron analizadas durante el presente estudio.....	109
--	-----

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Prunus serótina*

1.1.1 Taxonomía: (Fam. Rosaceae; Gen. *Prunus*).

La familia Rosaceae se distribuye ampliamente a nivel mundial pero se concentra principalmente en el hemisferio boreal. Esta categoría taxonómica está formada por casi 100 géneros y 3000 especies. Dentro de esta familia, se encuentran especies de gran importancia económica como aquellas que pertenecen a los géneros *Rosa* y *Malus*. En el Ecuador, se encuentran 12 géneros (7 son nativos) y 50 especies nativas; la mayoría de las especies crecen sobre los 2500 m.s.n.m y pueden ser hierbas, arbustos y árboles (Ulloa & Moller Jorgensen, 1995; Palacios, 2011).

El género *Prunus* está conformado por alrededor de 200 especies que se distribuyen principalmente en zonas templadas ubicadas en los hemisferios boreal y austral. En el Ecuador, se encuentran 4 especies; 2 de ellas habitan la zona interandina: *Prunus rugosa* Koehne y *Prunus serotina* Ehrh. Algunos árboles frutales que pertenecen a este género y provienen del Viejo Mundo también son cultivados (Ulloa & Moller Jorgensen, 1995). Los individuos pertenecientes a este género son árboles que poseen:

“hojas enteras con disposición alterna, margen aserrado, nervadura pinnada y peciolo corto y engrosado; inflorescencia racimosa con flores perfectas que poseen cáliz gamosépalo, 5 pétalos blancos, 10 estambres en el borde del hipanto y 8 en el centro; y frutos que son drupas” (Ulloa & Moller Jorgensen, 1995).

Inicialmente, la especie *Prunus serotina* fue incluida dentro del subgénero *Padus* (Miller) Focke (Rehder, 1940 citado por Pairon et al., 2008). Sin embargo, estudios

filogenético-moleculares recientes acerca del género *Prunus* la han clasificado dentro de un nuevo clado que está formado por los demás individuos que pertenecían al subgénero *Padus* junto con aquellos que conformaban el subgénero *Laurocerasus* (Duh.) Rehder (Bortiri et al., 2006 citado por Pairon et al., 2008).

La nomenclatura “*Prunus serotina*” es la más antigua que ha sido otorgada para la especie y fue establecida por Ehrhart en el año de 1788. Posteriormente, aparecieron otras denominaciones con el fin de identificar a aquellas poblaciones de la misma especie que habitaban regiones geográficas distintas. El nombre “*Prunus capulí*” fue propuesto por Cavanilles en el año de 1800 y otorgado al capulín de origen ecuatoriano. “*Prunus salicifolia*” fue propuesto por Kunth en el año de 1824 para nombrar al capulín semi silvestre de origen colombiano. Por último, “*Cerasus capollin*” fue propuesto por Seringe en el año de 1825 para nombrar a los individuos de origen mexicano (McVaugh, 1951). Posteriormente, la variedad de capulí que crece en países como el Ecuador recibió la denominación de “*Prunus serotina* subsp. *capulí* (Cav.)” por McVaugh (1951); ésta es la nomenclatura con la cual se la identifica en la actualidad.

1.1.2 Distribución geográfica.

Prunus serotina es una especie arbórea, frutal, silvestre, y de rápido crecimiento, sobre todo en zonas templadas. Ésta es endémica del Nuevo Mundo y nativa de Norteamérica (Marquis, 1990 citado por Pairon et al., 2008; Maynard et al., 1991 citado por Downey e Iezzoni, 2000; Niembro, 1990 citado por Fresnedo-Ramírez et al., 2011). Se distribuye a lo largo del continente Americano desde el sur de Canadá al norte pasando por los estados de Florida, Dakota, Nebraska, Kansas, la franja Este de los Estados Unidos,

México, Guatemala, Ecuador y Perú hasta el sur de Bolivia (McVaugh, 1951; Popenoe & Pachano, 1922; Niembro, 1990 citado por Fresnedo-Ramírez et al., 2011).

Adicionalmente, esta especie fue introducida ampliamente en los bosques del continente europeo incluyendo Escandinavia y las islas Británicas ya que constituía una opción viable para lograr la aforestación de zonas abiertas y el enriquecimiento del suelo (Muys et al., 1992 citado por Pairon et al., 2008; Bakker, 1963 y Lousley, 1963 ambos citados por Auclair & Cottam, 1971). Actualmente, la especie se ha dispersado rápidamente hasta invadir diversas zonas como fragmentos de bosques presentes dentro de regiones agrícolas europeas y sitios con suelos pobres en nutrientes (Wallis de Vries, 1986; Muys & Maddelein, 1993; y Muys et al., 1993 citados por Deckers et al., 2005).

En América del Norte, *P. serotina* es una especie silvestre que ocupa bosques de tipo secundario y ha alcanzado áreas recientemente alteradas por la acción humana (Maynard et al., 1991 citado por Downey e Iezzoni, 2000). En el Ecuador, la especie está presente a lo largo del callejón interandino desde la provincia del Carchi localizada cerca del límite norte hasta la provincia de Loja ubicada al sur. Su distribución varía entre los 1800 a 3400 m.s.n.m. y se concentra principalmente en las provincias centrales desde Cotopaxi hasta Azuay (Mille, 1942).

P. serotina tiene un óptimo crecimiento en suelos arenosos y de marga aluvial, terrenos altamente arcillosos, laderas secas y rocosas, y áreas sueltas de arenas volcánicas; estos sitios son comunes en las altiplanicies de la sierra ecuatoriana (Popenoe & Pachano, 1922). Adicionalmente, esta especie es intolerante a la sombra por lo que se desarrolla mejor en claros. Los individuos se convierten en entes dominantes durante la sucesión

secundaria y tienen éxito en terrenos donde recientemente se han producido alteraciones o desastres naturales (CONABIO, 2012).

1.1.3 Historia.

Los registros históricos indican que *P. serotina* fue trasladada desde México a diferentes lugares de América Latina luego de la conquista española (Mille, 1942). En México y la región andina, se llevaron a cabo procesos de domesticación y selección por tamaño, sabor y calidad del fruto. Usualmente, los frutos de *P. serotina* de América del Norte eran pequeños con un diámetro de entre 6 a 10 milímetros, poco carnosos y carecían de valor comercial; mientras que las variedades domesticadas en América Central y Sudamérica se caracterizaban por producir frutos grandes con un diámetro de entre 2 a 3.5 centímetros, carnosos y de agradable sabor (Popenoe, 1924 y Popenoe & Pachano, 1922 ambos citados por Downey e Iezzoni, 2000).

Durante esa época y hasta la actualidad, esta especie no es cultivada a gran escala sino que sólo se produce en jardines, parcelas familiares y en los bordes de carreteras para su cosecha y comercialización a nivel local a cargo de campesinos nativos de la región (Downey, 1999 citado por Downey e Iezzoni, 2000; Popenoe & Pachano, 1922; Diario El Comercio, 2012).

1.1.4 Morfología externa y genética de la variedad ecuatoriana (*P. serotina* subsp. *capulí* (Cav.) McVaugh).

Durante las primeras etapas de su crecimiento, los individuos de *P. serotina* son delgados y se caracterizan por tener una forma piramidal. Eventualmente, el diámetro de la copa aumenta y se presentan ramillas horizontales delgadas y rígidas. Inicialmente, estas ramillas son de color verde claro o bronceado pero luego adquieren una tonalidad clara/ café oscura con tintes rojos. Adicionalmente, las ramillas poseen lentículas pálidas que posteriormente tendrán un color rojo claro (Popenoe & Pachano, 1922).

Generalmente, los individuos de *P. serotina* pueden ser arbustos o árboles que alcanzan una altura promedio de entre 12 a 14 metros (Mille, 1942; CONABIO, 2012). Éstos poseen troncos gruesos que proveen madera de contextura “dura, incorruptible, y susceptible de hermoso pulimento” (Mille, 1942). La corteza puede ser de color café o gris oscuro “con pequeños e irregulares agrietamientos en la superficie”; su grosor oscila entre una y media a tres y cuarto pulgadas (Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012). La raíz se desarrolla rápidamente y de forma superficial; “ésta se extiende a mediana profundidad y ocupa los primeros 60 cm del suelo” (CONABIO, 2012).

Sus hojas son de color verde oscuro y brillante, tienen disposición alterna con respecto al tallo, y son simples, oblongas, lanceoladas, acuminadas hacia el ápice, dentadas, y lampiñas; su longitud oscila entre los 7 y 12 centímetros. Poseen un peciolo largo que extiende hasta los 3 centímetros y pueden presentar de 2 a 3 glándulas (Mille, 1942; Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012).

Sus flores son blancas, despiden una deliciosa fragancia y están formadas por un cáliz lobulado que se asemeja a un cono invertido; además, poseen alrededor de cinco

pétalos redondos (Mille, 1942). El ovario es “libre, sésil, unilocular, y contiene 2 óvulos; su estilo es simple y el estigma es peltado” (Mille, 1942). Las flores se disponen en racimos delgados que varían entre los 7 y 20 centímetros de largo y aparecen durante la etapa media de crecimiento de las hojas (Mille, 1942; Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012).

Los frutos son drupas globosas, lampiñas, carnosas y jugosas de corteza fina junto con una semilla dura y crecen en racimos. Durante las primeras etapas de la fase de maduración, el fruto es de color rojo oscuro; luego, adquirirá una tonalidad negra rojiza (Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012). El sabor de los frutos depende del tipo de árbol y la región donde se desarrolla. Los frutos con los sabores más agradables provienen de las provincias de Tungurahua y Azuay; son dulces y ligeramente amargos (Mille, 1942). En el Ecuador, los frutos maduran durante los primeros meses del año (Popenoe & Pachano, 1922).

P. serotina es una especie tetraploide (Downey e Iezzoni 2000) y aloploiploide (Pairon et al; 2008). Los aloploiploides se forman por un proceso de hibridación seguido de una fase de duplicación del número total de cromosomas (Bennett, 2004 citado por Pairon & Jacquemart, 2005). Los dos genomas parentales en este tipo de híbridos son parcialmente homólogos. De todas formas, éstos experimentan poca recombinación intergenómica y se mantienen íntegros durante generaciones formadas por descendientes que son producto de reproducción sexual. Cabe mencionar que el mantenimiento de la integridad de los genomas parentales no limita la flexibilidad evolutiva de los híbridos. Una de las razones podría ser la presencia de heterosis (Comai, 2000).

1.1.5 Usos y aplicaciones de la especie.

Los frutos de esta especie son altamente apreciados por su tamaño y agradable sabor. A diferencia de los frutos que maduran en países de América del Norte los cuales son pequeños (de 6 a 10 mm de diámetro), poco carnosos y tienen un sabor astringente, aquellos que se desarrollan en países de la región Andina como el Ecuador son más grandes (de 2 a 3.5 cm aproximadamente), carnosos, jugosos, y dulces (McVaugh, 1951; Popenoe, 1924 y Popenoe & Pachano, 1922 citados por Downey e Iezzoni, 2000; Mille, 1942). Estas características han propiciado que *P. serotina* se convierta en un ingrediente fundamental en la dieta y vida económica de la población indígena. Los miembros de este grupo humano consumen altas cantidades de este producto convirtiéndolo en uno de los más importantes de la región interandina ecuatoriana. Además, un gran porcentaje de estos habitantes se dedica a producir y cosechar los frutos de la especie para comercializarlos internamente y a nivel local con el fin de sustentar a sus familias. Adicionalmente, el fruto es empleado para la elaboración de mermeladas, jaleas y coladas las cuales son consumidas por las familias de la comunidad; también, se elabora un tipo de estofado denominado “Jucho” y un tipo de licor destilado parecido al *Kirsch* o al *maraschino* (Popenoe & Pachano, 1922; Diario El Comercio, 2012; CONABIO, 2012).

En países de América del Norte como los Estados Unidos, la madera proveniente de esta especie es altamente valorada por características como su dureza, facilidad de manejo y la capacidad de adquirir un atractivo pulimento; estas cualidades le dan un alto valor comercial en el mercado (Liu & Pijut, 2008; Maynard, 1994; Mille, 1942; CONABIO, 2012). En el Ecuador, la madera extraída de individuos de *P. serotina* se la emplea como leña, para la fabricación de muebles y para “el acabado interno de las casas”;

además, los árboles son sembrados en los bordes de los campos para utilizarlos como “cortina rompe-vientos” para evitar la erosión de los suelos (Palacios, 2011; Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012).

En el aspecto medicinal, la infusión de las hojas de capulí se emplea como “expectorante, estimulante, febrífugo, antiespasmódico, tónico, sedante y para combatir diarreas” (CONABIO, 2012; Popenoe & Pachano, 1922). La corteza de ramas y raíces contiene ácido hidrocianico el cual posee propiedades tónicas y sedantes; por ello, las infusiones provenientes de estas partes de la planta pueden ser empleadas para combatir la tisis pulmonar y la debilidad nerviosa (Popenoe & Pachano, 1922; CONABIO, 2012).

Adicionalmente, un estudio llevado a cabo en México evaluó las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del extracto acuoso, acetónico, etanólico y metanólico del fruto de esta especie. Se comprobó que el extracto etanólico presenta una alta concentración de antocianinas y polifenoles los cuales le confieren propiedades antioxidantes y antimicrobianas. En conclusión, este extracto tiene un gran potencial para ser empleado como aditivo para alimentos (Jiménez et al., 2011).

1.2 Diversidad genética: concepto, importancia a nivel de especie, aplicaciones y métodos de evaluación.

“Biodiversidad” es un término que involucra la diversidad de especies o el conjunto completo de todos los seres vivos que moran en nuestro planeta; la diversidad genética que es la variación en genes y genotipos existente dentro de una especie o entre especies; y la diversidad en ecosistemas que considera a las distintas comunidades biológicas y su asociación con el medio ambiente en términos físicos y químicos (Primack, 2006; Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002). La “diversidad genética provee la materia prima para que se desarrolle la evolución mediante la selección natural” (Fisher, 1930 citado por Randall Hughes et al., 2008). La variabilidad genética permite que las especies se adapten de forma efectiva a su ambiente cambiante lo cual aumenta sus posibilidades de supervivencia (Torres, 2001). Procesos genéticos como las mutaciones y las recombinaciones genéticas favorecen la aparición de nuevos alelos y genotipos mientras que la deriva génica y la endogamia pueden reducir el nivel de diversidad genética de un individuo o una población (Torres, 2001; Primack, 2006; Lacy, 1997).

Una alta diversidad genética y la continua aparición de nuevos alelos puede contribuir a que los individuos respondan de mejor manera ante condiciones ambientales adversas lo cual aumenta su aptitud (*fitness*) en términos fisiológicos; de esta forma; solo los individuos que presenten genotipos favorables serán capaces de sobrevivir, reproducirse, y dejar descendencia viable. A medida que aparezcan las siguientes generaciones, las frecuencias genéticas de la población experimentarán cambios; esta dinámica de fluctuaciones continuas en el pool genético es lo que caracteriza a la selección natural (Primack, 2006). Un declive en la variabilidad genética de una población puede

afectar su viabilidad y permanencia a largo plazo ya que la aptitud de los individuos y su habilidad para adaptarse se ve reducida (Lacy, 1997). La diversidad genética no solo tiene un impacto directo en la estabilidad de las poblaciones sino que también afecta los procesos biológicos que se desarrollan a nivel de comunidades y ecosistemas. Ésta determina el grado de variación fenotípica de las especies presentes lo cual define el tipo de interacciones interespecíficas que existen en ambos niveles (Randall Hughes et al., 2008).

El nivel de variabilidad genética de una población depende del número de genes polimórficos existentes en su pool genético y el número de alelos para cada uno de estos genes. La presencia de genes polimórficos permitirá la presencia de individuos heterocigotos. Se ha comprobado que este tipo de individuos poseen mayor aptitud (*fitness*) que aquellos que son homocigotos; este fenómeno recibe el nombre de “vigor híbrido o heterosis”. Esto ocurre ya que la presencia de dos alelos diferentes otorga una mayor “flexibilidad” al momento de sobrellevar circunstancias adversas. Además, la existencia de alelos nocivos provenientes de uno de los padres puede ser enmascarada por la presencia de genes funcionales adquiridos a partir del otro progenitor (Primack, 2006).

Actualmente, factores como la deforestación, la destrucción de los ecosistemas, la erosión de los suelos, el poco conocimiento existente acerca de los recursos naturales circundantes, las actividades humanas como la minería y la construcción de carreteras, y el acelerado crecimiento poblacional a nivel mundial están contribuyendo a la reducción de la biodiversidad, la desaparición de la variabilidad genética en poblaciones de animales y plantas, y ya han condenado a algunas especies a la extinción (Torres, 2001; Primack, 2006). En este aspecto, la ejecución de estudios que evalúen el nivel de variabilidad genética de las especies y sus patrones de distribución espacial es fundamental ya que la

información provista a través de estas investigaciones contribuye favorablemente al momento de tomar decisiones y establecer acciones que promuevan su conservación (Torres, 2001; Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002).

En el área agrícola, los recursos genéticos provenientes de especies vegetales cultivables son de gran importancia a nivel mundial; su conservación es fundamental para asegurar el sustento alimenticio de las poblaciones humanas presentes y sus futuras generaciones (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002). Lamentablemente, la incidencia de factores como las sesgadas políticas agropecuarias que favorecen la prevalencia de ciertos cultivos, el uso extensivo de los monocultivos, y la supremacía de prácticas agrícolas que involucran el uso exacerbado de variedades mejoradas desarrolladas a partir de un sólo origen han causado una reducción en el nivel de variabilidad genética de los cultivos (Torres, 2001). Además, la introducción de variedades mejoradas ha dejado de lado a aquellas de tipo silvestre que pueden contener germoplasma altamente valioso. En los últimos años, se han reforzado las labores de conservación *ex situ* e *in situ* de poblaciones de especies vegetales lo cual ha contribuido a la protección de los parientes silvestres de los cultivos. Sin embargo, muchas de estas iniciativas no incluyen una evaluación previa de la diversidad genética que están protegiendo lo cual incide negativamente en el progreso que puedan tener estos proyectos (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002; Rauf et al., 2010).

En nuestro país, los análisis de diversidad genética han contribuido a la ejecución de programas de mejoramiento genético de especies de alta relevancia a nivel agropecuario. La gran diversidad agrícola del Ecuador puede contener genes que sean útiles para desarrollar variedades altamente productivas que gocen de una mejor adaptabilidad a los cambios ambientales y que sean resistentes a plagas y enfermedades (Torres, 2001). En

épocas pasadas y a nivel mundial, los procesos de mejoramiento de cultivos mediante la selección de variedades con alta rentabilidad a nivel comercial han estado a cargo de campesinos y pequeños productores quienes seleccionaban a aquellos individuos con características fenotípicas favorables y los cultivaban de manera selectiva por varias generaciones; en el proceso, solo ciertos alelos eran conservados y los demás eran descartados (Budak et al., 2004; Mondini et al., 2009).

Los avances en áreas como la biología molecular y la biotecnología han proporcionado técnicas y procedimientos de diagnóstico genético que han otorgado eficiencia a los procesos de selección de variedades de gran importancia económica. Éstas técnicas se basan en el uso de marcadores moleculares que permiten determinar el nivel de variabilidad genética dentro de una especie mediante el análisis de regiones específicas dentro de su genoma. Las especies con pools genéticos altamente diversos pueden tener el potencial de contener alelos que puedan ser beneficiosos en el futuro; a continuación, se pueden realizar estudios que identifiquen genes directamente relacionados con la presencia de características fenotípicas de gran valor comercial. Finalmente, esta información resultará útil al momento de seleccionar individuos y planificar cruces que produzcan híbridos que posteriormente contribuyan a la aparición de variedades mejoradas (Mondini et al., 2009; Budak et al., 2004; Moose & Mumm, 2008). Es necesario resaltar que los programas de mejoramiento genético de especies también deberían involucrar componentes encaminados a la conservación *in situ* y *ex situ* de germoplasma para proteger los valiosos recursos genéticos que provee la naturaleza lo cual permitirá un uso sostenible de los mismos a largo plazo (Torres, 2001).

1.3 Marcadores Moleculares

1.3.1 Definición, clasificación y aplicaciones.

Un marcador molecular es un locus genómico cuya presencia puede ser detectada de forma rápida ya sea a través de sondas o secuencias iniciadoras específicas (primers). Esta región del DNA muestra de forma clara “la característica cromosómica que representa junto con las zonas flanqueantes localizadas en los extremos 5’ y 3’”. Además, su modo de herencia puede ser monitoreado fácilmente (Mondini et al., 2009; Kumar et al., 2009). El empleo de los marcadores moleculares se basa en la existencia de polimorfismos en el DNA. Un polimorfismo genético se define como “la ocurrencia simultánea de una característica que posee dos o más variantes discontinuas o genotipos dentro de una misma población” (Kumar et al., 2009).

Para que un marcador molecular sea ideal, éste debe cumplir condiciones como ser altamente polimórfico; debe tener herencia codominante lo cual permite diferenciar a los individuos heterocigotos y homocigotos; debe tener ocurrencia frecuente y distribución uniforme a lo largo del genoma; debe proveer una adecuada resolución que permita detectar las diferencias genéticas presentes; su detección debe ser fácil, rápida, poco costosa, y reproducible entre laboratorios; y no se debe requerir información previa acerca del genoma en estudio. Cabe recalcar que ninguno de los marcadores moleculares actualmente disponibles involucra todos estos criterios; de todas formas y dependiendo del tipo de estudio que se vaya a llevar a cabo, es preciso elegir un marcador que por lo menos incluya varios de ellos (Mondini et al., 2009; Kumar et al., 2009; Weising et al., 1995 citado por Kumar et al., 2009).

El rol principal de los marcadores moleculares es resaltar los polimorfismos que puedan existir en una secuencia de DNA específica dentro de un grupo de individuos distintos; estas variaciones genéticas pueden ser producto directo de inserciones, deleciones, translocaciones, duplicaciones, y mutaciones puntuales. Cabe recalcar que los marcadores moleculares no brindan información acerca de la actividad de genes determinados. Algunas de las ventajas de los marcadores moleculares son su insensibilidad e independencia de los factores ambientales; su aplicabilidad a todos los rincones del genoma lo cual incluye exones, intrones y zonas reguladoras; la ausencia de efectos epistáticos y pleiotrópicos; y su capacidad de identificar polimorfismos que no están relacionados con la variación fenotípica (Mondini et al., 2009).

Los diferentes tipos de marcadores moleculares se dividen en dos categorías: los que se basan en métodos de restricción e hibridación y los que se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Cuando se emplean aquellos marcadores que pertenecen a la primera categoría, los perfiles de DNA se visualizan luego de que la muestra ha sido cortada con enzimas de restricción y los fragmentos se han hibridado a una sonda marcada que contiene una secuencia conocida; los RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism) y VNTR's (Variable Number of Tandem Repeats) son dos ejemplos de este tipo de marcadores (Kumar et al., 2009; Mondini et al., 2009).

Por el contrario, cuando se emplean aquellos marcadores que son parte de la segunda categoría, las secuencias de DNA de interés son amplificadas *in vitro* de forma exponencial mediante el uso de secuencias de oligonucleótidos randómicas o específicas denominadas primers y una enzima polimerasa de DNA termoestable. Posteriormente, las

copias de DNA resultantes son separadas a través de electroforesis y los patrones de bandas presentes son visualizados mediante autorradiografía o tinción. Los RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) y los AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism) son marcadores que involucran el uso de primers con secuencias aleatorias mientras que los SSRs (Simple Sequence Repeats) y los SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) son marcadores que requieren primers con secuencias específicas (Kumar et al., 2009; Mondini et al., 2009).

Adicionalmente, los diferentes tipos de marcadores moleculares también se pueden dividir en otros dos grupos: los que permiten analizar un locus a la vez y los que tienen la capacidad de escanear múltiples loci al mismo tiempo. Aquellos marcadores que pertenecen al primer grupo emplean sondas o primers con secuencias específicas los cuales pueden hibridarse o amplificar regiones determinadas del genoma; estos son codominantes ya que permiten diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos. Por otro lado, los marcadores que son parte del segundo grupo pueden analizar varios loci genómicos de forma simultánea a través de su amplificación mediante primers con secuencias aleatorias; estos son considerados como dominantes ya que solo permiten constatar la presencia/ausencia de un locus pero sin distinguir entre homocigotos ni heterocigotos (Mondini et al., 2009).

Finalmente, existen marcadores moleculares que no analizan secuencias dentro del DNA genómico sino que se encargan de escanear regiones de DNA de cloroplasto, mitocondrial, y ribosomal, elementos transponibles, y cDNA's provenientes de RNA's (Mondini et al., 2009).

Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para evaluar la variabilidad genética de poblaciones y la construcción de mapas genéticos y físicos que han permitido relacionar características fenotípicas con ciertas regiones del genoma (Mondini et al., 2009). Son muy útiles en el área de mejoramiento genético y producción de variedades mejoradas donde son empleados durante el proceso de selección de parentales con características fenotípicas de importancia comercial. Incluso, su aplicación permite calcular “la proporción de variación fenotípica que es controlada por el genotipo” lo cual se traduce en la identificación de QTL's (loci asociados a características cuantitativas) (Moose & Mumm, 2008; Budak et al., 2004). El empleo de marcadores moleculares incrementa la eficiencia en la selección de individuos que sean buenos candidatos para el desarrollo de cultivos mejorados ya que complementan la información que es adquirida mediante el análisis del fenotipo; los datos que éstos proveen permiten aumentar el nivel de ganancias a nivel genético en casos en donde el fenotipo no puede ser evaluado ya que es dependiente de factores ambientales (Moose & Mumm, 2008; Lande & Thompson, 1990 citado por Moose & Mumm, 2008).

1.3.2 Marcadores moleculares de tipo microsatélite (SSR).

Los marcadores moleculares microsatélites (SSR: Simple Sequence Repeats) son repeticiones en tándem de unidades formadas por uno a seis nucleótidos; los ejemplos más comunes son los sets $(A)_n$, $(TC)_n$, $(TAT)_n$, y $(GATA)_n$ donde n puede ser un valor que oscile entre uno hasta decenas de unidades (De Vienne, 2003; Kumar et al, 2009; Wang et al., 2009). Estas regiones se distribuyen de forma aleatoria en el genoma nuclear de la mayoría de especies eucariotas y en un pequeño porcentaje de especies procariotas (Kumar

et al., 2009; Wang et al., 2009; Mondini et al., 2009; Ijaz, 2011). Este tipo de marcadores también han sido encontrados en los genomas de cloroplasto en plantas y en los genomas mitocondriales de animales y plantas (Wang et al., 2009). Los microsatélites se han clasificado en cuatro categorías:

“simples perfectos, simples imperfectos, compuestos perfectos, o compuestos imperfectos. Las repeticiones simples perfectas son sets en tándem de una sola secuencia repetitiva. Las repeticiones simples imperfectas son sets que están formados por una o más secuencias repetitivas de diferentes longitudes. Las repeticiones compuestas perfectas se componen de dos o más secuencias repetitivas de la misma longitud. Finalmente, las repeticiones compuestas imperfectas se interrumpen por una o más secuencias repetitivas de diferentes longitudes” (Wang et al., 2009).

En especies de plantas, se ha observado que “la frecuencia de microsatélites está inversamente relacionada con el tamaño del genoma y que el porcentaje de DNA repetitivo es relativamente constante en regiones codificantes”; además, las unidades repetitivas de tres nucleótidos son más comunes en especies monocotiledóneas mientras que las unidades repetitivas formadas por un solo nucleótido son más frecuentes en especies dicotiledóneas (Wang et al., 2009).

Los microsatélites pueden estar presentes en regiones codificantes y no codificantes del genoma; su sitio de inserción determina su función. Si están presentes dentro de regiones codificantes, estos pueden afectar la expresión correcta de un gen; mientras que si se localizan en zonas no codificantes, estos pueden afectar la regulación o transcripción de un gen (Ijaz, 2011; Wang et al., 2009).

El protocolo que permite identificar regiones SSRs dentro del genoma está basado en la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando primers específicos de entre 18 y 24 pares de bases cuyas secuencias son complementarias a regiones conservadas presentes en los flancos del microsatélite. Generalmente, se requieren bajas concentraciones de DNA (entre 10 y 100 ng) y este no necesariamente debe ser de alta calidad. Los polimorfismos relacionados con la longitud de SSR amplificado pueden ser detectados mediante geles de agarosa, geles de acrilamida, o secuenciadores automáticos (Wang et al, 2009; Ijaz, 2011; Kumar et al., 2009).

Estos marcadores se caracterizan por ser altamente abundantes y pueden estar presentes “en millones de copias en el genoma de una especie” (De Vienne, 2003; Budak et al., 2004; Mondini et al, 2009; Hayden & Sharp, 2001; Wang et al., 2009; Kumar et al., 2009). También, se caracterizan por ser altamente polimórficos, reproducibles e informativos; tener herencia codominante; ser fáciles de automatizar y analizar; ser efectivos, confiables y costo-efectivos; y poder ser transferibles entre especies (Budak et al., 2004; De Vienne, 2003; Ijaz, 2011; He et al., 2003; Hayden & Sharp, 2001; Wang et al., 2009; Kumar et al., 2009).

Las regiones microsatélites del genoma tienen altas tasas de mutación las cuales oscilan entre 10^{-6} a 10^{-2} ; por ello, los SSRs tienen una alta variabilidad la cual es superior en comparación a otros marcadores (Wang et al., 2009; He et al., 2003). El polimorfismo de los microsatélites se debe a las diferencias en longitud que caracterizan a estas regiones lo cual está directamente relacionado con el número de veces en las que la unidad repetitiva está presente (Mondini et al., 2009). La incidencia de una alta variabilidad en el número de repeticiones en tándem presente en las regiones microsatélites puede ser producida por

varios factores como las fallas que comete la polimerasa durante la replicación del DNA, presencia de recombinación (“crossing over”) desigual, errores durante la reparación de bases mal apareadas o rotura de doble cadena, o la retrotransposición. Las anomalías en estos procesos genéticos aumentan o disminuyen el tamaño original de los microsatélites (Wang et al., 2009; Ijaz, 2011; Kumar et al., 2009).

La alta reproducibilidad de los microsatélites permite que éstos puedan ser empleados de forma fiable en más de un laboratorio; los datos producidos en un sitio pueden comprobarse en otros lugares para establecer información científica basada en datos consistentes (Ijaz, 2011).

Existen varias formas de obtener marcadores de tipo microsatélite. Una de ellas es realizar un escaneo de una biblioteca genómica usando sondas SSR marcadas y luego secuenciar los clones hibridados. Éste es el procedimiento tradicional pero es muy costoso y laborioso. Una opción más práctica es utilizar sondas SSR marcadas para escanear bibliotecas “enriquecidas” con microsatélites. Una segunda alternativa es identificar SSRs en secuencias de DNA presentes en bases de datos mundiales o buscar registros de secuencias microsatélites dentro de estos sitios. Una tercera opción es utilizar las secuencias microsatélites provenientes de estudios genéticos realizados en especies emparentadas con aquella que está en estudio. Es preciso mencionar que las tres opciones involucran la posterior síntesis de primers específicos que sean complementarios para las regiones flanqueantes conservadas del microsatélite. De las tres alternativas, la mejor es la tercera ya que se ahorra mucho tiempo y dinero. En este caso, la posibilidad de transferir marcadores moleculares microsatélites entre una especie y otras pertenecientes al mismo género o entre especies que pertenecen a diferentes géneros dentro de la misma familia

resulta ser altamente beneficiosa (Wang et al., 2009; Kumar et al., 2009; Hayden & Sharp, 2001; He et al., 2003).

Algunas desventajas del uso de marcadores microsatélites son el hecho de que su elaboración requiere un extenso conocimiento previo acerca de las secuencias del DNA de la especie en estudio; la técnica puede subestimar las mediciones de la estructura genética de una población; y puede haber presencia de alelos nulos. Por esta razón, su uso se ha dirigido a la evaluación de especies con importancia agrícola y se ha dejado de lado a las especies silvestres (Mondini et al., 2009; Wang et al., 2009; Ijaz, 2011; Kumar et al., 2009).

Los marcadores moleculares de tipo microsatélite son utilizados para realizar mapeo genético, identificar cultivos y conducir programas de selección asistida por marcadores, analizar la diversidad genética y relaciones filogenéticas entre especies, ejecutar estudios poblacionales y evolutivos, y para evaluar paternidad y huella de DNA (Wang et al., 2009; Kumar et al., 2009; Hayden & Sharp, 2001; Ijaz, 2011).

1.4 Estudios sobre diversidad genética mediante marcadores moleculares realizados en *Prunus serótina* y/o otras especies del género *Prunus*: información disponible en la actualidad.

La mayoría de estudios de variabilidad genética realizados hasta el momento que han empleado marcadores moleculares microsatélites involucran a varias especies del género *Prunus* como el durazno (*P. persica* L. Batsch) (Aranzana et al., 2002; Aranzana et al., 2003; Dirlewanger et al., 2002); el albaricoque Japonés (*P. mume* Sieb et. Zucc) (Gao et al., 2004); el albaricoque silvestre (*P. armeniaca* L.) (Hormaza 2002; Maghuly et al., 2005; Romero et al., 2003; Tian-Ming et al., 2007; Zhebentyayeva et al., 2003); el cerezo dulce (“sweet cherry”) (*P. avium* L.) (Struss et al., 2003; Wunsch & Hormaza 2002; Dirlewanger et al., 2002); el almendro (*P. communis* Fritsch.) (Xu et al., 2004); y *P. davidiana* (Carr.) Franch (Cheng et al., 2011).

Se han realizado muy pocas investigaciones a nivel mundial acerca de la diversidad genética de *Prunus serotina*. A continuación, se mencionarán dos ejemplos concretos. El primer estudio involucró el uso de marcadores microsatélites provenientes del cerezo dulce (“Sweet Cherry”) (*Prunus avium*), el durazno (*Prunus persica*), y el cerezo amargo (“Sour Cherry”) (*Prunus cerasus*) y realizó una pequeña evaluación de la variabilidad genética presente en accesiones provenientes del estado de Michigan (Estados Unidos), México y Ecuador (Downey e Iezzoni, 2000). Un segundo estudio también utilizó marcadores moleculares microsatélites provenientes de las especies anteriormente mencionadas para evaluar la variabilidad genética en poblaciones de *Prunus serotina* provenientes de América del Norte (individuos nativos) y Europa (individuos introducidos) con el fin de

descifrar el origen de la especie en Norte América y la historia de su introducción en el continente europeo (Pairon et al., 2010).

Uno de los factores que explica la ausencia de investigaciones sobre la variabilidad genética de *Prunus serotina* es el costoso proceso de síntesis de marcadores microsatélites específicos para la especie en estudio en caso de que éstos no estén disponibles (Kumar et al., 2009). Sin embargo, dos estudios han analizado la efectividad de amplificación y el nivel de polimorfismo cuando se utilizan marcadores SSRs provenientes de especies cercanamente relacionadas con *P. serotina* y han comprobado que es posible transferir marcadores entre especies genéticamente emparentadas (Downey e Iezzoni, 2000; Pairon et al., 2008). Este hecho también se ha podido confirmar entre especies pertenecientes a otros clados taxonómicos (Downey e Iezzoni, 2000). Por lo cual, se concluye que aunque si existen herramientas que permiten evaluar la diversidad genética de esta especie, pocos esfuerzos se han invertido para llevar a cabo esta tarea.

Este estudio constituye la segunda fase de una investigación que evalúa la variabilidad genética de *Prunus serotina* subsp. *capulí* en el territorio ecuatoriano. Se incluyen los datos obtenidos durante la primera fase (Guadalupe, 2013) que analizó cinco provincias de la sierra ecuatoriana y los nuevos datos obtenidos durante esta fase sobre otras tres provincias con el fin de adquirir una visión global del nivel y patrón de distribución de la diversidad genética de la especie en el callejón interandino del Ecuador. La información provista en este estudio podrá ser empleada posteriormente para determinar la factibilidad de programas de mejoramiento genético en el capulí.

2 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar el grado de diversidad genética del capulí (*Prunus serótina* subsp. *capulí*) presente en la región interandina del Ecuador utilizando marcadores microsatélites (SSR-Short Sequence Repeats).

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar el nivel y patrones de distribución de la variabilidad genética de *Prunus serotina* subsp. *capulí* dentro y entre tres provincias de la sierra ecuatoriana: Pichincha, Azuay y Cañar.
- ❖ Analizar de forma global el grado de variabilidad genética de *Prunus serotina* subsp. *capulí* y sus patrones de distribución entre ocho provincias del callejón interandino: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, y Azuay.

4 ÁREA DE ESTUDIO

Para la presente investigación, se colectó hojas de capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) en tres provincias de la sierra ecuatoriana: Pichincha, Cañar y Azuay. La mayoría de sitios de colección constituyeron los patios de casas ubicadas dentro y fuera de ciudades y los bordes de carretera. Los análisis moleculares y estadísticos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Quito-Ecuador.

5 JUSTIFICACIÓN

El capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) es una especie que guarda un enorme potencial el cual puede ser aprovechado en distintos ámbitos como la industria maderera, la industria de alimentos y la medicina.

En primer lugar, su madera posee cualidades de gran interés comercial como “su dureza, incorruptibilidad y susceptibilidad a alcanzar un hermoso pulimento” (Mille, 1942). Puede ser empleada en ebanistería y elaboración de muebles (Popenoe & Pachano, 1922) por lo cual es altamente cotizada en países de América del Norte (Marquis, 1990 citado por Pairen et al., 2008; Downey e Iezzoni, 2000). Campesinos y agricultores de la región interandina son conscientes de la resistencia y dureza de los troncos de los árboles de esta especie. Por ello, los siembran en los bordes de sus campos de cultivo para emplearlos como “cortinas rompe-vientos” con el fin de evitar la erosión de sus tierras (Palacios, 2011; CONABIO, 2012).

Además, un estudio comprobó las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del extracto etanólico proveniente del fruto de esta especie. Por lo cual, éste podría ser empleado como aditivo para alimentos (Jiménez et al., 2011).

Finalmente, las infusiones de hojas y cortezas de esta especie pueden ser empleadas para tratar y combatir diversas dolencias como diarreas, fiebres, tisis pulmonar, debilidad nerviosa, entre otras (CONABIO, 2012; Popenoe & Pachano, 1922).

La información previamente mencionada muestra el alto potencial económico de esta especie. Sin embargo, en Ecuador, la madera del capulí no es un material que ha sido incorporado a la industria maderera y sólo es utilizado en comunidades rurales. Además, no

existen plantaciones comerciales de capulí y sus frutos siguen siendo cosechados por un reducido porcentaje de la población y comercializados sólo a nivel local (J. Tobar, comunicación personal, 22 de abril del 2013; Diario El Comercio, 2012). Finalmente, las propiedades medicinales, antioxidantes y antimicrobianas de la especie son desconocidas por un amplio sector de la sociedad.

A nivel mundial, se han llevado a cabo muy pocas investigaciones que evalúan la diversidad genética de *Prunus serotina* (Downey e Iezzoni, 2000; Pairon et al., 2010); mientras que a nivel nacional, existe una ausencia total de estudios al respecto a pesar de que ésta es una especie muy conocida y apetecida en la región interandina del Ecuador (Diario El Comercio, 2012; Popenoe & Pachano, 1922). Su amplia distribución geográfica brinda indicios de su capacidad de adaptarse a zonas con diversas condiciones ambientales. Este hecho podría estar relacionado con la presencia de una alta variabilidad genética en esta especie (Auclair & Cottam, 1971; Hough, 1960 citado por Auclair & Cottam, 1971).

Se requieren estudios de diversidad genética que permitan analizar la riqueza del pool genético de esta especie. Un pool genético con alta variabilidad podría contener genes o secuencias relacionadas con la presencia de características fenotípicas relevantes. Posteriormente, se podría identificar a individuos que posean alelos de interés con el fin de llevar a cabo programas de mejoramiento genético que puedan generar variedades de capulí que sean altamente competitivas a nivel comercial (Mondini et al., 2009; Budak et al., 2004; Moose & Mumm, 2008). La información proveniente de estas investigaciones también será útil para poder comprender la dinámica a nivel genético presente en las poblaciones de esta especie en la región interandina del Ecuador.

6 MATERIALES

6.1 Fase de campo: colección de accesiones de capulí

- ❖ Se colectó hojas jóvenes y frutos maduros de 88 árboles (accesiones) de capulí encontrados en las provincias de Pichincha, Cañar y Azuay.
- ❖ Fundas ziploc medianas
- ❖ GPS (Garmin)
- ❖ Papel de algodón (Kimberly)
- ❖ Cooler portátil y paquetes con hielo.

6.2 Extracción de DNA

- ❖ Nitrógeno líquido (N₂)
- ❖ Buffer de extracción CTAB 2X
- ❖ 2, B-mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH)
- ❖ Cloroformo-Octanol (24:1)
- ❖ Isopropanol (a temperatura de hielo)
- ❖ Etanol 70%
- ❖ Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0).
- ❖ Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- ❖ Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

6.3 Cuantificación de DNA

- ❖ NANODROP 1000 (ThermoScientific)

- ❖ Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- ❖ Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

6.4 Electroforesis en geles de agarosa

- ❖ SeaKem LE Agarose
- ❖ TBE 1X (Tris base -Acido Borico- EDTA)
- ❖ SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- ❖ UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- ❖ Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- ❖ Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- ❖ EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell)
- ❖ MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- ❖ Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- ❖ Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

6.5 Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR

- ❖ Taq DNA polimerasa 5U/μL (Invitrogen)
- ❖ Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- ❖ MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- ❖ UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- ❖ dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- ❖ 8 pares de primers SSR (Tabla 1)
- ❖ Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

- ❖ T Personal Thermocycler (Biometra)

6.6 Electroforesis en geles de acrilamida

- ❖ UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)
- ❖ UltraPure™ N,N'-Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- ❖ TBE 10X (Tris – Acido Borico – EDTA)
- ❖ UltraPure™ UREA (Invitrogen)
- ❖ Detergente Alconox
- ❖ Cleaning sheets-Kimwipes (Kimberly-Clark)
- ❖ Etanol 70%
- ❖ Rain.X™
- ❖ Sigmacote® (SIGMA)
- ❖ Solución para tratamiento de vidrios: etanol 96% y ácido acético glacial 0.5%.
- ❖ Bind-Silane (3-Trimethoxysilyl-propyl-methacrylate 98%) (SIGMA-ALDRICH).
- ❖ Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- ❖ UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethilenediamine) (Invitrogen)
- ❖ TBE 1X (Tris base -Acido Borico- EDTA)
- ❖ Buffer de carga para pre-corrída (Glicerol + Azul de Bromofenol)
- ❖ Blue Juice 10X (Invitrogen)
- ❖ Ladder 10bp (Invitrogen)
- ❖ Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- ❖ T100 Thermal Cycler (BIORAD)
- ❖ Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)

- ❖ Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)

6.7 Tinción de Plata

- ❖ Alcohol absoluto (J.T. Baker)
- ❖ Ácido acético glacial (MERCK)
- ❖ Agua destilada
- ❖ Nitrato de Plata (FISHER)
- ❖ Hidróxido de Sodio (MERCK)
- ❖ Formaldehído 37% (MERCK).

6.8 Fotografía de geles

- ❖ Cámara fotográfica (Canon XPOSZ)

7 MÉTODOS

7.1 Colección de accesiones de capulí y toma de datos en campo

En esta fase inicial, se visitaron varias localidades dentro de las provincias de Pichincha, Azuay, y Cañar (Anexo 1). Se seleccionaron sitios para realizar la colección de accesiones dentro de aquellas zonas donde había presencia de esta especie. Durante este proceso, prevalecieron los principios de randomización e interspersión con el fin de obtener una muestra que representara de forma significativa a cada una de las tres provincias (Karban & Huntzinger, 2006). Se recolectaron hojas jóvenes de árboles de capulí. La recolección de las accesiones se llevó a cabo durante los primeros meses del año 2012: febrero, marzo y abril.

Durante el proceso de colección, se asignó un código específico y único a cada una de las accesiones. Los códigos se conformaron utilizando un prefijo correspondiente a la provincia dentro de la cual se colectó la accesión (PIC, AZU, ó CAN) y el número de colección (desde 001 en adelante). Por accesión, se registraron los siguientes datos en el cuaderno de campo: el código de la accesión, la fecha de la colección, la provincia donde se realizó la colección, una referencia espacial y geográfica breve acerca de la zona dentro de la provincia donde se realizó la colección, las coordenadas geográficas del sitio de colección las cuales fueron determinadas utilizando un GPS, la edad aproximada del árbol donde se realizó la colección (adulto, medio, joven), la estructura del mismo (erecto o disperso), y la altitud donde se encontraba el sitio de colección en m.s.n.m. la cual también pudo ser establecida a través del GPS.

Las accesiones fueron transportadas en fundas ziploc las cuales fueron debidamente rotuladas con el correspondiente código de colección. La rotulación se efectuó de dos maneras. Primero, se escribió el código en la parte externa de la funda utilizando un marcador permanente y luego, se anotó el código en un pedazo de papel de algodón utilizando un lápiz HB para luego colocar el papel dentro de la funda. Luego de cada colección, las fundas ziploc fueron ubicadas en un cooler portátil que contenía paquetes con hielo. El frío permitió que las accesiones se mantuvieran en buen estado durante todo el trayecto hasta llegar al laboratorio. Finalmente, las fundas ziploc que contenían las accesiones de capulí fueron almacenadas en una congeladora a -20°C dentro del laboratorio para su preservación a largo plazo.

7.2 Extracción, cuantificación y evaluación del DNA proveniente de las accesiones

Se extrajo DNA a partir de las hojas mediante un protocolo basado en el detergente CTAB (Kieleczawa, 2006) al cual se le incluyeron varias modificaciones. Por accesión, se cortaron pedazos pequeños de hoja los cuales fueron luego congelados con nitrógeno líquido y pulverizados con un pistilo en un mortero. Después, se añadió 800 μl de CTAB 2X y se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml rotulado. Posteriormente, se añadió 8 μl de 2, β -mercaptoetanol y se homogeneizó la muestra. Se incubó en una cama de arena a 62°C por una hora; se homogeneizó la muestra cada quince minutos invirtiendo el tubo un par de veces.

A continuación, se añadió 500 μl de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se homogeneizó nuevamente. Se dejó reposar a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13.200 rpm por veinte minutos. Este paso permitió

que la muestra se separe en fases: sobrenadante (contiene DNA), restos de cloroformo, y residuos de tejido vegetal junto con proteínas y otras macromoléculas. Después de la centrifugación, se trasladó 500 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf estéril con mucha precaución para no tocar las demás fases.

A continuación, se añadió un volumen equivalente de isopropanol frío y se homogeneizó la muestra suavemente. Luego, se centrifugó por cinco minutos a 5000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 800 μ l de etanol al 75% para lavar el pellet. Se agitó el tubo hasta que el pellet se despegara de la base del mismo. Posteriormente, el volumen de etanol colocado fue removido cuidadosamente con una micropipeta y se dejó secar el pellet dentro de una cámara de flujo. Finalmente, se resuspendió el pellet en 50 μ l de buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0) y se almacenó el DNA en una congeladora a -20°C.

Luego de la extracción, se determinó la concentración y calidad del DNA a través del espectrofotómetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) y geles de agarosa al 1% donde se visualizó el DNA utilizando SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y un Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD). Previo a la ejecución de los análisis moleculares, se realizaron diluciones a 100 y 20 ng/ μ l a partir de la muestra stock de DNA. Esta última dilución fue empleada durante los procesos de PCR con primers SSR.

7.3 Selección de Primers y amplificación de regiones microsatélite (SSR) mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El material genético de las accesiones recolectadas en las tres provincias fue analizado mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) con ocho primers (marcadores SSR) que amplifican regiones microsatélite (Tabla 1). Las secuencias de los primers provienen de estudios realizados por Downey e Iezzoni (2000), Testolin et al. (2000), Paireon et al. (2008) y Dirlewanger et al. (2002) en especies cercanamente relacionadas con *Prunus serotina* subsp. *capulí* como el durazno (*Prunus pérsica*), la cereza dulce (“sweet cherry”) (*Prunus avium* L.) y la cereza agria (“sour cherry”) (*Prunus cerasus* L.).

Los procedimientos de prueba para determinar la transferibilidad de estos primers fueron llevados a cabo durante la primera fase de la investigación denominada “Estudio preliminar de la diversidad genética del capulí en cinco provincias de la región andina del Ecuador” (Guadalupe, 2013). Durante esa fase, el proceso de selección de marcadores SSR se inició con doce primers los cuales fueron seleccionados por ser altamente polimórficos. Al final, cuatro de ellos fueron descartados ya que no se logró establecer un protocolo estandarizado para obtener una buena amplificación al emplearlos. Adicionalmente, se estableció una nomenclatura determinada para identificar a cada uno de los primers la cual fue mantenida durante este estudio: A, B, C, D, F, G, I, L (Tabla 1).

Se empleó el protocolo de PCR que fue estandarizado por Guadalupe (2013) incluyendo las mismas temperaturas de annealing específicas para cada par de primers SSR (Tabla 1). Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 10 µl y consistieron en 20-

40 ng/μl de DNA, Buffer PCR al 1X (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 0.5 mM de dNTP's y 0.2 mM de cada primer (F y R) (Downey e Iezzoni, 2000).

El programa de amplificación se efectuó en un termociclador marca Biometra T-Personal y consistió de una desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, annealing de entre 48-63°C (dependiendo del primer) por 1 minuto (ver Tabla 1), extensión de 45 segundos, y una extensión final de 8 minutos (Cipriani et al, 1999).

7.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata

La visualización de los productos de PCR se realizó empleando un protocolo ya estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito para la elaboración de geles de acrilamida al 6% con revelado basado en tinción con nitrato de plata (Benbouza et al., 2006).

Para este procedimiento, se empleó la cámara de electroforesis Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD) junto con la Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD). Primero, el vidrio posterior de la cámara fue tratado con etanol al 70%, 3 ml de Rain.X™ (marca) y 800 μl de Sigmacote® (SIGMA). Luego, el vidrio frontal de la cámara fue lavado tres veces con el detergente Alconox y tratado con 2 ml de una solución compuesta por 96% de alcohol absoluto, 0.5% de ácido acético glacial y 6 μl de Bind-Silane (3-Trimethoxysilyl-propyl-methacrylate 98%). Se emplearon Kimwipes (Kimberly-Clark) para limpiar y tratar ambos vidrios ya que este tipo de franela no deja pelusas sobre la superficie.

Los accesorios de la cámara fueron tratados con etanol al 70% y luego la cámara fue armada de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se inyectó a la cámara 100 ml de poliacrilamida (5M Urea y acrilamida/bisacrilamida 19:1, 545 µl de persulfato de amonio (J. T. Baker) al 10%, y 109 µl de UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethylenediamine) (Invitrogen)); el periodo de polimerización fue de aproximadamente una hora.

Luego de esta etapa, se llenó la cámara con 1.5 L de TBE 1X y se efectuó una fase de pre-corrída con un buffer de carga compuesto por glicerol/azul de bromofenol a 80 V. Se preparó el ladder para la corrida con 27.5 µl de agua ultra pura estéril, 2.5 µl de Blue Juice 10X (Invitrogen) y 5 µl de ladder 10bp (Invitrogen). Se añadió Blue Juice 10X (Invitrogen) a cada uno de los productos de PCR para una concentración final de 1X. El ladder 10 bp y los productos de PCR fueron desnaturalizadas a 96°C por 6 minutos en un T100 Thermal Cycler (BIORAD). Para la corrida, se cargó 5 µl del producto de PCR y 5 µl de ladder 10 bp; el tiempo y voltaje de corrida fueron de dos horas y media a 80V, respectivamente.

Al finalizar la corrida, se reveló el gel de poliacrilamida empleando un protocolo basado en el método propuesto por Benbouza et al. (2006) junto con ciertas modificaciones que se detallan a continuación. El gel fue sometido a una solución fijadora fría (200 ml de alcohol absoluto, 10 ml de ácido acético glacial y 1790 ml de agua destilada) por cinco minutos sin movimiento; una solución de tinción (4 gramos de nitrato de plata, 3 ml de formaldehído al 37% y 2 litros de agua destilada) por siete minutos con movimiento constante y obscuridad; una fase de lavado rápido de ocho segundos con agua destilada y obscuridad; una solución de revelado (30 gramos de hidróxido de sodio, 4 ml de formaldehído al 37%, y 2 litros de agua destilada) por tres minutos con leve movimiento y

obscuridad; una segunda fase con solución fijadora por tres minutos sin movimiento; y un segundo lavado rápido por veinte segundos con agua destilada. Finalmente, se dejó secar el gel a temperatura ambiente previo a su análisis. Los geles de poliacrilamida mostraron el ladder de DNA de 10 bp (rango de 10 a 300 pb-Invitrogen) y los productos de amplificación de las diferentes muestras.

7.5 Toma de datos y análisis estadísticos

Durante la toma de datos a partir de los geles, se realizó la identificación y codificación de los alelos respectivos para cada primer por accesión. Además, se registraron los datos de las distancias (en centímetros) presentes entre cada uno de los fragmentos de la escalera/productos de PCR y el frente de corrida de cada gel para luego poder estimar el tamaño aproximado en pares de bases de los alelos encontrados. Cabe mencionar que cada alelo fue visualizado como un fragmento de apariencia doble (hecho causado por la desnaturalización del DNA previo a su incorporación en el gel) (Figuras 2-10); sólo se tomaron en consideración aquellos alelos presentes dentro del rango de tamaño esperado que fue reportado por Guadalupe (2013). Adicionalmente, se utilizó el sistema de codificación de los alelos para cada uno de los primers SSR establecido durante la primera fase (Figuras 2-10) con el fin de documentar datos consistentes entre ambas etapas de la investigación; la distribución por primer de los 49 alelos encontrados se explica a detalle en la Tabla 1.

Los genotipos de cada accesión para los ocho primers fueron tabulados en matrices binarias donde la primera columna correspondió al código de las accesiones y la primera fila correspondió a la nomenclatura de los alelos de cada uno de los primers; se colocó el

digito 1 para indicar presencia del alelo y el digito 0 para indicar su ausencia. Durante los análisis estadísticos, primero se utilizaron tres matrices binarias con los datos de cada una de las provincias analizadas en este estudio. Luego, se empleó una matriz binaria que incluía los datos de las tres provincias. Finalmente, se empleó una matriz binaria con los datos de las ocho provincias estudiadas durante la primera y segunda fases de la investigación. En total, se procesaron los datos de ocho loci microsatélites provenientes de una muestra total de 217 accesiones de capulí.

Inicialmente, se utilizó el software NTSYS pc 2.11 (Rohlf, 2008) para elaborar dendrogramas utilizando una matriz de similitud y el método UPGMA (opción SAHN) con el propósito de determinar agrupamientos entre accesiones. Luego, se realizaron varios análisis de Bootstrap utilizando matrices de similitud junto con los programas estadísticos WINBOOT (Yap y Nelson, 1996) y “Dissimilarity Analysis and Representation for Windows” (DARwin 5.0.158) mediante la opción “Unweighted Neighbor Joining” (Perrier & Jacquemoud-Collet 2006) para evaluar el nivel de confiabilidad de los agrupamientos mostrados por los dendrogramas. A continuación, se empleó el software DARwin para realizar dos análisis de componentes principales (PCoA). Éstos fueron efectuados mediante matrices de disimilitud, el coeficiente DICE y la opción “Factorial Analysis” del programa. Finalmente, se utilizó el software ARLEQUIN (Schneider et al., 1997) para calcular el índice *Fst* y determinar las distancias genéticas presentes entre los conjuntos de accesiones de *P. serotina* subsp. *capulí* provenientes de las ocho provincias estudiadas.

8 RESULTADOS

8.1 Total de accesiones colectadas y muestras de DNA obtenidas

Se obtuvieron 33 accesiones de Pichincha, 25 accesiones de Cañar y 30 accesiones de Azuay para un total de 88 accesiones colectadas entre las tres provincias (Tabla 2, Figura 1 y Anexo 1). Posteriormente, se extrajo DNA a partir de estas accesiones. El protocolo de extracción fue efectivo; se obtuvieron muestras de DNA de alta concentración y calidad (Tabla 2).

8.2 Diversidad genética presente en las tres provincias del presente estudio y las ocho provincias estudiadas en las dos fases de esta investigación

Se utilizaron los ocho primers SSR (Simple Sequence Repeats) que mostraron amplificación satisfactoria en la primera fase de esta investigación (Guadalupe, 2013) (Tabla 1). En las 88 accesiones provenientes de las tres provincias analizadas, se encontraron los mismos 48 alelos que ya fueron reportados en la primera etapa más un alelo nuevo adicional para un total de 49 alelos registrados (Tabla 2). El nuevo alelo fue registrado en dos accesiones de la provincia de Pichincha denominadas PIC003 y PIC 006 (Tabla 1, Figura 2, y Anexo 1).

El nivel de polimorfismo de los primers osciló entre 4 y 10 alelos siendo el primer A, proveniente de *P. cerasus* L., el más informativo con 10 alelos y los primers B, F, e I, provenientes de *P. avium* L. y *P. persica* L. Batsch, los menos informativos con 4 alelos cada uno. El número de alelos por primer SSR se detalla en la Tabla 1. El promedio de

alelos para los 8 loci SSR fue de 6.125 alelos por locus. La descripción visual de los alelos correspondientes a cada primer está detallada en las Figuras 2-10.

El número total de alelos encontrados en cada una de las tres provincias de este estudio y entre ellas se detalla en la Tabla 2. Esta tabla también incluye el número total de alelos encontrados en cada una de las cinco provincias analizadas durante la primera fase de esta investigación y en total (Guadalupe, 2013). En las 217 accesiones analizadas durante las dos fases de esta investigación, el número total de alelos encontrados entre las ocho provincias en los 8 loci SSR se mantuvo en 49 (Tabla 2) y el promedio de alelos por locus fue el mismo calculado para las tres provincias. Así mismo, Pichincha fue la única provincia que presentó alelos únicos (Tabla 2). Finalmente, se comparó el nivel de polimorfismo para cada primer SSR encontrado en las dos fases de esta investigación con los valores reportados por investigaciones previas (Downey e Iezzoni, 2000; Testolin et al., 2000; Dirlewanger et al., 2002); esta información se detalla en la Tabla 3.

A continuación, se calculó valores del índice de distancia genética (F_{st}) utilizando los datos de los alelos encontrados por accesión en las tres provincias evaluadas en este estudio para estimar el grado de diferenciación genética entre ellas. El índice F_{st} entre Pichincha y Cañar fue de 0.218, entre Pichincha y Azuay fue de 0.081, y entre Cañar y Azuay fue de 0.053. Estas cifras y el resumen de los valores P de significancia obtenidos se muestran en la Tabla 4.

Así mismo, se calculó valores del índice de distancia genética (F_{st}) empleando los datos de los alelos encontrados por accesión en las ocho provincias estudiadas durante las dos fases de esta investigación para evaluar el grado de diferenciación genética entre ellas.

Los índices F_{st} entre la mayoría de las provincias oscilaron entre 0.037 y 0.250. Estas cifras y el resumen de los valores P de significancia obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Posteriormente, los datos de los alelos encontrados por accesión en las ocho provincias fueron agrupados en dos grupos tomando en consideración el patrón de distribución geográfica norte-sur de las provincias (Figura 1). El primer grupo contiene la información correspondiente a las cuatro provincias del Norte (Carchi, Imbabura, Pichincha, y Cotopaxi) y el segundo grupo contiene la información proveniente de las cuatro provincias del Sur (Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay). Después, se calcularon valores del índice de distancia genética (F_{st}) para estimar el grado de diferenciación genética entre ambas zonas. El índice F_{st} entre las provincias del Norte y las provincias del Sur fue de 0.040. Esta cifra y el valor P de significancia obtenido se muestran en la Tabla 6.

Finalmente, estos datos se agruparon en tres grupos: Zona Norte (provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, y Cotopaxi), Zona Central (provincias de Tungurahua y Chimborazo) y Zona Sur (provincias de Cañar y Azuay) (Figura 1) con el fin de calcular valores del índice F_{st} y determinar si existe diferenciación genética significativa entre estas tres zonas. El índice F_{st} entre la zona norte y la zona central fue de 0.055, entre la zona norte y la zona sur fue de 0.095, y entre la zona central y la zona sur fue de 0.133. Estas cifras y los valores P de significancia obtenidos se resumen en la Tabla 7. La conformación de los tres grupos fue definida en base a los resultados mostrados por el análisis de componentes principales (PCoA) que relaciona los datos de las ocho provincias. Éste será descrito en la sección 8.4 de este capítulo.

8.3 Análisis de agrupamientos de las accesiones de capulí de tres provincias: Pichincha, Azuay y Cañar

El dendrograma que contiene las accesiones de capulí de la provincia de Pichincha muestra 6 clusters (agrupamientos) junto con un coeficiente de similitud aproximado de 0.68 (Figura 11 y Tabla 8). En este caso, se observa que los individuos no se agrupan de acuerdo a sus localidades de origen (Anexo 1), sino que los clusters incluyen individuos que proceden tanto de Quito como de comunidades aledañas (por ejemplo, Cayambe y Tabacundo). La única excepción ocurre en el cluster No. 3 el cual sólo incluye a individuos provenientes de la ciudad de Quito.

Por otro lado, el dendrograma que incluye las accesiones de capulí de la provincia de Cañar muestra 4 clusters y un coeficiente de similitud aproximado de 0.696 (Figura 12 y Tabla 8). El patrón de formación de clusters es similar al observado en Pichincha; cada cluster incluye individuos provenientes de más de una localidad como Azogues (ciudad) y Biblián (comunidad rural) (Anexo 1). La única excepción se presenta en el cluster No. 1 donde se agrupan sólo accesiones colectadas en la ciudad de Azogues.

Finalmente, el dendrograma que incluye las accesiones de capulí de la provincia de Azuay muestra 11 clusters y un coeficiente de similitud aproximado de 0.75 (Figura 13 y Tabla 8). La disposición de los agrupamientos es similar a la observada en las otras dos provincias; los clusters incluyen accesiones provenientes de varias localidades como Cuenca (ciudad) y Gualaceo (comunidad rural) (Anexo 1). Las excepciones se presentan en los clusters No. 6, 10 y 11 formados por una sola accesión.

El dendrograma que relaciona los datos provenientes de Pichincha, Cañar y Azuay muestra 11 clusters y un coeficiente de similitud aproximado de 0.694 (Figura 14, Tablas 8

y 9). Se repite la tendencia de conformación de clusters que ya fue observada anteriormente; los individuos no son agrupados de acuerdo a su provincia de origen, sino que los clusters incluyen individuos procedentes de más de una provincia. Las únicas excepciones están presentes en los clusters No. 1 y 2 que están conformados por individuos que pertenecen sólo a la provincia de Pichincha. Además, en los clusters No. 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11 predominan individuos que pertenecen a una sola provincia como Pichincha o a dos provincias geográficamente cercanas como Azuay y Cañar.

Así mismo, se realizaron análisis de bootstrap para verificar la confiabilidad de los agrupamientos mostrados por cada uno de los dendrogramas anteriormente descritos. Se considera que un agrupamiento es confiable si presenta un valor de bootstrap igual o mayor al 70% (Hillis & Bull, 1993 citado por Baldauf, 2003). Los valores de bootstrap se resumen en la Tabla 11. Para el dendrograma de la provincia de Pichincha (Figura 11), la mayoría de agrupamientos mostraron valores de bootstrap menores al 70%. Sin embargo, un agrupamiento obtuvo un valor superior a este parámetro. Este fue el cluster formado por las accesiones PIC003 y PIC006 provenientes del Norte de Quito (Anexo 1) con un valor de 75.8. Para el dendrograma de la provincia de Cañar (Figura 12), la mayoría de agrupamientos mostraron valores de bootstrap menores al 70% a excepción de un agrupamiento que obtuvo un valor muy cercano a este parámetro. Este fue el cluster formado por las accesiones CAN016 y CAN018 provenientes de la localidad de Ingapirca (Anexo 1) con un valor de 68.0. Para el dendrograma de la provincia de Azuay (Figura 13), todos los agrupamientos mostraron valores de bootstrap menores al 70%; ninguno de los valores fue cercano a este parámetro. Finalmente, para el dendrograma que incluye los datos de las tres provincias (Figura 14), la mayoría de los agrupamientos mostraron valores

de bootstrap inferiores al 70% a excepción de dos agrupamientos. Estos fueron el cluster formado por las accesiones PIC003 y PIC006 que obtuvo un valor superior al parámetro (77.3) y el cluster formado por las accesiones CAN016 y CAN018 que obtuvo un valor cercano al parámetro (61.4). Estos agrupamientos fueron los mismos que recibieron valores de bootstrap superiores al 70% durante el análisis por provincia.

En el análisis de componentes principales (PCoA) que incluye los datos de las tres provincias estudiadas (Figura 15), se observa que en los cuadrantes superior e inferior derechos del gráfico predominan los individuos provenientes de Pichincha, mientras que en los cuadrantes superior e inferior izquierdos prevalecen los individuos procedentes de Azuay y Cañar.

8.4 Análisis de agrupamientos para las accesiones de capulí de ocho provincias del Ecuador: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay

El dendrograma que relaciona los datos provenientes de las ocho provincias muestra 11 clusters y un coeficiente de similitud aproximado de 0.654 (Figura 16, Tablas 8 y 10). El patrón de formación de los clusters repite la tendencia observada en los dendrogramas de la sección 8.3. Los individuos no se agrupan por localidad de origen sino que los clusters incluyen individuos provenientes de dos o más provincias. Las excepciones se presentan en tres clusters (8, 10, y 11) ya que están formados por un solo individuo de una provincia. Además, en los clusters 4 y 7, predominan individuos provenientes de una sola provincia: Imbabura y Pichincha, respectivamente. En ciertos clusters, existe una alta concentración de individuos provenientes de dos provincias geográficamente cercanas (Figura 1). Por

ejemplo, en el cluster No. 2 predominan los individuos de Tungurahua y Chimborazo, mientras que en el cluster No. 3 predominan los individuos de Cañar y Azuay.

Nuevamente, se realizó un análisis de bootstrap para verificar la confiabilidad de los agrupamientos mostrados por el dendrograma de las ocho provincias (Figura 16). Los valores de bootstrap se resumen en la Tabla 11. Se observa que sólo dos agrupamientos del dendrograma son confiables ya que poseen valores iguales o superiores al parámetro de 70%. Uno es el cluster formado por las accesiones IMB 012 e IMB 014 provenientes de la localidad de San Pablo (Guadalupe, 2013) con un valor de 70. El otro es el cluster formado por las accesiones IMB 004 e IMB 005 provenientes de la localidad de Huyco-Pungo (Guadalupe, 2013) con un valor de 79.

En el análisis de componentes principales (PCoA) que incluye los datos de las ocho provincias estudiadas (Figura 17), se observa que en el cuadrante inferior derecho predominan individuos de las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Cotopaxi; en los cuadrantes superior derecho e izquierdo predominan individuos de las provincias de Tungurahua y Chimborazo; y en el cuadrante inferior izquierdo predominan individuos de las provincias de Cañar y Azuay.

9 DISCUSIÓN

9.1 Amplificación con 8 primers SSR heterólogos

Se emplearon los ocho primers SSR heterólogos que mostraron amplificación exitosa durante la primera fase de esta investigación (Guadalupe, 2013) (Tabla 1). Se constató la alta eficiencia de amplificación de regiones microsátélites en *Prunus serotina* subsp. *capulí* al utilizar estos primers provenientes de especies genéticamente emparentadas con el capulí. Además, todos los primers SSR mostraron productos de PCR polimórficos durante el análisis molecular de las 88 accesiones colectadas. Esto concuerda con los resultados emitidos por dos estudios moleculares que evaluaron el nivel de transferibilidad de este tipo de primers en *P. serotina* (Downey e Iezzoni, 2000; Pairon et al., 2008). Así mismo, se comprobó la confiabilidad del protocolo estandarizado para PCR y los parámetros de annealing para cada primer establecidos por la primera fase de esta investigación (Guadalupe, 2013).

9.2 Análisis de la diversidad genética presente en las tres provincias estudiadas:

Pichincha, Azuay y Cañar

El número de accesiones colectadas para cada una de las tres provincias osciló entre 25 y 33. Entre las tres provincias, se encontraron un total de 49 alelos. Esto incluye los mismos 48 alelos que fueron registrados durante la primera fase de esta investigación; sólo se registró un alelo adicional (Guadalupe, 2013) (Tabla 2). Sin embargo, sólo Azuay y Pichincha presentaron todos los alelos; uno de los alelos estuvo ausente en Cañar; y el único alelo nuevo que se documentó sólo estuvo presente en Pichincha.

Downey e Iezzoni (2000) evaluaron la diversidad genética presente en 66 accesiones de *P. serotina* provenientes de Michigan, México, y Ecuador y emplearon 4 de los 8 primers SSR utilizados en este estudio (A, B, C, D) (Tabla 1). Al comparar el número de alelos que se obtuvieron por primer durante esa investigación y los registrados en este estudio (Tabla 3), se observa que el presente estudio detecta un número de alelos por primer es que considerablemente menor al reportado en la investigación anterior. El número total de alelos reportados por la investigación anterior en 4 loci SSR y 66 accesiones fue de 51 mientras que el estudio actual que empleo 8 loci SSR y 88 accesiones solo reporta 49 alelos. A pesar de que el tamaño de muestra y número de loci analizados fueron superiores en este estudio, el número total de alelos encontrados es inferior al documentado por Downey e Iezzoni (2000). Es preciso mencionar que el 85% de las accesiones analizadas en la investigación anterior eran originarias de Michigan y México por lo que se podría deducir que el alto grado de diversidad alélica registrado es reflejo directo del estado del pool genético de esta especie en estos dos sitios.

Testolin et al. (2000) y Dirlewanger et al. (2002) llevaron a cabo estudios moleculares en *P. persica* y *P. avium* L. que incluyeron los otros 4 primers SSR utilizados en este estudio (F, G, I, L) (Tabla 1). Al comparar el número de alelos obtenidos en esas investigaciones previas y los registrados en este estudio (Tabla 3), se observa que para 2 de los 4 primers, el estudio actual detecta un número de alelos por primer que es inferior al reportado por ambas investigaciones anteriores. Finalmente, a pesar de que este estudio empleó un alto número de accesiones y un número razonable de primers SSR altamente polimórficos, el número total de alelos encontrados para la mayoría de loci estudiados fue

bajo lo cual podría dar indicios claros de que el pool genético de la especie entre estas tres provincias posee una variabilidad genética inferior a la reportada para otras localidades.

Los patrones de agrupamiento de individuos y coeficientes de similitud mostrados por los dendrogramas que analizan a cada una de las tres provincias por separado (Figuras 11-13 y Tabla 8) indican que existe alta similitud genética entre accesiones provenientes de diferentes localidades (urbanas y rurales) dentro de cada una de las provincias.

Una hipótesis que puede explicar este hecho es la movilización de individuos por semillas provenientes de zonas rurales al perímetro urbano mediante el comercio local de frutos de capulí. Los pocos registros bibliográficos disponibles señalan que el capulí es una especie altamente valorada entre los pobladores indígenas de la sierra ecuatoriana, sobre todo por su fruto (Popenoe & Pachano, 1922; Mille, 1942; Diario el Comercio, 2012). Este hecho fue confirmado durante el desarrollo de la fase de campo de este estudio. La maduración del fruto del capulí sucede durante los primeros meses del año. Por ejemplo, durante esta época, familias indígenas ubicadas en zonas rurales de la provincia de Tungurahua cosechan los frutos de la especie a partir de árboles dispersos en el área o en aquellos que forman parte de sus terrenos y parcelas. Posteriormente, los frutos colectados son trasladados a mercados como los de Ambato, Cevallos y Pelileo para su comercialización. Los ingresos obtenidos por la venta del fruto de capulí otorgan un medio de sustento económico para las familias que distribuyen este producto (Popenoe & Pachano, 1922; Diario El Comercio, 2012; Downey e Iezzoni, 2000; J. Tobar, comunicación personal, 22 Abril 2013). Finalmente, la población urbana consume el fruto de capulí luego de lo cual muchas semillas son arrojadas y dispersadas en terrenos abiertos

donde pueden germinar y desarrollarse hasta su etapa adulta (J. Tobar, comunicación personal, 22 Abril 2013).

Este patrón de movilización de frutos de capulí entre el campo y la ciudad que es común en Tungurahua también podría existir en las provincias de Cañar y Azuay ya que ambas son parte del conjunto de provincias donde esta especie es abundante. Por ende, el comercio de sus frutos se vuelve más propicio (Mille, 1942; Diario El Comercio, 2012). Ya que el capulí no es tan abundante en Pichincha, es probable que la migración de individuos hacia la ciudad sea sólo producto de la acción humana ya sea de forma no intencional (dispersión de semillas luego de ingerir el fruto) o intencional (siembra de individuos en las casas mediante semillas traídas del campo por factores culturales). Se requieren datos actualizados acerca de la producción y comercialización del capulí dentro de las tres provincias con el fin de corroborar esta teoría. De todas formas, estos procesos continuos de migración de individuos de la zona rural a las ciudades pudieron haber propiciado la homogenización del pool genético de la especie dentro de cada una de las tres provincias estudiadas (Klug et al., 2006). El efecto homogenizador de los procesos migratorios en la diversidad genética de las poblaciones de dos especies vegetales se describe en los estudios realizados por McCue & Holtsford (1998) y Morrell et al. (2003). Esto explicaría la baja distancia genética entre individuos originarios de localidades geográficamente separadas dentro de una misma provincia.

En el dendrograma que relaciona los individuos provenientes de las tres provincias (Figura 14 y Tabla 9), se observa que la mayoría de agrupamientos no están relacionados con la provincia de origen de los individuos. Esta tendencia también ha sido observada en estudios moleculares realizados en otras especies del género *Prunus* como *P. mume*

(conocido como el albaricoque Japonés o la ciruela china), *P. armeniaca* (el albaricoque) y *P. davidiana* (Gao et al., 2004; Zhebentyayeva et al., 2003; Cheng et al., 2011).

Con respecto a los análisis de bootstrap, uno de los múltiples parámetros propuestos para determinar si un agrupamiento es confiable es que presente valores iguales o mayores al 70% (Hillis & Bull, 1993 citado por Baldauf, 2003). Se constató que el patrón de agrupamiento mostrado por los tres dendrogramas no es confiable ya que sólo dos agrupamientos cumplen o se aproximan al parámetro descrito anteriormente (Tabla 11). Los individuos que conforman ambos clusters pertenecen a las mismas localidades; por lo tanto, es muy probable que estén emparentados entre sí. En este caso, la inclusión de otros primers SSR para analizar más loci dentro del genoma de la especie podría contribuir a incrementar los valores de confiabilidad de los agrupamientos mostrados; este hecho fue sustentado por un estudio realizado por Koskinen et al. (2004). La revisión bibliográfica previa llevada a cabo por los autores de ese estudio encontró que la mayoría de investigaciones sólo emplea un promedio de 6 marcadores SSR. Mediante simulaciones realizadas utilizando datos moleculares provenientes de loci microsatélites de individuos de la especie *Thymallus thymallus* (Fam. Salmonidae), se demostró que el uso de un moderado (mayor a 6) o alto número de marcadores SSR (muy superior a 6 y cercano a 30 siendo este el estándar promedio sugerido por los análisis computacionales) permite obtener dendrogramas con un mayor número de agrupamientos que obtienen altos valores de bootstrap.

De todas formas, la composición de los agrupamientos mostrados por el dendrograma de las tres provincias brinda indicios de que existe un cierto grado de diferenciación genética entre Pichincha que se localiza al norte y Cañar junto con Azuay

que se ubican al sur de la sierra ecuatoriana (Figura 1). La existencia de esta tendencia es apoyada por el análisis de componentes principales (PCoA) (Figura 15). En el gráfico, se observa que en los cuadrantes superior e inferior derechos del gráfico predominan los individuos correspondientes a Pichincha, mientras que en los cuadrantes superior e inferior izquierdos prevalecen los individuos procedentes de Azuay y Cañar.

Esta tendencia se confirma con los valores del índice F_{st} (Tabla 4) que miden la magnitud de la diferenciación genética. Los parámetros propuestos por Wright (1978) y Hartl & Clark (1997) (ambos citados por Balloux & Lugon-Moulin, 2002) para la interpretación de los resultados describen que valores incluidos dentro del rango entre 0 y 0.05 indican baja diferenciación genética; valores presentes dentro del rango entre 0.05 y 0.15 indican moderada diferenciación genética; valores entre 0.15 y 0.25 indican alta diferenciación genética; y valores superiores a 0.25 indican diferenciación genética muy alta. Se deduce que no existe un nivel significativo de distancia genética entre Cañar y Azuay. Sin embargo, existe un alto nivel de diferenciación genética entre Pichincha y Cañar junto con un moderado nivel de diferenciación genética entre Pichincha y Azuay. Los valores del índice F_{st} muestran que el coeficiente de similitud UPGMA mostrado por el dendrograma de tres provincias (Figura 14 y Tabla 8), el cual indica alta similitud genética entre ellas, no es preciso ya que el bajo grado de distancia genética no es constante entre las distintas parejas de provincias.

La presencia de distancia geográfica ha permitido que exista un grado moderado-alto de diferenciación genética entre Pichincha que se localiza al norte y el conjunto de provincias formado por Cañar y Azuay que se encuentran al sur del callejón interandino. En contraste, la estrecha cercanía geográfica ha permitido que exista una alta similitud genética

entre Cañar y Azuay (Figura 1). Este patrón que relaciona al factor geográfico con el nivel de diferenciación genética es explicado por la teoría del Aislamiento por Distancia (“Isolation by Distance”) (Wright, 1943) y el modelo de “Camino de Piedras” (Stepping-Stone Model) (Kimura & Weiss, 1964). Esta tendencia ha sido observada en estudios moleculares realizados en varias especies vegetales como *Rhodiola dumulosa* que es una especie nativa de China en el continente asiático (Hou & Lou, 2011) y *Ullucus tuberosus* que es una especie andina y nativa del continente americano (Malice et al., 2009).

El moderado nivel de distancia genética encontrado entre Pichincha y Azuay puede estar relacionado con el hecho de que Azuay es conocida como una de las zonas de alta producción de los frutos de capulí (Diario El Comercio, 2012; Mille, 1942). Por ello, es posible que exista un permanente ingreso de frutos provenientes de Azuay en Pichincha como resultado del comercio regional de este producto agrícola lo cual se traduce en una alta tasa de migración de individuos entre ambas provincias. (Klug et al., 2006; Popenoe & Pachano, 1922; Diario El Comercio, 2012; Downey e Iezzoni, 2000). Estos procesos migratorios continuos propiciarían la interacción de dos zonas geográficamente distantes y la presencia de un cierto grado de homogenización de sus pools genéticos. Como consecuencia, el grado de distancia genética entre las provincias se reduce (Levin, 1988). Por otro lado, a pesar de que Cañar también es uno de los sitios claves de producción de los frutos de capulí (Diario El Comercio, 2012), el alto nivel de distancia genética entre Pichincha y Cañar podría ser explicado por un comercio escaso o restringido de frutos de capulí. Por ende, la tasa de migración de individuos de Cañar a Pichincha podría ser mínima lo cual propiciaría la ausencia de interacción entre los pools genéticos de ambas provincias. Por lo tanto, la diferenciación genética entre ellas se mantiene. Se requieren

datos económicos actualizados sobre el comercio de capulí en la región interandina para corroborar la validez de las tendencias de migración recientemente descritas.

9.3 Análisis global de la diversidad genética presente en las ocho provincias estudiadas durante las dos fases de esta investigación: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay

El número de accesiones colectadas para cada una de las ocho provincias osciló entre 12 y 38 (Tabla 2). Las diferencias en el número de accesiones analizadas por provincia pudieron haber afectado el nivel de confiabilidad de los resultados obtenidos ya que el pool genético de algunas provincias estuvo mejor representado en comparación a las demás. La provincia con el menor número de accesiones fue Carchi (12), mientras que la provincia con el mayor número de accesiones fue Tungurahua (38).

Además, se pudo constatar que a pesar de que se incrementó el tamaño de muestra en contraste con la primera fase de la investigación (primera fase = 129 accesiones, segunda fase = 88 accesiones, y total dos fases = 217 accesiones), el número total de alelos registrados (primera fase = 48 y segunda fase = 49) y el promedio de alelos por locus (primera fase = 6 y segunda fase = 6.125) entre ambas fases variaron mínimamente (Tabla 2) (Guadalupe, 2013). Así mismo, Carchi presentó cinco alelos menos con respecto al número total de alelos encontrados en ambas fases de esta investigación (49), mientras que las demás provincias obtuvieron un número de alelos muy cercano o igual a ese total que osciló entre 46 y 49 alelos (Tabla 2). El análisis de un tamaño de muestra más grande no influyó significativamente en el número total de alelos encontrados en los ocho loci estudiados. Es preciso incorporar más marcadores SSR que permitan analizar otros loci

microsatélites del genoma del capulí para obtener una visión más completa de la variabilidad genética de la especie. Finalmente, el número total de alelos registrados por primer SSR durante las dos fases de esta investigación fue considerablemente menor al reportado por estudios moleculares previos (Tabla 3) (Downey e Iezzoni, 2000; Testolin et al., 2000; Dirlewanger et al, 2002).

El dendrograma que relaciona los individuos provenientes de las ocho provincias estudiadas (Figura 16 y Tabla 10) muestra que éstos no se agrupan en base a su provincia de origen. Esta tendencia ya ha sido observada en estudios moleculares de diversidad genética realizados en otras especies del género *Prunus* (Gao et al., 2004; Zhebentyayeva et al., 2003; Cheng et al., 2011). Adicionalmente, los valores del análisis de bootstrap para este dendrograma (Tabla 11) indican que solo dos clusters son confiables ya que presentan valores iguales o superior al parámetro de 70% establecido por Hillis & Bull (1993) (citado por Baldauf, 2003). Cada cluster está formado por dos accesiones provenientes de la misma localidad por lo que es altamente probable que los miembros de ambas parejas de individuos estén emparentados entre sí. En este caso, el empleo de más de 8 marcadores microsatélites permitiría obtener dendrogramas que muestren clusters con valores altos de confiabilidad (Koskinen et al., 2004).

Por otro lado, el patrón de formación de los agrupamientos mostrados por el dendrograma brinda indicios de que la variabilidad genética se distribuye en base a sectores geográficos determinados dentro del callejón interandino. El análisis de coordenadas principales (PCoA) apoya esta tendencia (Figura 17). En el cuadrante inferior derecho del gráfico predominan individuos de las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, y Cotopaxi que ocupan la zona norte. En los cuadrantes superior derecho e izquierdo

predominan individuos de las provincias de Tungurahua y Chimborazo que ocupan la zona central; y en el cuadrante inferior izquierdo predominan individuos de las provincias de Cañar y Azuay que ocupan la zona sur del callejón interandino. Los valores del índice F_{st} confirman esta tendencia (Tabla 5). Al interpretar estos valores empleando los parámetros propuestos por Wright (1978) y Hartl & Clark (1997) (citados por Balloux & Lugon-Moulin, 2002), se observa que no existe distancia genética significativa entre las provincias de Carchi e Imbabura y entre Cañar y Azuay. A esto se suma el hecho de que la distancia genética entre Chimborazo y Tungurahua es baja. Por otro lado, valores moderados de diferenciación genética estuvieron presentes entre las provincias de Tungurahua, Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, y Azuay. Este mismo patrón se repite entre Chimborazo y las otras cinco provincias antes mencionadas. Los valores más altos de distancia genética se presentaron entre Cañar y el resto de provincias excepto Azuay y entre Pichincha y Cotopaxi. Adicionalmente, al agrupar a las ocho provincias en dos conjuntos (provincias del norte y provincias del sur) (Tabla 6), los valores F_{st} muestran que existe un bajo nivel de diferenciación genética entre ambas regiones. En contraste, al agrupar a las ocho provincias en tres conjuntos (provincias del norte, centro, y sur) (Tabla 7), los valores F_{st} señalan que existe un nivel moderado de diferenciación entre estas tres zonas.

En base a los resultados obtenidos mediante las pruebas estadísticas y los escasos datos bibliográficos disponibles, se propone el siguiente modelo que trata de reconstruir la historia de *P. serotina* subsp. *capulí* en la sierra ecuatoriana.

Después de la conquista española, la especie ingresa a nuestro país. Se deduce que los primeros individuos que llegaron a territorio ecuatoriano contenían una riqueza alélica menor a la del pool génico parental que pudo haber sido originario de México (Downey e

Iezzoni, 2000; Mille, 1942). Los principales asentamientos de capulí pudieron haberse producido en las provincias centrales como Tungurahua. Según Popenoe & Pachano (1922), la ciudad de Ambato en la provincia de Tungurahua era considerada como era un centro importante de producción y de diversidad de la especie. La especie ganó popularidad entre las poblaciones indígenas las cuales incorporaron los frutos de capulí a su dieta y utilizaron a los individuos como “cortina-rompe vientos” en sus campos (Popenoe & Pachano, 1922; Palacios, 2011).

Posteriormente y hasta la actualidad, los frutos de capulí son cosechados por familias y campesinos indígenas y comercializados en mercados de la sierra ecuatoriana (Diario El Comercio, 2012). Esto promueve el transporte de frutos y la dispersión de semillas entre varias provincias. Como consecuencia, existe migración de individuos de capulí entre ellas. Los procesos migratorios pueden promover la homogenización del pool genético contenido entre dos o más provincias lo cual reduce el nivel de diferenciación genética entre ellas (Klug et al., 2006; Levin, 1988; McCue & Holtsford, 1998; Morrell et al., 2003). Por ende, la magnitud de la distancia genética entre provincias varía de acuerdo a la tasa de migración de los individuos por semillas mediante el comercio regional de frutos. La ubicación geográfica de cada una de las provincias también influye en el grado de diferenciación genética presente entre ellas (Wright, 1943; Kimura & Weiss, 1964; Hou & Lou, 2011; Malice et al., 2009).

Los índices *F_{st}* permiten deducir patrones de migración de los individuos para comprender como ha sido la dinámica de distribución y comercialización de los frutos de capulí en la región interandina. Las provincias de Tungurahua y Chimborazo podrían ser consideradas como “núcleos de producción y distribución del capulí” a nivel regional

(Popenoe & Pachano, 1922). Éstas distribuyen o intercambian frutos de capulí mediante el comercio con provincias como Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, y Azuay. Cañar no distribuye frutos de capulí a la mayoría de provincias de la región y el transporte de frutos entre Pichincha y Cotopaxi es reducido o nulo. Finalmente, la baja o nula distancia genética entre Carchi e Imbabura, Tungurahua y Chimborazo, y Cañar con Azuay puede ser explicada por la estrecha cercanía geográfica entre cada par de provincias. Esto permite que la distribución de frutos de capulí entre ellas sea constante. Otra explicación es que cada pareja de provincias comparte un origen común desde el arribo de la especie al país lo que brindaría indicios de que existieron no uno sino tres asentamientos distintos de capulí en el norte, centro, y sur de la sierra ecuatoriana. Este hecho ha sido observado en otras especies del género *Prunus* como *P. armeniaca* L. (el albaricoque) y *P. avium* L. (el cerezo dulce) donde individuos que eran descendientes de cultivares establecidos en una zona determinada del planeta (e.g. al norte de un continente) y que compartían un origen geográfico común, han mostrado estrecha similitud genética y se han agrupado juntos (Maghuly et al., 2005; Romero et al., 2003; Wunsch & Hormaza, 2002).

Eventualmente, la variabilidad genética contenida en los asentamientos se dispersó de forma diferencial a lo largo y ancho de la región interandina a través de la migración de semillas por el comercio de frutos.

Finalmente, un estudio de diversidad genética sobre el cultivo andino denominado Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) encontró el mismo patrón de distribución de la variabilidad genética Norte-Centro-Sur en Perú. La forma cultivada de esta especie también es alotetraploide (Pissard et al., 2008).

Se evidencia la falta de información bibliográfica detallada y actualizada acerca de los eventos que han formado parte de la historia del capulí en nuestro país desde su llegada al territorio nacional hasta nuestros días. Esta limitación impide corroborar las hipótesis propuestas en este capítulo. La inclusión de datos tomados de estudios antropológicos que relacionen a la presencia de la especie con la vida de grupos humanos andinos a lo largo del tiempo y de estudios económicos que incorporen cifras que reflejen los patrones que han conducido la comercialización a nivel local y regional de los frutos de la especie desde épocas ancestrales hasta la actualidad permitirán establecer un panorama más certero acerca de la evolución y estado actual de pool genético del capulí en la región interandina del Ecuador.

Uno de los inconvenientes que se presentó al realizar los análisis estadísticos que forman parte de esta investigación fue la imposibilidad de procesar la información alélica proveniente de las accesiones recolectadas siguiendo un modelo tetraploide el cual corresponde a la genética de esta especie. El análisis de los productos de PCR derivados de cada uno de los primers SSR mediante geles de poliacrilamida con tinción de plata no permite obtener datos moleculares certeros a partir de accesiones que para uno o varios loci posean genotipos formados por una combinación de tres alelos distintos ya que es imposible descifrar cuál de ellos está presente en homocigosis (Markwith et al., 2006 citado por Pairon et al., 2008). Por ende, no es posible calcular frecuencias alélicas que son esenciales para realizar las pruebas de genética de poblaciones usualmente empleadas como el índice de heterocigosidad de Nei o los valores PIC que contribuyen a evaluar de forma más precisa la diversidad genética de una especie. Actualmente, si existen aplicaciones computacionales que reconocen datos provenientes de especies poliploides. Sin embargo,

su manejo y la introducción de datos son complejos. Por ello, los datos provenientes de ambas fases de esta investigación fueron analizados utilizando el programa estadístico ARLEQUIN 1.1 (Schneider et al., 1997) mediante el cual solo se pudo procesar la información alélica de forma diploide y siguiendo el modelo establecido para marcadores RFLPs. Este mecanismo no es el más apropiado pero se obtuvieron valores para el índice *Fst* que fueron satisfactoriamente respaldados por los resultados emitidos por los otros dos programas estadísticos utilizados: NTsys y DARwin (Rohlf, 2008; Perrier & Jacquemoud-Collet 2006). Finalmente, se intentó evaluar los datos moleculares registrados durante esta investigación por medio del software STRUCTURE. A pesar de las múltiples simulaciones ejecutadas con este programa, no fue posible obtener gráficos coherentes con los resultados que arrojaron los otros tres programas estadísticos recientemente mencionados.

10 CONCLUSIONES

Este estudio constituye la segunda fase de una investigación que evalúa la diversidad genética de *Prunus serotina* subsp. *capulí* en la región interandina del Ecuador y contribuye a ampliar los pocos conocimientos actualmente existentes acerca de esta especie.

Se comprobó la eficiencia de amplificación de regiones microsatélites en *Prunus serotina* subsp. *capulí* empleando primers SSR provenientes de especies cercanamente relacionadas con esta especie.

El análisis molecular de 88 accesiones provenientes de Pichincha, Cañar, y Azuay concluye que existe una alta similitud genética entre individuos dentro de cada provincia. Esto se explica por la homogenización del pool genético debido a la migración de individuos por semillas de la especie desde zonas rurales a las ciudades a través del comercio local de frutos de capulí.

Así mismo, existe un bajo grado de variabilidad genética interprovincial junto con un moderado-alto grado de diferenciación genética norte-sur. La presencia de distancia genética está relacionada con el factor geográfico mientras que la magnitud de la variable depende de la tasa de migración de individuos entre provincias mediante el comercio regional de frutos de capulí.

El análisis molecular de 217 accesiones provenientes de las ocho provincias de la sierra ecuatoriana estudiadas durante las dos fases de esta investigación (Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, y Azuay) concluye que existe una reducida variabilidad genética a lo largo del callejón interandino, un nivel moderado de diferenciación genética entre provincias, y un patrón de distribución de la diversidad

genética norte-centro-sur. Factores como la migración permanente de individuos a lo largo de la región a través del comercio, distancia geográfica, y la posibilidad de tres asentamientos de capulí durante la llegada de la especie al Ecuador permiten sustentar los resultados obtenidos.

Se necesita aumentar el número de loci SSR analizados con el fin de obtener dendrogramas con un mayor número de agrupamientos confiables y evaluar el nivel de polimorfismo presente en otros sectores del genoma de la especie.

Finalmente, se requieren fuentes de información antropológica y económica relacionadas con el cultivo de esta especie en el Ecuador que permitan corroborar las hipótesis y teorías propuestas.

11 RECOMENDACIONES

- Incorporar otros marcadores moleculares de tipo microsatélite (SSRs) al estudio con el fin de aumentar el número total de loci explorados y obtener resultados más precisos acerca de la diversidad genética de la especie.
- Utilizar programas estadísticos que permitan analizar datos provenientes de especies poliploides lo cual evitará la necesidad de realizar procesos adicionales de transformación de la información que inducen a que esta pierda su riqueza.
- Ejecutar proyectos que permitan recopilar datos antropológicos y económicos relacionados con el comercio y consumo de esta especie en la región interandina del Ecuador con el fin de incrementar los conocimientos existentes acerca de los procesos de domesticación, comercio y distribución del capulí en el país.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Aranzana, M. J., García-Mas, J., Carbo, J., & Arus, P. (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding*, *121*, 87-92.
- Aranzana, M. J., Carbo, J., & Arus, P. (2003). Microsatellite variability in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch): cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theor Appl Genet*, *106*, 1341-1352.
- Auclair, A., & Cottam, G. (1971). Dynamics of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) in Southern Wisconsin oak forests. *Ecological Monographs*, *41*(2), 153-177.
- Baldauf, S.L. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics*, *19*(6), 345-351.
- Balloux, F., & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, *11*, 155-165.
- Benbouza, H., Jacquemin, J-M., Baudoin, J-P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap, and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, (2), 77-81.
- Budak, H., Bolek, Y., Dokuyucu, T., & Akkaya, A. (2004). Potential uses of molecular markers in crop improvement. *KSU Journal of Science and Engineering*, *7*(1), 75-79.
- Cheng, Z., Gasic, K., Wang, Z., & Chen, X. (2011). Genetic diversity and genetic structure in natural populations of *Prunus davidiana* germplasm by SSR markers. *Journal of Agricultural Science*, *3*(4), 114-125.
- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.-G., Marrazzo, M. T., Peterlunger, E., & Testolin, R. (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet*, *99*, 65-72.
- Comai, L. (2000). Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology*, *43*, 387-399.
- Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la biodiversidad (CONABIO). (2012). *Prunus serotina*. Gobierno de la Republica de México. Obtenido el 24 de febrero 2013 de: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf>.

- De Vienne, Dominique, (Ed.). (2003). *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Enfield, New Hampshire, USA: Science Publishers, Inc.
- Deckers, B., Verheyen, K., Hermy, M., & Muys, B. (2005). Effects of landscape structure on the invasive spread of black cherry *Prunus serotina* in an agricultural landscape in Flanders, Belgium. *Ecography*, 28(1), 99-109.
- Diario El Comercio. (2012). El capulí es un fruto andino que se desarrolla y degusta en la serranía. Cuaderno 2: 15.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P., & Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theor Appl Genet*, 105, 127-138.
- Downey, S. L. & Iezzoni, A. F. (2000). Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach, and sour cherry. *J Amer Soc. Hort. Sci*, 125(1), 76-80.
- Fresnedo-Ramírez, J., Segura, S., & Muratalla-Lua, A. (2011). Morphovariability of capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) in the central-western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. *Genet Resour Crop Evol*, 58, 481–495.
- Gao, Z-H., Shen, Z-J., Han, Z-H., Fang, J-G., Zhang, Y-M., & Zhang, Z. (2004). Microsatellite markers and genetic diversity in Japanese Apricot (*Prunus mume*). *HortScience*, 39(7), 1571-1574.
- Guadalupe, J. (2013). Estudio preliminar de la diversidad genética del capulí en cinco provincias de la región andina del Ecuador. Tesis de Pregrado, Universidad San Francisco de Quito.
- Hayden, M.J., & Sharp, P.J. (2001). Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Research*, 29(8), e44.
- He, G., Meng, R., Newman, M., Gao, G., Pittman, R., & Prakash, CS. (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biology*, 3(3).
- Hormaza, J. I. (2002). Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *Theor Appl Genet*, 104, 321-328.
- Hou, Y., & Lou, A. (2011). Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). *PLoS ONE*, 6, e24497.

- Ijaz, S. (2011). Microsatellite markers: an important fingerprinting tool for characterization of crop plants. *African Journal of Biotechnology*, 10(40), 7723-7726.
- Jiménez, M., Castillo, I., Azuara, E., & Beristain, C.I. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) extracts. *Rev. Mex. Ing. Química*, 10(1), 29-37.
- Karban, R & Huntzinger, M. (2006). *How to do ecology: A Concise Handbook*. Princeton, NJ, USA: Princeton University Press.
- Kieleczawa, J. (2006). *DNA sequencing II: optimizing, preparation and cleanup*. Ontario: Jones and Bartlett Publishers. P 49-53.
- Kimura, M. & Weiss, G. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49, 561-576.
- Klug, W., Cummings, M., & Spencer, C. (2006). *Conceptos de genética*. Madrid, España: Pearson Educación, S.A.
- Koskinen, M. T., Hirvonen, H., Landry, P-A. & Primmer, C. R. (2004). The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas*, 141, 61-67.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2(4), 141-162.
- Lacy, R. (1997). Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78(2), 320-335.
- Levin, D. A. (1988). Consequences of stochastic elements in plant migration. *The American Naturalist*, 132, 643-651.
- Liu, X. & Pijut, P. (2008). Plant regeneration from in vitro leaves of mature black cherry (*Prunus serotina*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 94, 113-123.
- Maghuly, F., Borroto Fernandez, E., Ruthner, S., Pedryc, A., & Laimer, M. (2005). Microsatellite variability in apricots (*Prunus armeniaca* L.) reflects their geographic origin and breeding history. *Tree Genetics & Genomes*, 1, 151-165.
- Malice, M., Licht Villaroel Vogt, C., Pissard, A., Arbizu, C., Baudoin, J-P. (2009). Genetic diversity of the andean tuber crop species *Ullucus tuberosus* as revealed by molecular (ISSR) and morphological markers. *Belgian Journal of Botany*, 142, 68-82.

- Maynard, C. (1994). Six year field test results of micropropagated black cherry (*Prunus serotina*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 30P, 64-69.
- McCue, K. A., & Holtsford, T. P. (1998). Seed bank influences on genetic diversity in the rare annual *Clarkia springvillensis* (Onagraceae). *American Journal of Botany*, 85, 30-36.
- McVaugh, R. (1951). A revision of the North American black cherries (*Prunus serotina* Ehrh. and Relatives). *Brittonia*, 7(4), 279-315.
- Mille, L. (1942). El capulí. *FLORA-Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador*, 2, 50-51.
- Mondini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1, 19-35.
- Morrell, P. L., Lundy, K. E., & Clegg, M. T. (2003). Distinct geographic patterns of genetic diversity are maintained in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite migration. *PNAS*, 100, 10812-10817.
- Moose, S., & Mumm, R. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 147, 969-977.
- Pairon, M. C., & Jacquemart, A-L. (2005). Disomic segregation of microsatellites in the tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (Rosaceae). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130(5), 729-734.
- Pairon, M., Jacquemart, A., & Potter, D. (2008). Detection and characterization of genome specific microsatellite markers in allotetraploid *Prunus serotina*. *J. Amer. Soc. Hort. SCI*, 133(3), 390-395.
- Pairon, M., Petitpierre, B., Campbell, M., Guisan, A., Broennimann, O., Baret, P. V., Jacquemart, A-L., & Besnard, G. (2010). Multiple introductions boosted genetic diversity in the invasive range of black cherry (*Prunus serotina*; Rosaceae). *Annals of Botany*, 105, 881-890.
- Palacios, W. (2011). *Árboles del Ecuador*. Ministerio del Ambiente-Gobierno Nacional de la República del Ecuador. (1 ed.). Quito, Ecuador: Grupo Comunicacional Efigie.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J.P. (2006). *DARwin software*. Obtenido de <<http://darwin.cirad.fr/>>.

- Pissard, A., Arbizu, C., Ghislain, M., & Bertin, P. (2008). Influence of geographical provenance on the genetic structure and diversity of the vegetatively propagated andean tuber crop, Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), highlighted by intersimple sequence repeat markers and multivariate analysis methods. *Int. J. Plant Sci.*, *169*, 1248-1260.
- Popenoe, W. & A. Pachano. (1922). The capulin cherry. *Journal of Heredity*, *13*, 50-62.
- Primack, R. (2006). *Essentials of conservation biology*. 4 ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Ramanatha Rao, V., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *68*, 1–19.
- Randall Hughes, A., Inouye, B., Johnson, M., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, *11*, 609–623.
- Rauf, S., Texeira Da Silva, J., Ali Khan, A., & Naveed, A. (2010). Consequences of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of Plant Breeding*, *4*, 1, 1-21.
- Rohlf, F. J. (2008). *NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20*. Setauket, NY: Exeter Publishing, Ltd.
- Romero, C., Pedryc, A., Muñoz, V., Llacer, G., & Badenes, M L. (2003). Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome*, *46*, 244-252.
- Schneider, S., Kueffer, J-M., Roessli, D., & Excoffier, L. (1997). ARLEQUIN ver. 1.1. A software for population genetics data analysis. Obtenido de: <<http://anthropologie.unige.ch/arlequin>>.
- Struss, D., Ahmad, R., Southwick, S., & Boritzki, M. (2003). Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, *128*(6), 904-909.
- Testolin, R, Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M. T., Pancaldi, M., & Sansavini, S. (2000). Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, *43*(3), 512-520.
- Tian-Ming, H., Xue-Sen, C., Zheng, X., Jiang-Sheng, G., Pei-Jun, L., Wen, L., Qing, L., & Yan, W. (2007). Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *54*, 563-572.

- Torres, M.L. (2001). La diversidad genética. En: *La Biodiversidad del Ecuador-Informe 2000*. C. Josse (Ed.). Quito, Ecuador: Ministerio del Ambiente, Eco Ciencia, y Unión Mundial para la Naturaleza (UICN).
- Ulloa Ulloa, C., & Moller Jorgensen, P. (1995). *Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador*. (2 ed). Quito, Ecuador: Ediciones Abya Yala.
- Wang, M., Barkley, N., & Jenkins, T. (2009). Microsatellite markers in plants and insects. Part I: applications of biotechnology. *Genes, Genomes, and Genomics*, 3(1), x-y.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28, 114–138.
- Wunsch, A., & Hormaza, J.I. (2002). Molecular characterization of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) SSR sequences. *Heredity*, 89, 56-63.
- Xu, Y., Ma, R-C., Xie, H., Liu, J-T., & Cao, M-Q. (2004). Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome*, 47, 1091-1104.
- Yap, V.I. & Nelson, R.J. (1996). WINBOOT: A Program for Performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. *IRRI Discussion paper series* No. 14. Manila, Philippines: International Rice Research Institute.
- Zhebentyayeva, T. N., Reighard, G. L., Gorina, V.M., & Abbott, A. G. (2003). Simple sequence repeats (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theor Appl Genet*, 106, 435–444.

13 TABLAS

Tabla 1. Primers SSR heterólogos y altamente polimórficos seleccionados para el análisis de diversidad genética en individuos de *Prunus serotina* subsp. *capulí* de ocho provincias de la sierra ecuatoriana (Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay).

Primer	Secuencia (5'-3')	Código del Primer y Referencia	Especie de origen	Tamaño esperado (pb) del amplicón	Tamaño encontrado (pb) del amplicón	Número de alelos encontrados y su nomenclatura.	Temperatura de Annealing (°C)
A	F:GAACATGTGGTGTGCTGGTT R:TCCACTAGGAGGTGAAATG	PceGA34 (Downey e Iezzoni, 2000)	Sour Cherry	140-174	140-168	10 : A, B, C, D, F, G, H, I, J, K.	60
B	F: GCCACCAATGGTTCTTC R:AGCACCAGATGCACCTGA	PS12A02 (Downey e Iezzoni, 2000)	Sweet Cherry	150-178	150-160	4: A, C, D, E.	62
C	F:ACGCTATGTCCGTACCATCTCCATG R:CAACCTGTGATTGCTCCTATTAAC	pchpgms3 (Downey e Iezzoni, 2000)	Durazno	170-230	169-230	8: A, B, C, D, E, F, G, H.	60
D	F:GTCAATGAGTTCAGTGTCTACTC R:AATCATAACATCATTGAGCCACTGC	pchgms2 (Downey e Iezzoni, 2000)	Durazno	130-152	130-153	5: A, B, C, D, E.	52
F	F:AATTTACCTATCAGCCTCAAA R:TTTATGCAGTTTACAGACCG	UDP98-410 (Testolin et al., 2000)	Durazno	146	110-121	4: A, *A1, B, C.	49
G	F:AGTTTGATTTTCTGATGCATCC R:TGCCATAAGGACCGGGATGT	UDP96-001 (Testolin et al., 2000)	Durazno	120	102-120	7: A, B, C, D, E, F, G.	56.3
I	F:TTA AGA GTT TGT GAT GGG AAC C R:AAG CAT AAT TTA GCA TAA CCA AGC	BBPCT-017 (Pairon et. al, 2008; Dirlewanger et al., 2002)	Durazno	316-364	310-360	4: A, B, C, D.	53.2
L	F:TTT TCT CAG CAG CCA AAC AA R:ATG TTT CGT GCT TCT GCT CC	UDP98-416 (Pairon et. al, 2008; Testolin et al., 2000)	Durazno	102-106	98-111	7: A', A, B, C, D, E, F.	56

*Se detectó un total de 49 alelos para los ocho primers SSR. A1 fue el único alelo nuevo encontrado; los 48 alelos restantes ya fueron documentados por

Guadalupe (2013) en la primera fase de esta investigación.

Tabla 2. Número de accesiones colectadas e información obtenida a partir los análisis moleculares realizados para las tres provincias analizadas en el presente estudio, las cinco provincias evaluadas durante la primera fase de la investigación (*representa información obtenida de Guadalupe, 2013), y el conjunto de ocho provincias incluidas en ambas fases.

Provincia o conjuntos de provincias.	Número total de accesiones	Rango de cuantificación de DNA (ng/μl)	Número total de alelos identificados a través del análisis de 8 loci SSR	Número de alelos únicos identificados
Pichincha	33	300.05-5166.07	49	1
Cañar	25	385.44-3226.07	47	0
Azuay	30	435.07-3573.49	48	0
Análisis general de las 3 provincias (presente estudio)	88	-----	49	1
Carchi	*12	*992-1160	*44	*0
Imbabura	*23	*195-1732	*47	*0
Cotopaxi	*20	*278-5504	*46	*0
Tungurahua	*38	*202-5531	*48	*0
Chimborazo	*36	*33.49-4782	*48	*0
Análisis general de 5 provincias (primera fase)	*129	-----	*48	*0
Análisis global de las 8 provincias (primera y segunda fases)	217	-----	49	0

Tabla 3. Cuadro comparativo que relaciona el número total de alelos para cada uno de los ocho primers SSR reportado por estudios preliminares y los valores registrados durante el presente estudio. En color rojo, se señalan los primers en los que este estudio registró un número total de alelos menor a los valores previamente reportados.

Código de Primer	Especie de origen del primer SSR	Numero de alelos previamente reportado	Numero de alelos registrados en este estudio
A	Cereza agria (<i>P. cerasus</i> L.)	14 (Downey e Iezzoni, 2000)	10
B	Cereza dulce (<i>P. avium</i> L.)	12 (Downey e Iezzoni, 2000)	4
C	Durazno (<i>P. persica</i>)	19 (Downey e Iezzoni, 2000)	8
D	Durazno (<i>P. persica</i>)	9 (Downey e Iezzoni, 2000)	5
F	Durazno (<i>P. persica</i>)	8 (Testolin et al., 2000)	4
G	Durazno (<i>P. persica</i>)	6 (Testolin et al., 2000)	7
I	Durazno (<i>P. persica</i>)	5 (Dirlewanger et al., 2002)	4
L	Durazno (<i>P. persica</i>)	4 (Testolin et al., 2000)	7

Tabla 4. Valores del Índice de distancia genética (F_{st}) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones provenientes de las tres provincias analizadas.

Nivel de diferenciación genética entre provincias.			
	Pichincha	Cañar	Azuay
Pichincha	0.00000	-----	-----
Cañar	0.21769	0.00000	-----
Azuay	0.08104	0.05272	0.00000

Valores P de Significancia			
	Pichincha	Cañar	Azuay
Pichincha	-----	-----	-----
Cañar	0.00000 \pm 0.0000	-----	-----
Azuay	0.00000 \pm 0.0000	0.14414 \pm 0.0278	-----

Tabla 5. Valores del Índice de distancia genética (F_{st}) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones provenientes de las ocho provincias analizadas en la primera y segunda fases de esta investigación.

Nivel de diferenciación genética entre provincias.								
	Carchi	Imbabura	Pichincha	Cotopaxi	Tungurahua	Chimborazo	Cañar	Azuay
Carchi	0.00000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imbabura	0.06496	0.00000	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pichincha	0.17521	0.12902	0.00000	-----	-----	-----	-----	-----
Cotopaxi	0.09244	0.08658	0.16991	0.00000	-----	-----	-----	-----
Tungurahua	0.11011	0.13224	0.09413	0.08998	0.00000	-----	-----	-----
Chimborazo	0.13391	0.14300	0.07378	0.11138	0.03668	0.00000	-----	-----
Cañar	0.21860	0.24983	0.21769	0.22528	0.21607	0.21225	0.00000	-----
Azuay	0.12173	0.09083	0.08104	0.13689	0.13135	0.09306	0.05272	0.00000

Valores P de Significancia.								
	Carchi	Imbabura	Pichincha	Cotopaxi	Tungurahua	Chimborazo	Cañar	Azuay
Carchi	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Imbabura	0.08108 ± 0.0286	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Pichincha	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Cotopaxi	0.01802 ± 0.0121	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	-----	-----	-----	-----	-----
Tungurahua	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	-----	-----	-----	-----
Chimborazo	0.01802 ± 0.0121	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	0.02703 ± 0.0139	-----	-----	-----
Cañar	0.02703 ± 0.0194	0.00000 ± 0.0000	0.00901 ± 0.0091	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	0.00000 ± 0.0000	-----	-----
Azuay	0.01802 ± 0.0121	0.00000 ± 0.0000	0.10811 ± 0.0297	-----				

Tabla 6. Valores del Índice de distancia genética (F_{st}) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones correspondientes a las provincias de la zona Norte y las provincias de la zona Sur de la región interandina del Ecuador (Figura 1).

Conjuntos de Provincias	Provincias agrupadas	
4 Provincias Norte	Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi	
4 Provincias Sur	Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay	

Nivel de diferenciación genética entre conjuntos de provincias		
	4 Provincias Norte	4 Provincias Sur
4 Provincias Norte	0.00000	-----
4 Provincias Sur	0.03959	0.00000

Valores P de Significancia.		
	4 Provincias Norte	4 Provincias Sur
4 Provincias Norte	-----	-----
4 Provincias Sur	0.00000 ± 0.0000	-----

Tabla 7. Valores del Índice de distancia genética (F_{st}) y P de significancia estadística (nivel de significancia estándar equivalente a 0.05) obtenidos al comparar los conjuntos de accesiones correspondientes a las provincias de la zona Norte, las provincias de la zona Central y las provincias de la zona Sur de la región interandina del Ecuador (Figura 1).

Conjuntos de Provincias	Provincias agrupadas
4 Provincias Norte	Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi
2 Provincias Centro	Tungurahua y Chimborazo
2 Provincias Sur	Cañar y Azuay

Nivel de diferenciación genética entre conjuntos de provincias			
	4 Provincias Norte	2 Provincias Centro	2 Provincias Sur
4 Provincias Norte	0.00000	-----	-----
2 Provincias Centro	0.05532	0.00000	-----
2 Provincias Sur	0.09479	0.13341	0.00000

Valores P de Significancia.			
	4 Provincias Norte	2 Provincias Centro	2 Provincias Sur
4 Provincias Norte	-----	-----	-----
2 Provincias Centro	0.00000 \pm 0.0000	-----	-----
2 Provincias Sur	0.00000 \pm 0.0000	0.00000 \pm 0.0000	-----

Tabla 8. Coeficientes de similitud UPGMA obtenidos a partir de los dendrogramas elaborados con los datos obtenidos de las tres provincias analizadas en el presente estudio, las cinco provincias evaluadas durante la primera fase de la investigación (*representa información obtenida de Guadalupe, 2013) , y el conjunto de ocho provincias incluidas en ambas fases.

Provincia o conjuntos de provincias.	No. de figura correspondiente al dendrograma	Coefficientes de similitud UPGMA
Pichincha	11	0.68
Cañar	12	0.75
Azuay	13	0.696
Análisis general de las 3 provincias (estudio actual)	14	0.694
Carchi	Ver Guadalupe (2013)	*0.81
Imbabura	Ver Guadalupe (2013)	*0.68
Cotopaxi	Ver Guadalupe (2013)	*0.74
Tungurahua	Ver Guadalupe (2013)	*0.70
Chimborazo	Ver Guadalupe (2013)	*0.70
Análisis general de 5 provincias (primera fase)	Ver Guadalupe (2013)	*0.66
Análisis global de las 8 provincias (primera y segunda fases)	15	0.657

Tabla 9. Resumen de las accesiones que conforman cada uno de los clusters (agrupamientos) identificados en el dendrograma que relaciona los datos correspondientes a las tres provincias analizadas en el presente estudio: Pichincha (PIC), Cañar (CAN), y Azuay (AZU) (Figura 14).

Número de cluster	Accesiones agrupadas
1	PIC 002, PIC 017, PIC 009, PIC 019, y PIC 010
2	PIC 003 y PIC 006
3	PIC 004, CAN 010, CAN 006, CAN 011, CAN 008, PIC 015, AZU 016, CAN 014, CAN 016, CAN 018, CAN 021, y CAN 022
4	PIC 011, AZU 026, CAN 003, CAN 009, AZU 022, CAN 015, CAN 024, AZU 017, CAN 005, AZU 027, CAN 001, PIC 031, AZU 007, PIC 032, AZU 025, AZU 001, AZU 006, AZU 004, AZU 012, AZU 014, AZU 029, AZU 003, AZU 020, CAN 013, y CAN 020
5	PIC 008, PIC 018, AZU 010, PIC 029, CAN 004, PIC 034, CAN 019, PIC 023, PIC 026, PIC 027, PIC 028, y AZU 028
6	PIC 024, CAN 023, AZU 021, y CAN 007
7	AZU 013, AZU 018, CAN 017, AZU 023, y AZU 024
8	PIC 005, AZU 009, AZU 011, AZU 015, y AZU 019
9	PIC 033, AZU 030, AZU 008, AZU 005
10	PIC 007, PIC 030, PIC 025, AZU 002, PIC 013, y PIC 014
11	PIC 012, PIC 020, PIC 022, PIC 021, PIC 016, CAN 025, CAN 012, y CAN 002

Tabla 10. Resumen de las accesiones que conforman cada uno de los clusters (agrupamientos) identificados en el dendrograma que relaciona los datos correspondientes a las ocho provincias analizadas en la primera y segunda fases de la investigación: Carchi (CAR), Imbabura (IMB), Pichincha (PIC), Cotopaxi (C), Tungurahua (T), Chimborazo (H), Cañar (CAN), y Azuay (AZU) (Figura 16).

Número de cluster	Accesiones agrupadas
1	H1, AZU 010, T014, CAR 003, PIC 024, H20, H24, T017, IMB 018, T008, T015, T007, C002, H2, CAR 005, IMB 001, AZU 008, IMB 011, PIC 033, AZU 030, IMB 008, T032, T034, H21, H26, CAR 012, CAR 008, CAR 009, C013, AZU 005, H36, PIC 010, IMB 019, y PIC 023
2	H3, H8, H27, H28, H29, C018, H5, H32, C017, H6, H33, H17, T022, H31, T003, H15, T011, T016, T020, T021, T023, CAN 019, IMB 016, IMB 017, T004, CAN 021, CAN 022, T006, C003, C005, T026, T029, T028, C001, C004, C006, H12, H13, H25, H30, PIC 008, PIC 018, CAR 002, CAN 004, H18, CAR 001, CAR 004, T009, T037, T027, C015, C016, C021, H9, PIC 007, H19, PIC 030, T010, PIC 022, PIC 016, CAN 025, CAN 012, T030, PIC 020, T033, IMB 024, PIC 025, AZU 002, PIC 012, y PIC 021
3	H10, T035, H16, T019, AZU 014, AZU 029, AZU 013, AZU 018, CAN 017, H14, PIC 011, PIC 029, PIC 031, AZU 007, PIC 032, AZU 025, AZU 001, AZU 006, AZU 004, AZU 012, H34, CAR 006, AZU 022, AZU 023, AZU 026, CAN 003, CAN 009, CAN 015, CAN 024, C007, AZU 027, CAN 001, PIC 004, CAN 010, CAN 006, CAN 011, AZU 016, CAN 014, CAN 016, CAN 018, AZU 021, CAN 007, AZU 017, CAN 005, CAN 013, CAN 020, PIC 026, PIC 028, AZU 028, AZU 003, AZU 020, CAR 007, AZU 015, AZU 019, IMB 015, y AZU 011
4	H22, CAR 010, T038, IMB 021, IMB 022, CAR 011, AZU 024, IMB 002, IMB 003, IMB 004, IMB 005, IMB 006, IMB 007, IMB 009, IMB 020, PIC 027, IMB 023, C012, C014, C009, C011, IMB 010, y C008
5	H23 y T039
6	C019, C020, CAN 008, CAN 023, PIC 005, y AZU 009
7	H11, T018, T001, PIC 013, PIC 014, PIC 015, PIC 034, PIC 009, PIC 019, PIC 002, PIC 017, H35, T002, T013, PIC 003, y PIC 006
8	H4
9	IMB 012, IMB 014, H7, T024, T025, T005, y T036
10	T012
11	CAN 002

Tabla 11. Valores de Bootstrap representativos para agrupamientos por provincia (Pichincha, Cañar y Azuay), para las tres provincias analizadas en el presente estudio, y para las ocho provincias incluidas en la primera y segunda fases de la investigación. Para que un agrupamiento sea representativo, debe poseer un valor de bootstrap que sea superior al 70%. *-Datos obtenidos durante la primera fase de la investigación (Guadalupe, 2013).

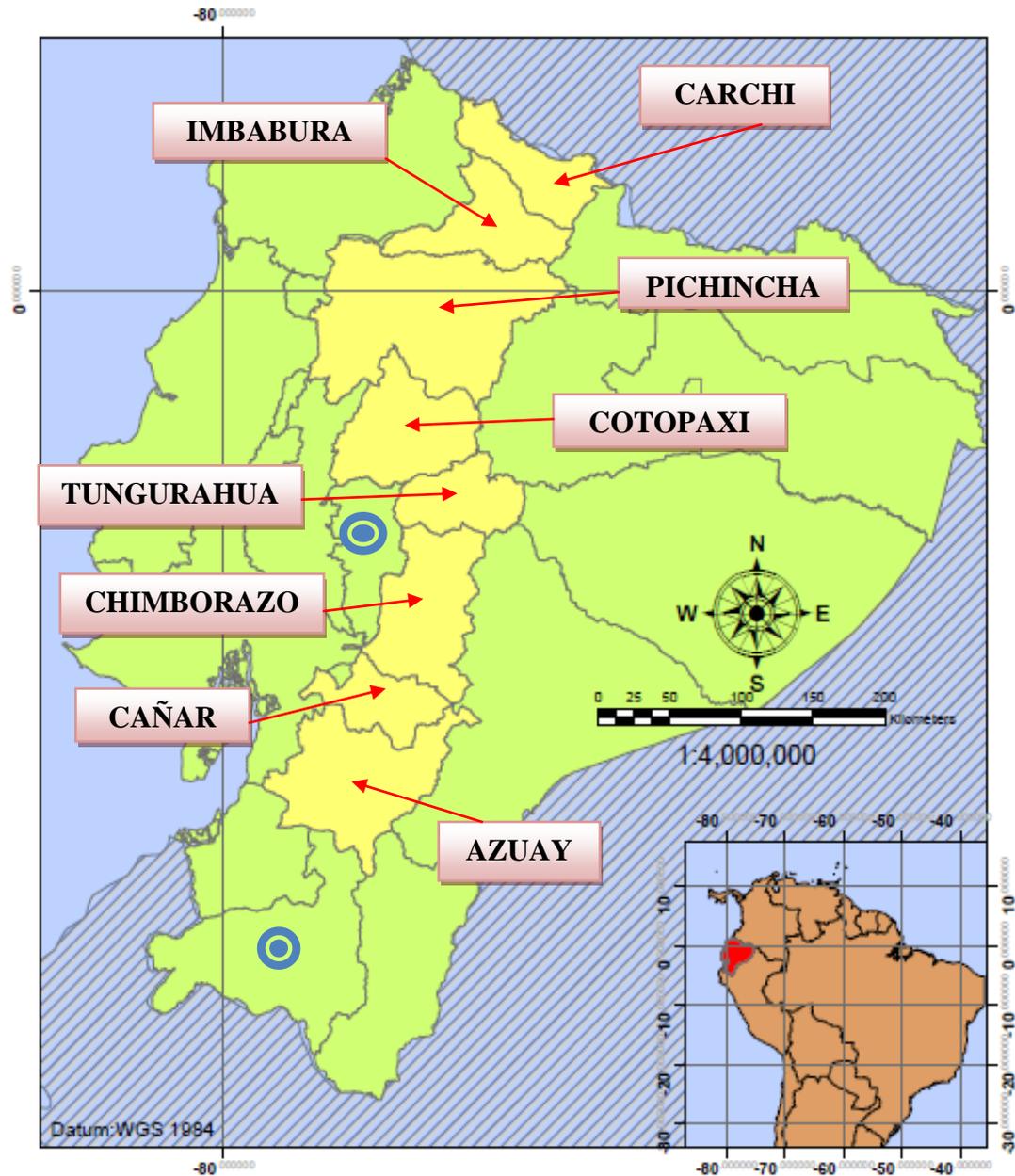
Provincia	Agrupaciones representativas	Localidad	Valor de Bootstrap encontrado
Pichincha	1 (PIC 003 y PIC 006)	Norte de Quito (Ambas)	75.8
Cañar	1 (CAN 016 y CAN 018)	Ingapirca (Ambas)	68.0
Azuay	0	NA	NA

Conjunto de Provincias	Agrupaciones representativas	Localidad	Valor de Bootstrap encontrado
3 provincias	2- A: (PIC 003 y PIC 006) y B: (CAN 016 y CAN 018)	A: Norte de Quito (Ambas) y B: Ingapirca (Ambas)	A: 77.3 y B: 61.4

Conjunto de Provincias	Agrupaciones representativas	Localidad*	Valor de Bootstrap encontrado
8 provincias	2-A: (IMB 012 e IMB 014) y B: (IMB 4 e IMB 5)	A: San Pablo (Ambas) y B: Huyco-Pungo (Ambas)	A: 70 y B: 79

14 Figuras:

Figura 1. Mapa georeferenciado de la región continental de la República del Ecuador que muestra las ocho provincias analizadas durante la primera y segunda fases de esta investigación. No se tomaron en cuenta las provincias de Bolívar y Loja (marcadas con un círculo azul). El software empleado fue ARCGIS v. 10.



(Mapa elaborado por Gabriel Muñoz).

Figura 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer A**. Los 10 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

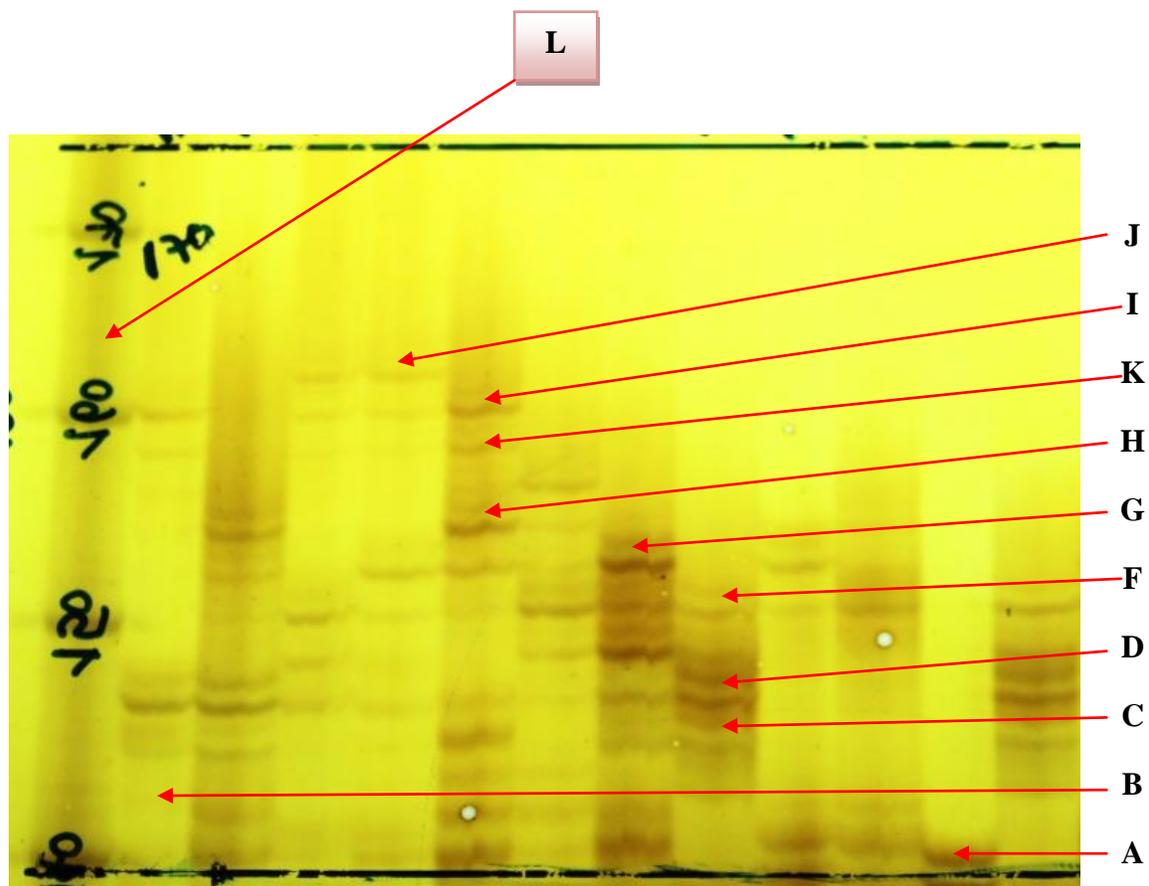


Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer B**. Los 4 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

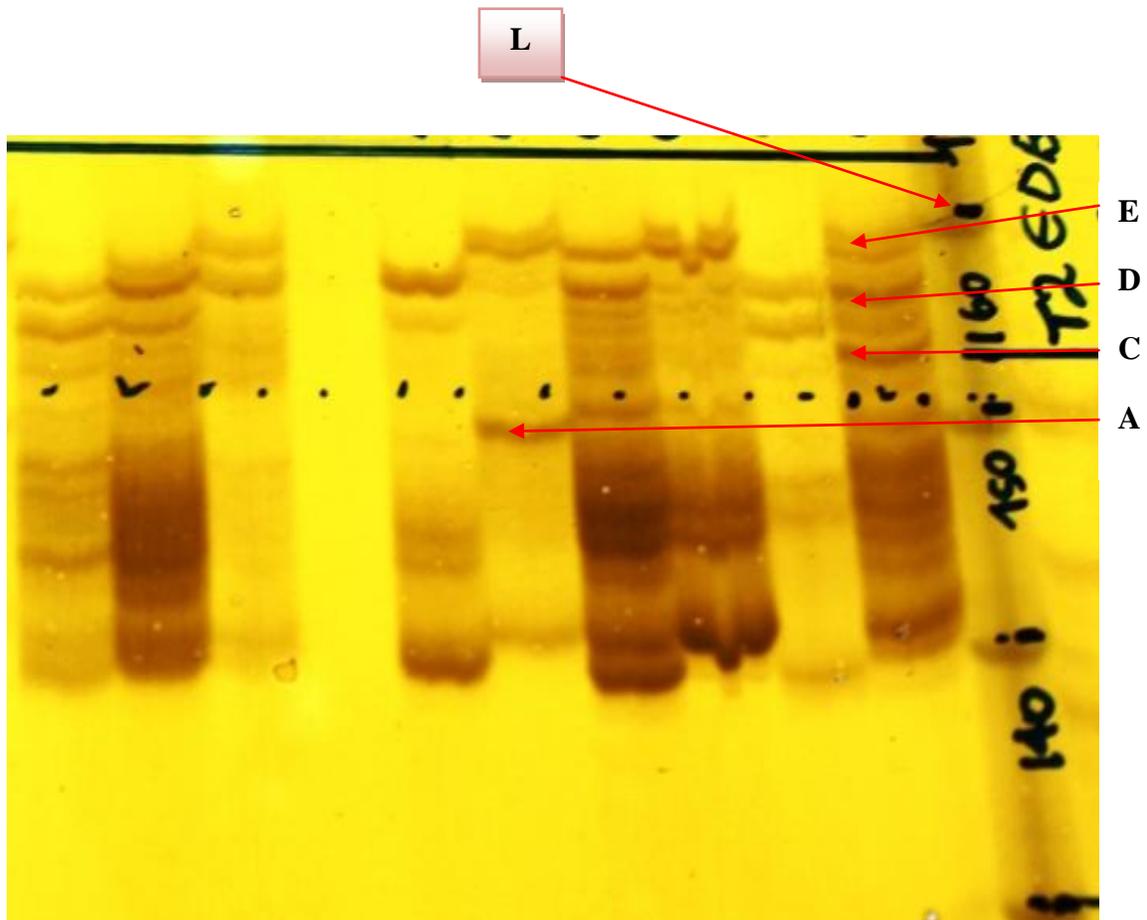


Figura 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer C**. Los 8 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

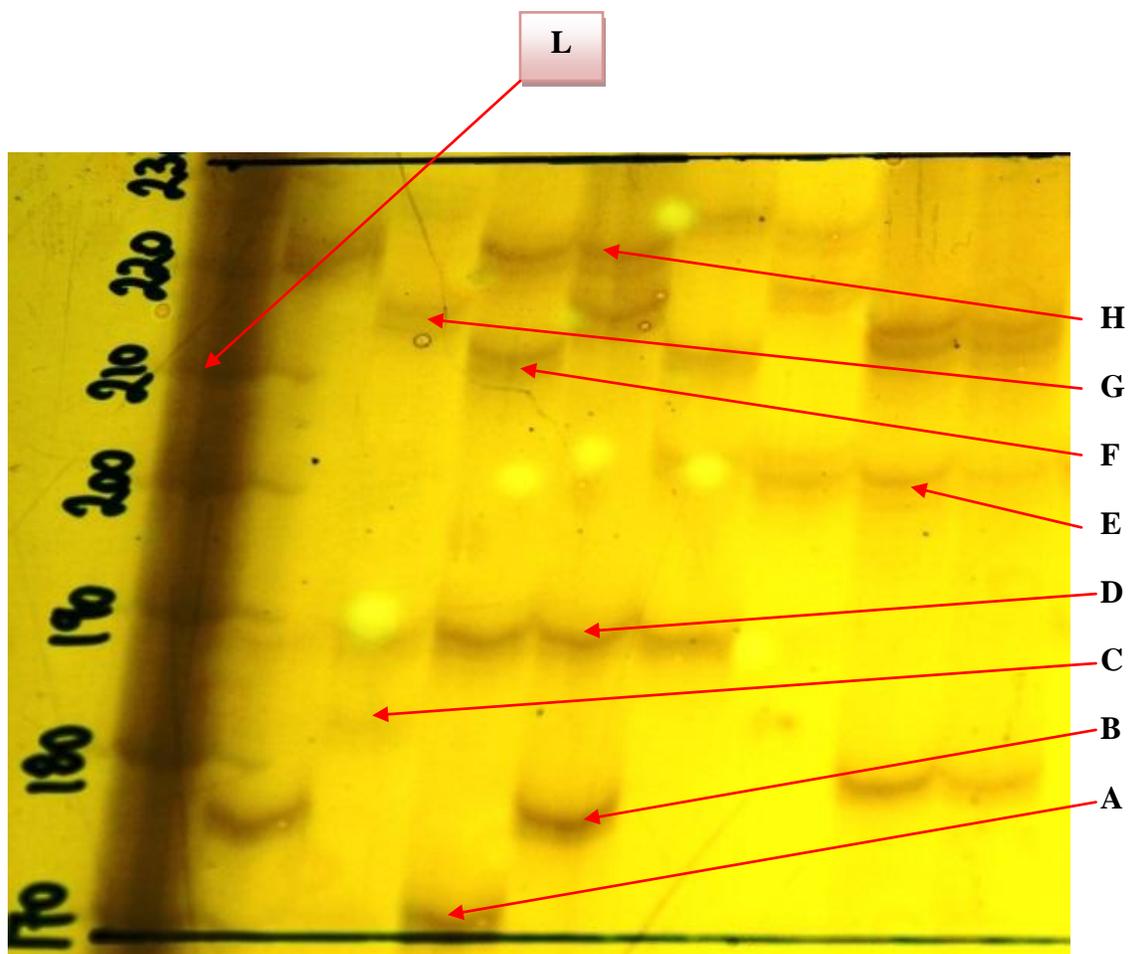


Figura 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer D**. Los 5 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

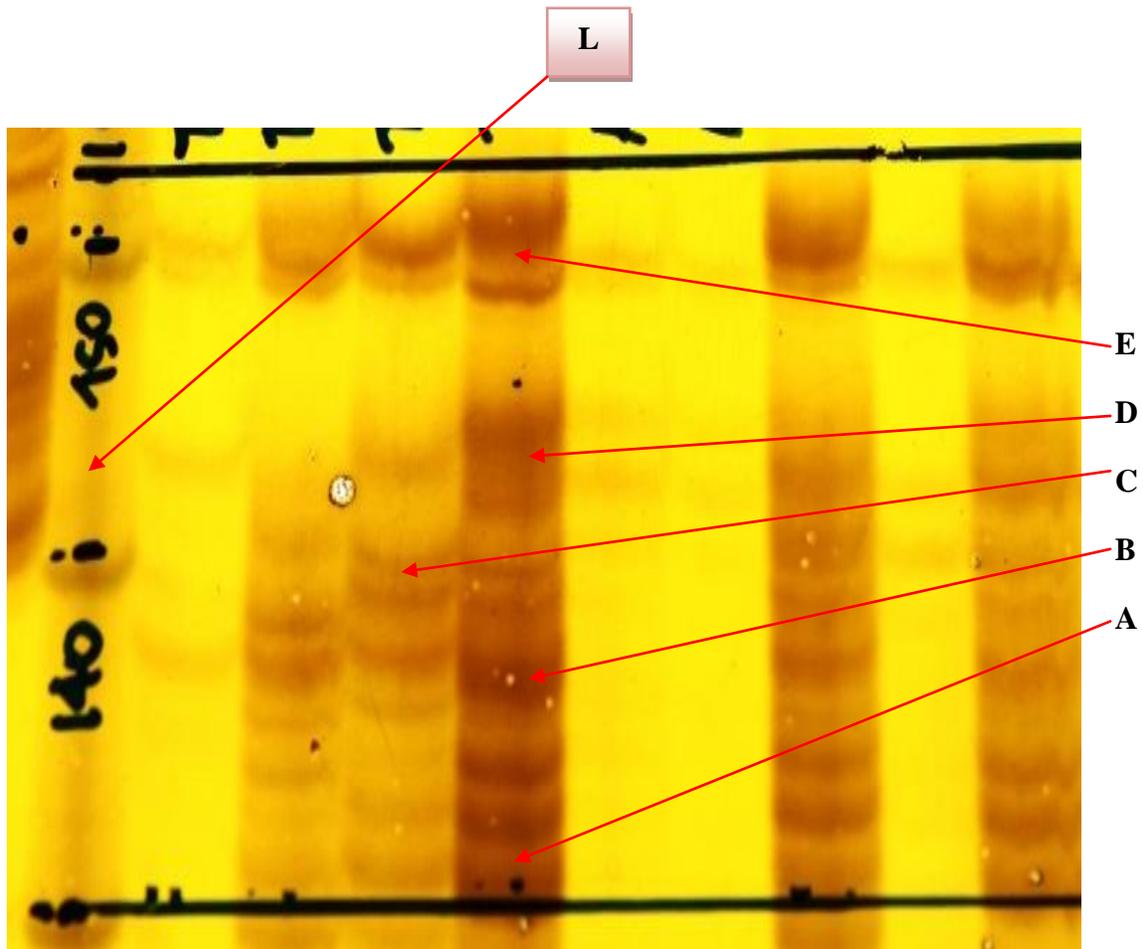


Figura 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer F**. 3 de los 4 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

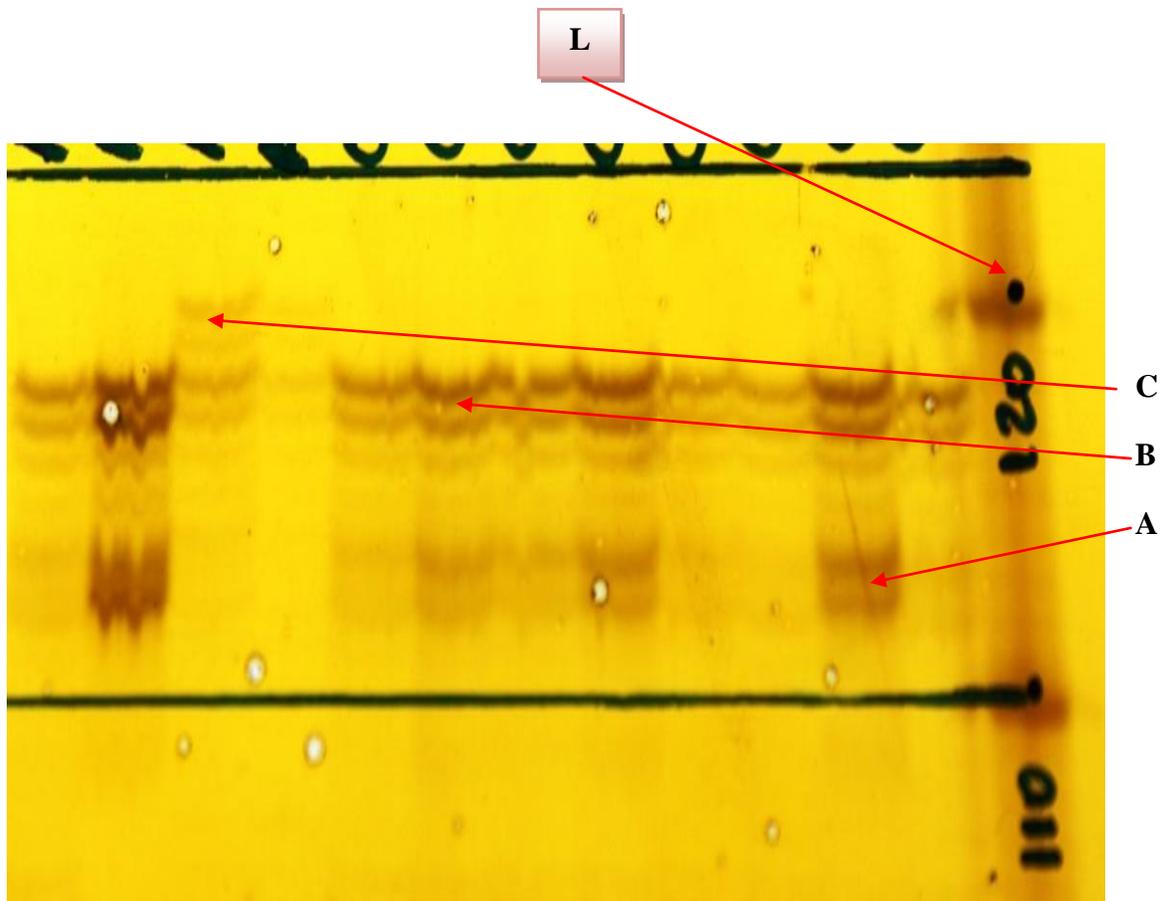


Figura 8. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer G**. Los 7 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

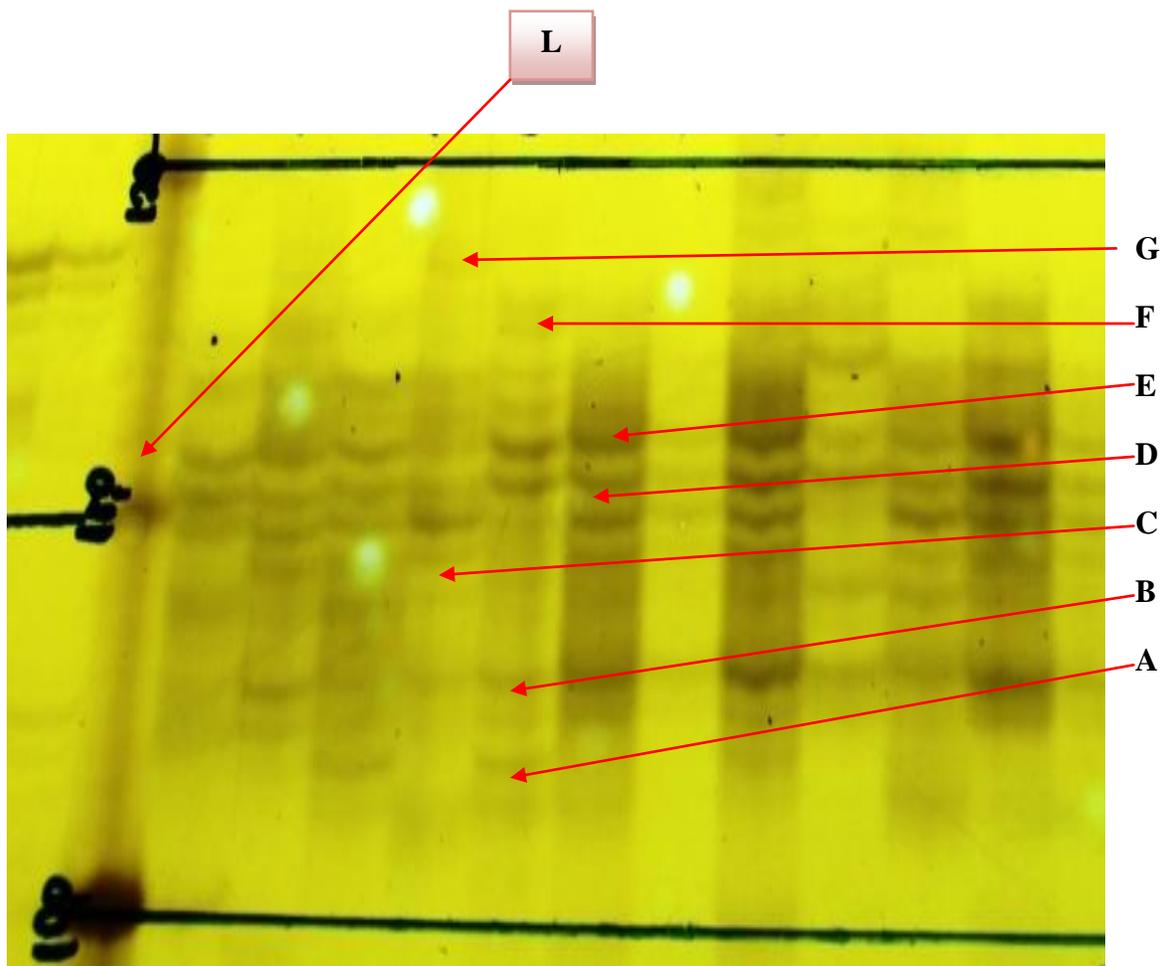


Figura 9. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer I**. Los 4 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.



Figura 10. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de PCR originados a partir del **primer L**. Los 7 alelos correspondientes se muestran en la foto. **L:** Ladder 10 bp.

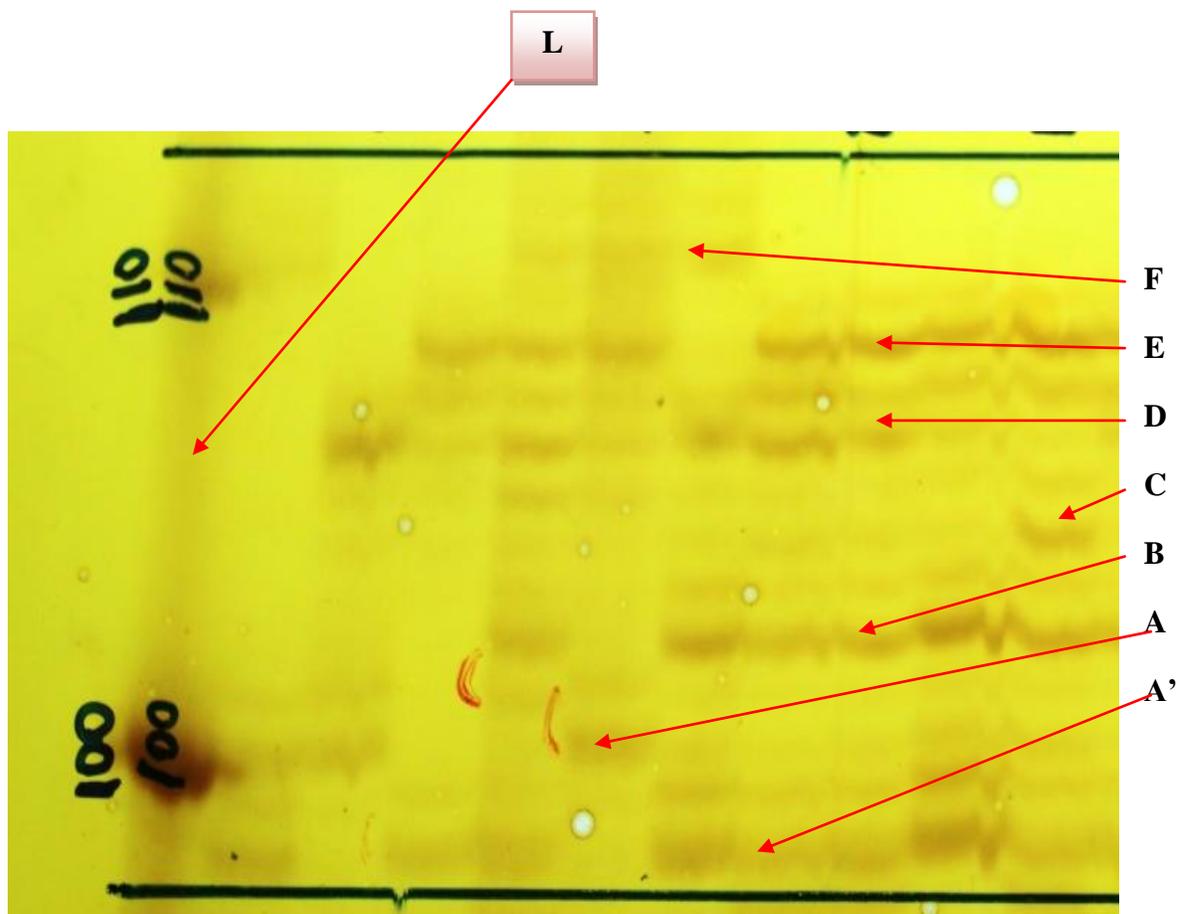


Figura 11. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de la provincia de Pichincha; se observan 6 clusters; las accesiones no se agrupan por localidad (Anexo 1) con excepción del cluster No. 2.

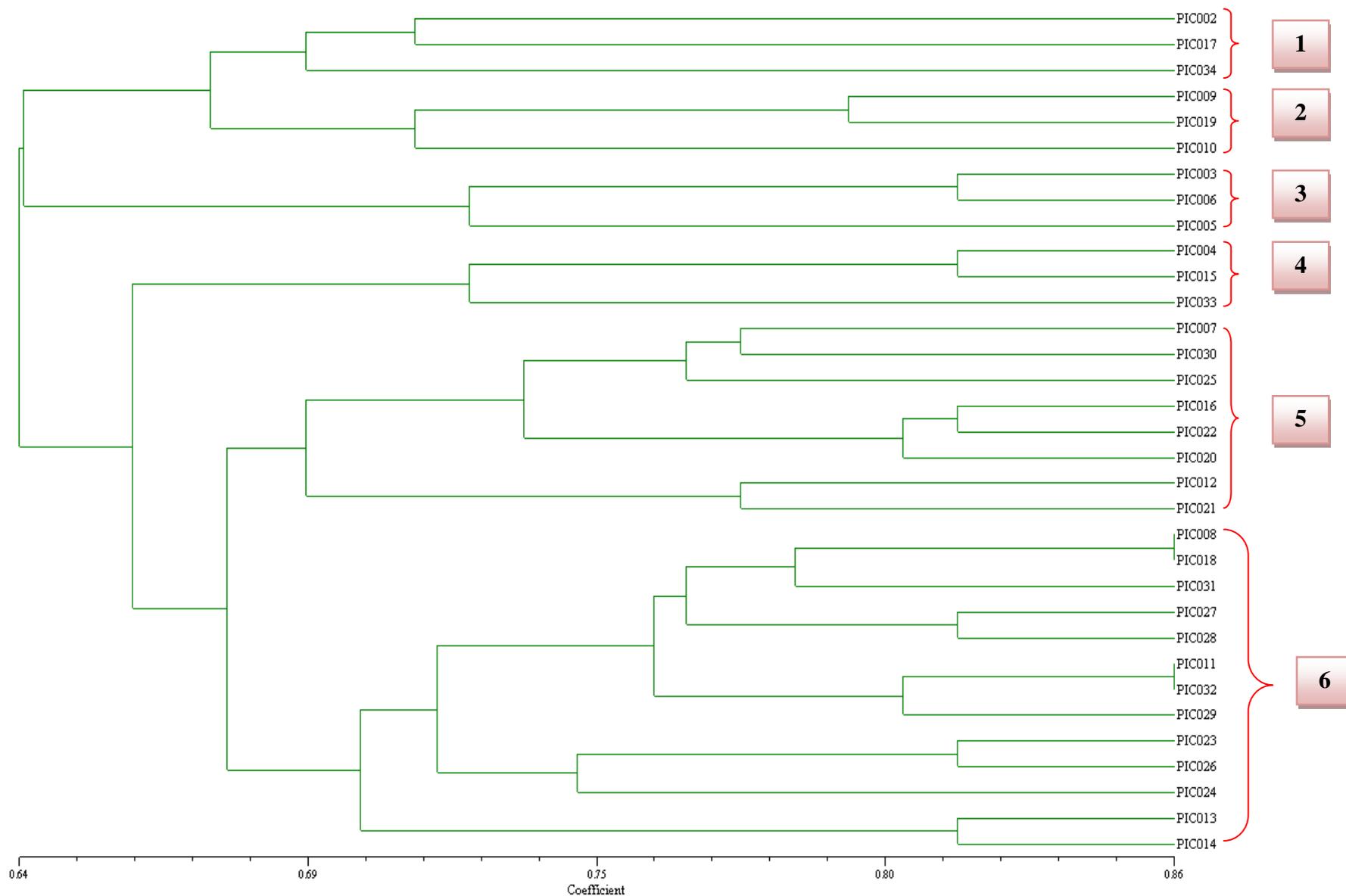


Figura 12. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de la provincia de Cañar; se observan 4 clusters; las accesiones no se agrupan por localidad (Anexo 1) con excepción del cluster No. 1.

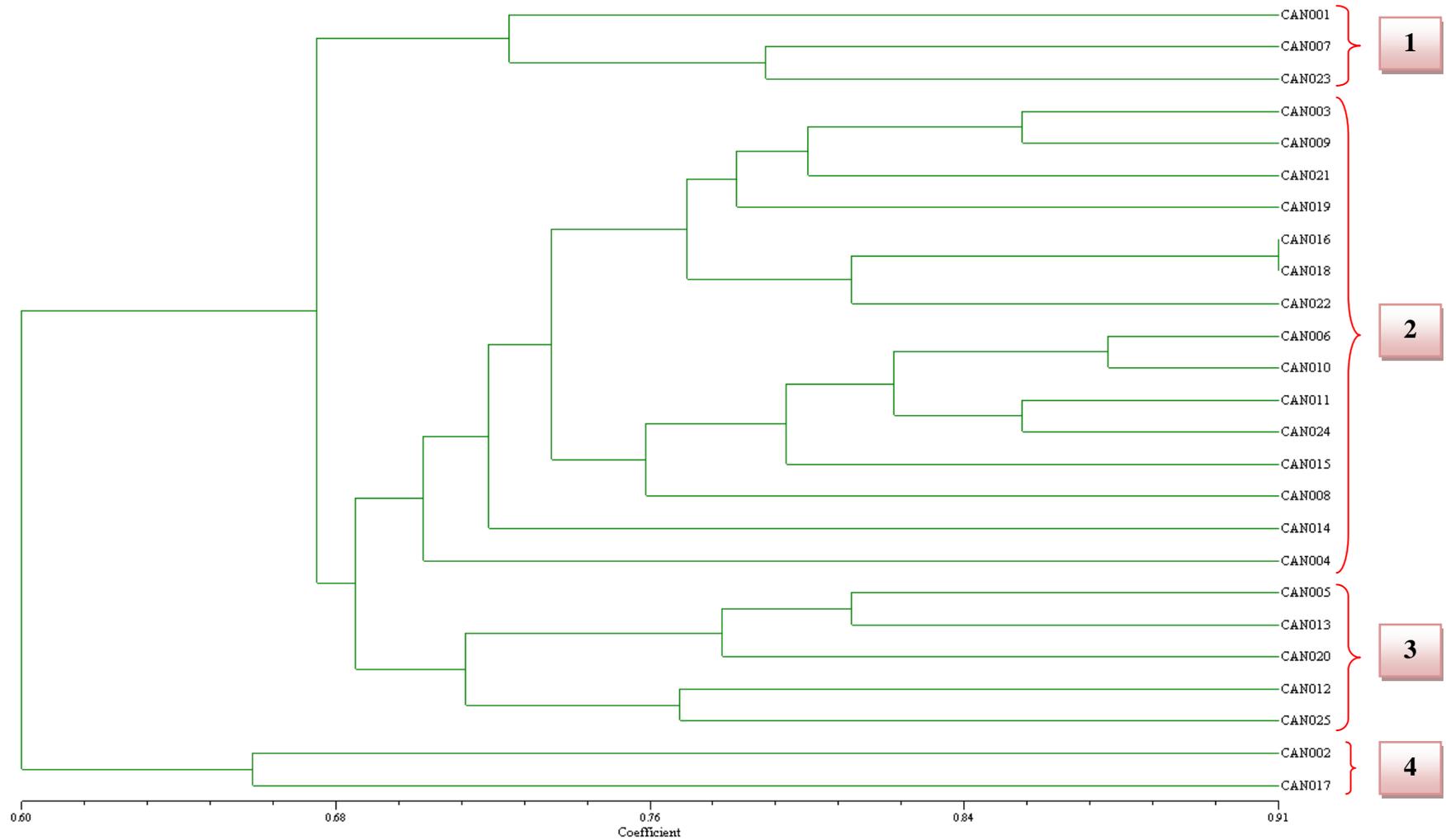


Figura 13. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de la provincia de Azuay; se observan 11 clusters; las accesiones no se agrupan por localidad (Anexo 1) con excepción de los clusters No. 6, 10 y 11 que constan de una sola accesión.

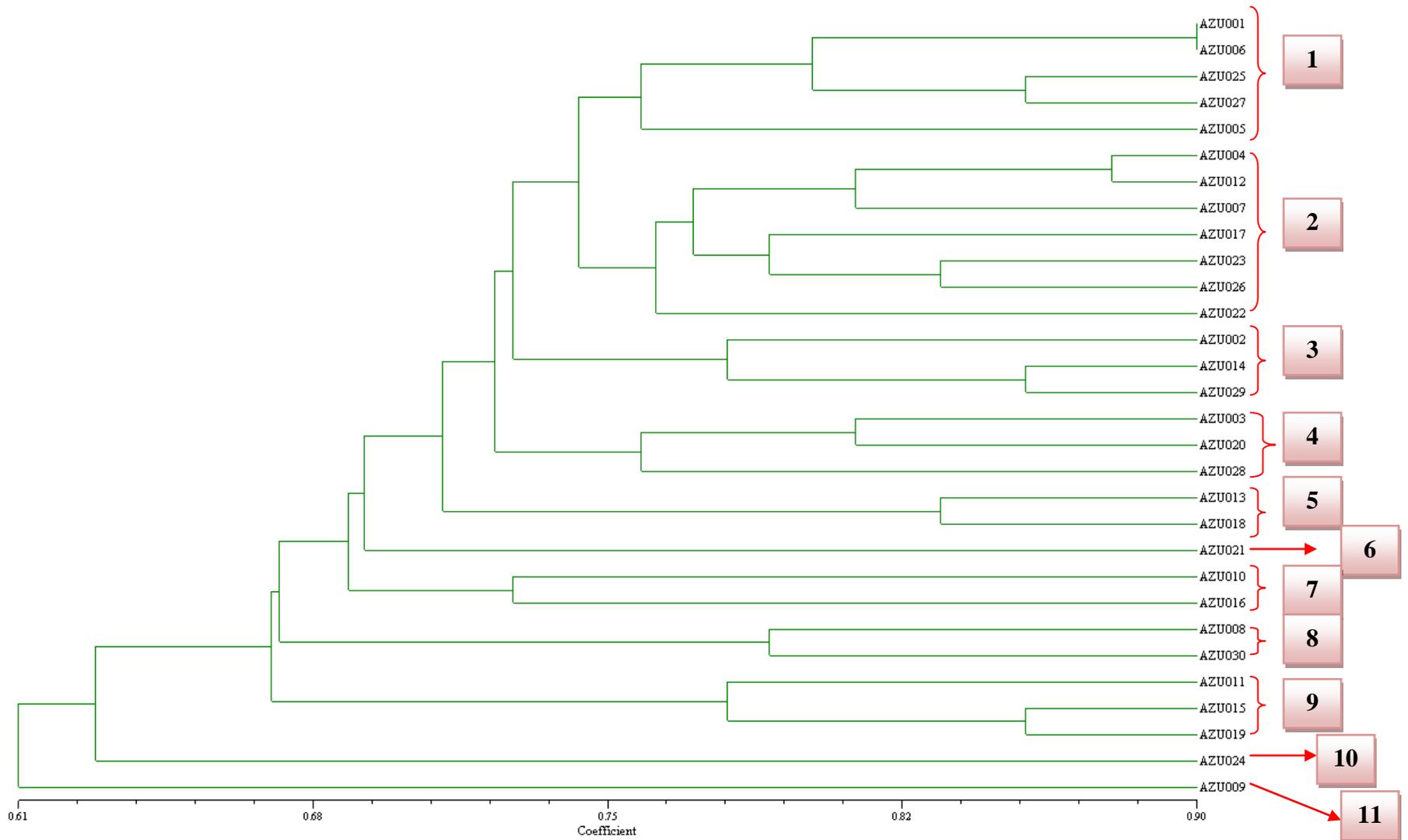


Figura 14. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las accesiones provenientes de Pichincha, Cañar y Azuay. Se identificaron 11 clusters; la conformación de cada uno de ellos se detalla en la **Tabla 9**. Las accesiones no se agrupan por localidad (Anexo 1) con excepción de los clusters No. 1 y 2.

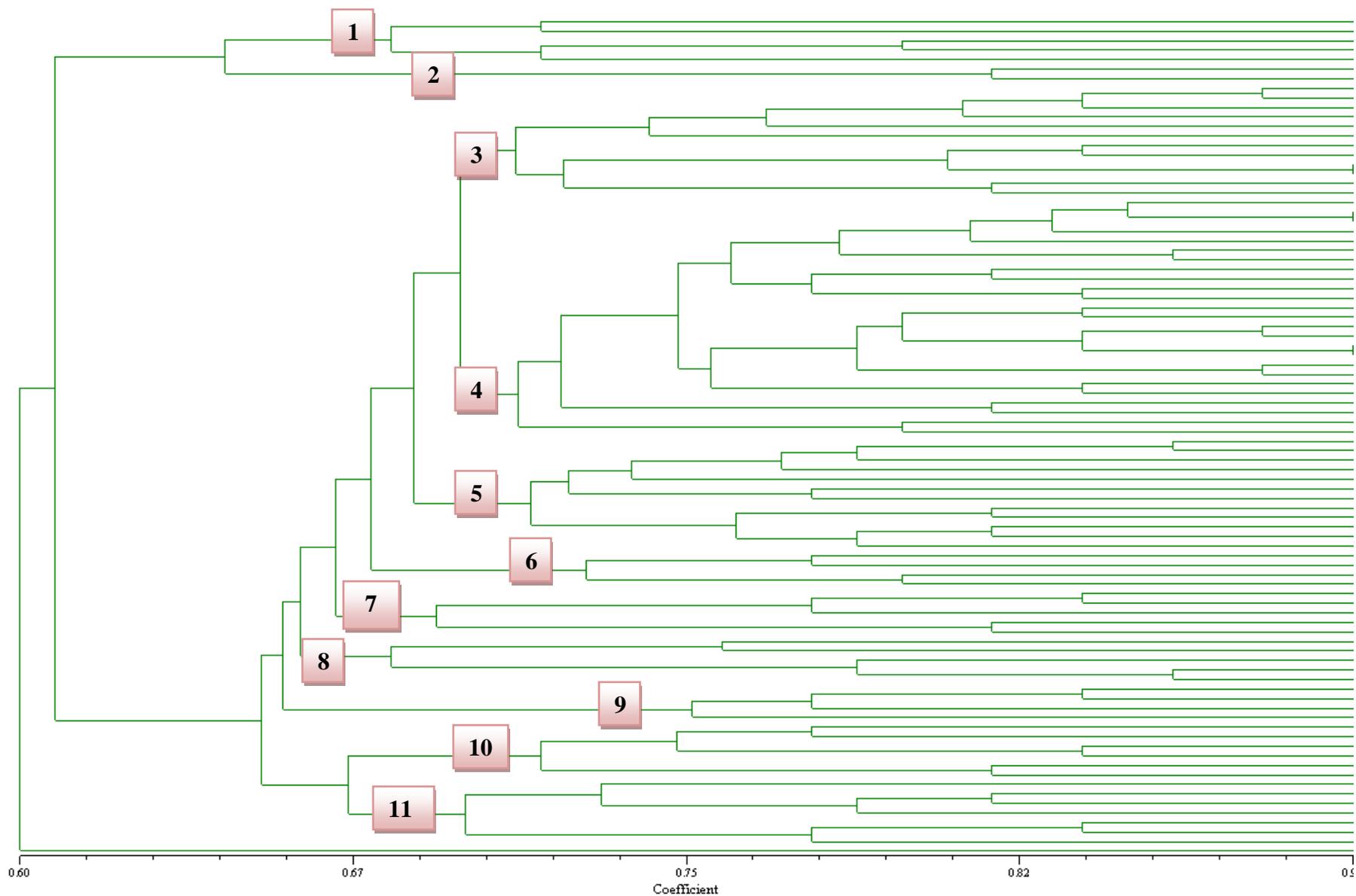


Figura 15. PCoA que muestra relaciones de similitud entre accesiones provenientes de las provincias analizadas durante el presente estudio: Pichincha (color naranja), Cañar (color amarillo), y Azuay (color verde claro).

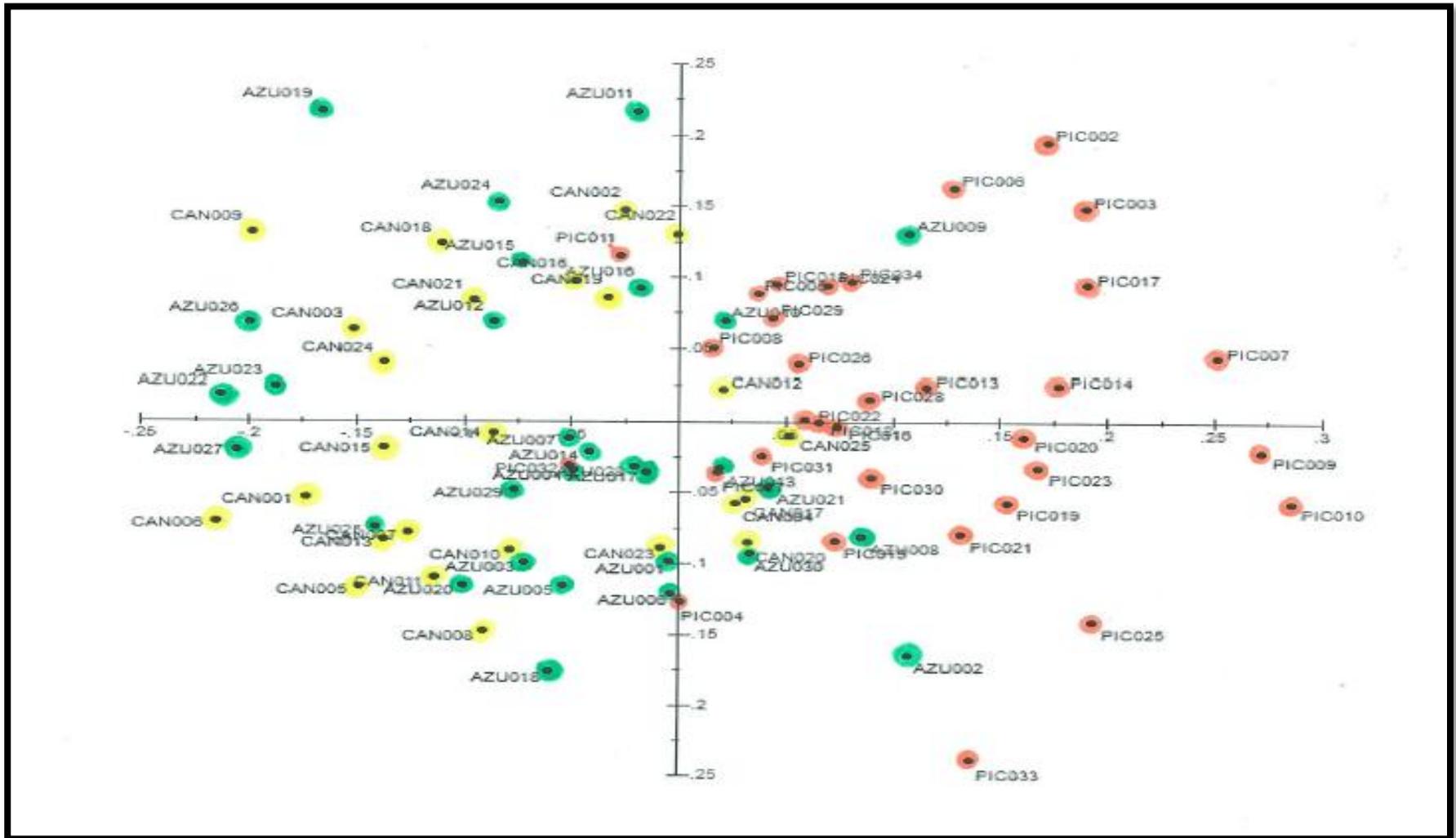


Figura 16. Dendrograma que muestra relaciones de similitud entre las ocho provincias analizadas durante la primera y segunda fases de esta investigación: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay. Se identificaron 11 clusters; la conformación de cada uno de ellos se detalla en la **Tabla 10**. Las accesiones no se agrupan por localidad (Anexo 1) con excepción de los clusters No. 8, 10 y 11 que constan de una sola accesión.

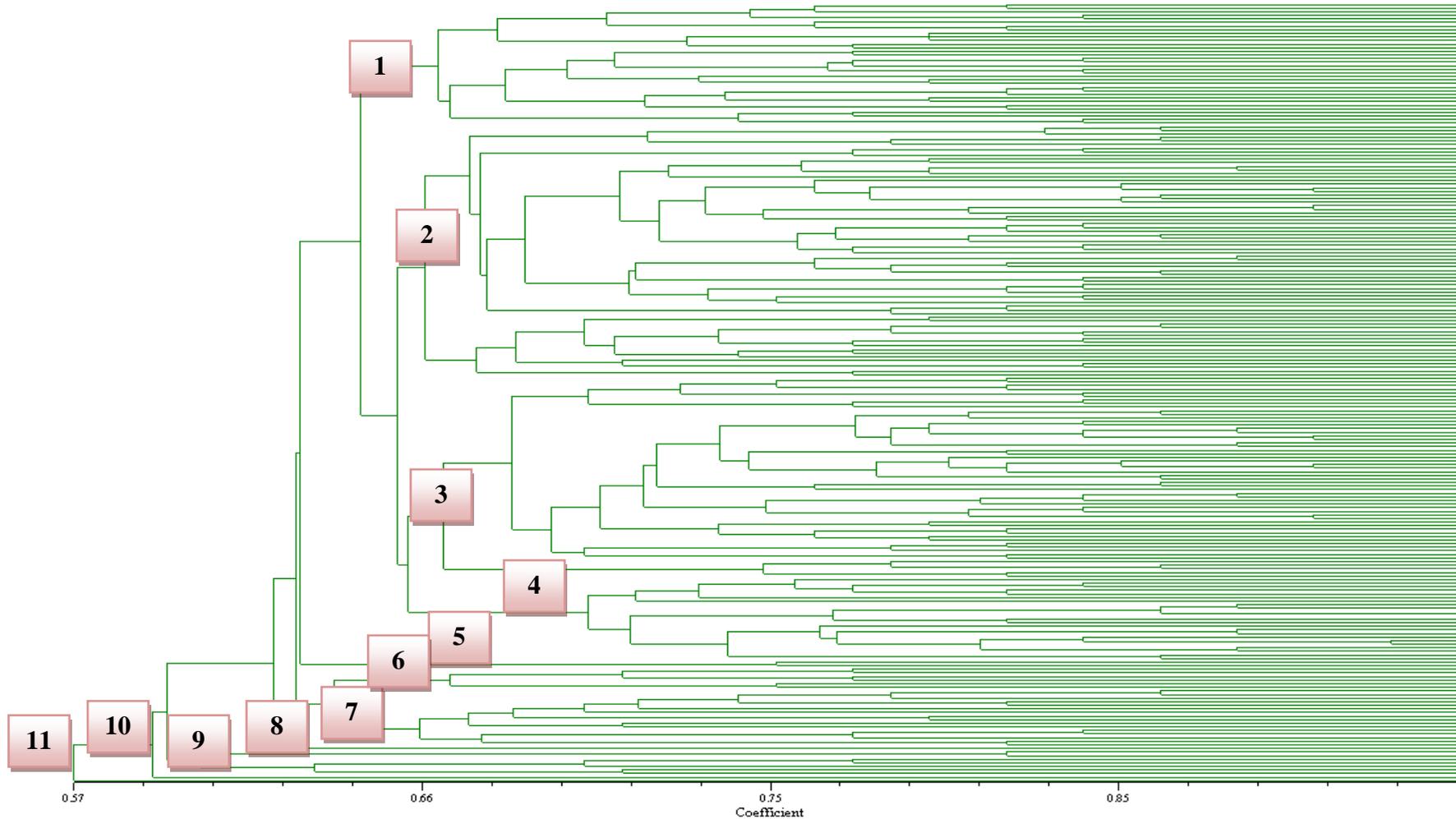
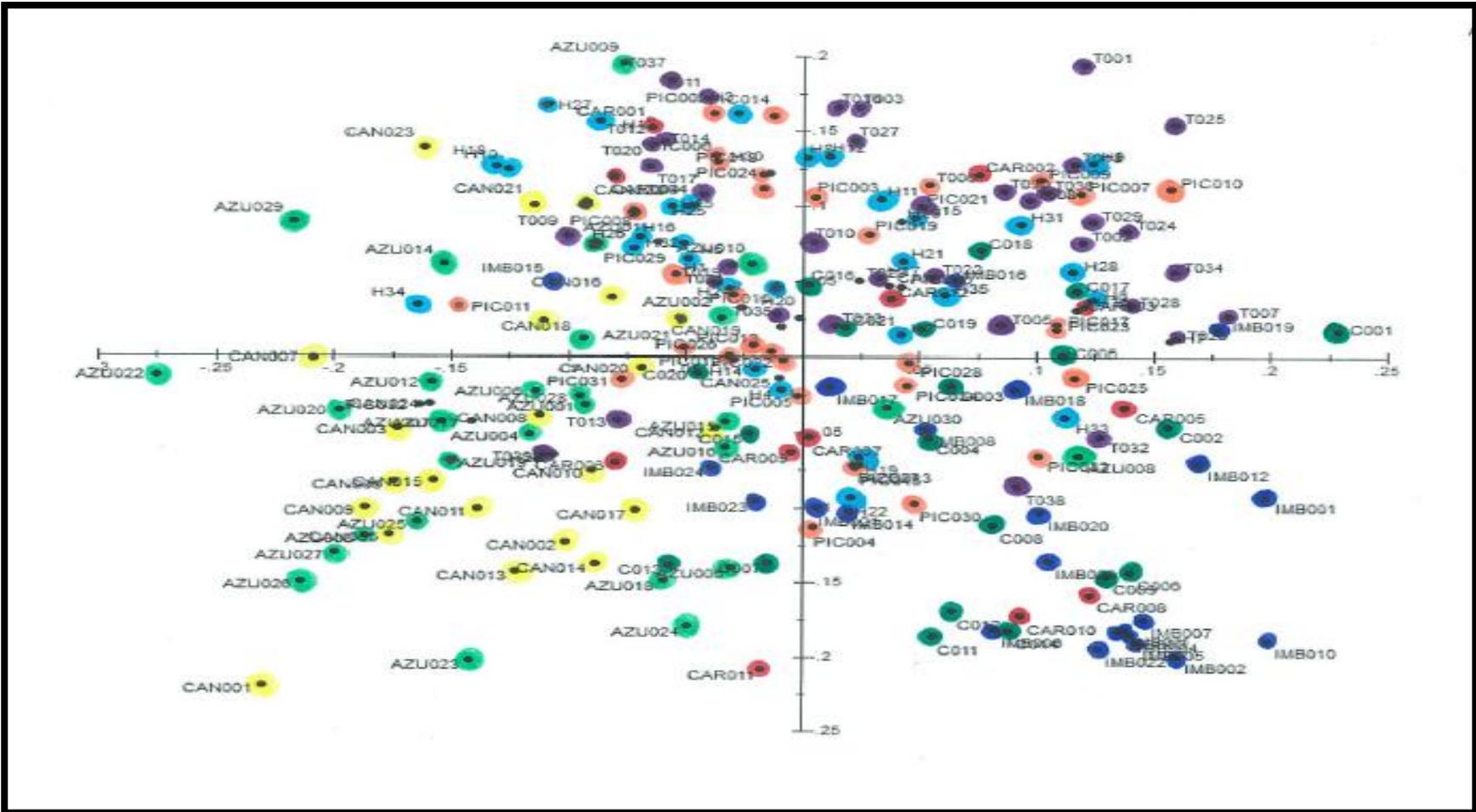


Figura 17. PCoA que muestra relaciones de similitud entre accesiones estudiadas durante la primera y segunda fases de esta investigación: Carchi (color rojo), Imbabura (color azul), Pichincha (color naranja), Cotopaxi (color verde oscuro), Tungurahua (color morado), Chimborazo (color celeste), Cañar (color amarillo), y Azuay (color verde claro).



15 Anexos:

Anexo 1. Registro de las 88 accesiones de *Prunus serotina* subsp. *capulí* provenientes de las provincias de Pichincha, Azuay y Cañar que fueron analizadas durante el presente estudio. Código ASF: accesión sin fruto.

Código	Fecha de colección	Provincia	Lugar	Coordenadas Geográficas	Edad	Estructura de las ramas	Altitud (m.s.n.m)	Grados Brix (fruto)
PIC 002	11-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 0.19"/W 078° 28' 48.3"	Adulto	Erectas	2811	ASF
PIC 003	11-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 02.1"/W 078° 28' 45.3"	Medio	Erectas	2780	ASF
PIC 004	11-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 03.8"/W 078° 28' 42.7"	Adulto	Dispersas	2777	ASF
PIC 005	11-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 08.3"/W 078° 28' 44.3"	Adulto	Dispersas	2789	ASF
PIC 006	11-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 11' 06.4"/W 078° 28' 41.0"	Joven	Dispersas	2799	ASF
PIC 007	21-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 10' 16.5"/W 078° 29' 33.8"	Adulto	Dispersas	2822	ASF
PIC 008	21-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 09' 17.7"/W 078° 29' 29.3"	Joven	Dispersas	2830	ASF
PIC 009	21-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 07' 58.4"/W 078° 30' 00.3"	Joven	Dispersas	2844	ASF
PIC 010	21-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 07' 58.3"/W 078° 30' 01.3"	Adulto	Dispersas	2860	ASF
PIC 011	21-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 07' 59.1"/W 078° 29' 59.6"	Joven	Dispersas	2865	ASF
PIC 012	21-02-12	Pichincha	Quito Norte	S 00° 09' 31.3"/W 078° 28' 52.3"	Adulto	Dispersas	2814	ASF
PIC 013	25-02-12	Pichincha	Quito Sur	S 00° 14' 50.9"/W 078° 31' 21.9"	Joven	Erectas	2834	ASF
PIC 014	25-02-12	Pichincha	Quito Sur	S 00° 14' 40.6"/W 078° 31' 14.9"	Joven	Erectas	2816	ASF
PIC 015	25-02-12	Pichincha	Quito Sur	S 00° 14' 36.7"/W 078° 31' 27.2"	Adulto	Erectas	2777	ASF
PIC 016	25-02-12	Pichincha	Quito Sur	S 00° 14' 44.8"/W 078° 31' 22.5"	Adulto	Dispersas	2810	ASF
PIC 017	14-04-12	Pichincha	La Esperanza	N 00° 02' 21. 2"/W 078° 15' 18.1"	Adulto	Dispersas	2025	ASF
PIC 018	14-04-12	Pichincha	La Esperanza	N 00° 02' 41.3"/W 078° 14' 33.2"	Joven	Dispersas	2906	ASF
PIC 019	14-04-12	Pichincha	Tabacundo	N 00° 02' 46.3"/W 078° 13' 45.7"	Adulto	Dispersas	2889	ASF
PIC 020	14-04-12	Pichincha	Tabacundo	N 00° 03' 12.5"/W 078° 13' 16.4"	Adulto	Dispersas	2920	ASF
PIC 021	14-04-12	Pichincha	Tabacundo	N 00° 02' 34.9"/W 078° 13' 12.4"	Adulto	Dispersas	2858	ASF
PIC 022	14-04-12	Pichincha	Ayora-Cayambe	N 00° 03' 59.3"/W 078° 08' 09.9"	Adulto	Erectas	2829	ASF
PIC 023	14-04-12	Pichincha	Ayora-Cayambe	N 00° 04' 15.0"/W 078° 08' 06.9"	Adulto	Erectas	2841	ASF
PIC 024	14-04-12	Pichincha	Ayora-Cayambe	N 00° 04' 22.4"/W 078° 07' 50.6"	Adulto	Dispersas	2872	ASF
PIC 025	14-04-12	Pichincha	Ayora-Cayambe	N 00° 05' 35.2"/W 078° 06' 39.3"	Adulto	Dispersas	3028	ASF
PIC 026	14-04-12	Pichincha	Ayora-Cayambe	N 00° 04' 04.8"/W 078° 08' 05.5"	Adulto	Erectas	2829	ASF
PIC 027	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 02' 57.8"/W 078° 07' 56.4"	Joven	Dispersas	2905	ASF
PIC 028	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 02' 40.2"/W 078° 08' 37.5"	Adulto	Erectas	2824	ASF
PIC 029	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 02' 09.2"/W 078° 08' 58.7"	Joven	Dispersas	2791	ASF
PIC 030	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 02' 06.2"/W 078° 08' 51.2"	Joven	Dispersas	2806	ASF

Anexo 1. Continuación.

Código	Fecha de colección	Provincia	Lugar	Coordenadas Geográficas	Edad	Estructura de las ramas	Altitud (m.s.n.m)	Grados Brix (fruto)
PIC 031	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 02' 05.9"/W 078° 08' 36.4"	Adulto	Dispersas	2817	ASF
PIC 032	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 02' 09.7"/W 078° 08' 22.4"	Adulto	Dispersas	2849	ASF
PIC 033	14-04-12	Pichincha	Cayambe	N 00° 01' 45.6"/W 078° 08' 06.9"	Adulto	Dispersas	2884	ASF
PIC 034	06-08-10	Pichincha	Cayambe	N 00° 04' 11.3"/ W 078° 15' 84.3"	Adulto	Erectas	2830	ASF
AZU 001	03-03-12	Azuay	Vía a Jadán	S 02° 52' 03.6"/ W 078° 53' 03.6"	Adulto	Dispersas	2527	ASF
AZU 002	03-03-12	Azuay	Vía a Jadán	S 02° 52' 01.9"/ W 078° 53' 01.8"	Adulto	Dispersas	2541	ASF
AZU 003	03-03-12	Azuay	Vía a Jadán	S 02° 51' 25.2"/ W 078° 52' 54.5"	Adulto	Dispersas	2429	20.12
AZU 004	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 18.5"/ W 079° 00' 25.1"	Adulto	Dispersas	2571	ASF
AZU 005	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 09.6"/ W 079° 00' 20.0"	Joven	Dispersas	2595	16.75
AZU 006	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 08.1"/ W 079° 00' 20.7"	Adulto	Dispersas	2612	18.60
AZU 007	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 52' 49.7"/ W 078° 58' 58.2"	Adulto	Dispersas	2508	23.40
AZU 008	04-03-12	Azuay	Gualaceo	S 02° 53' 18.3"/ W 078° 46' 50.1"	Adulto	Erectas	2252	22.90
AZU 009	04-03-12	Azuay	San Antonio	S 02° 56' 15.5"/ W 078° 47' 55.1"	Adulto	Dispersas	2280	ASF
AZU 010	04-03-12	Azuay	San Antonio	S 02° 56' 43.5"/ W 078° 48' 06.3"	Joven	Dispersas	2354	20.40
AZU 011	04-03-12	Azuay	Vía a San Bartolo	S 02° 57' 07.5"/ W 078° 48' 30.4"	Adulto	Dispersas	2398	ASF
AZU 012	04-03-12	Azuay	Vía a San Bartolo	S 02° 58' 07.1"/ W 078° 49' 07.8"	Adulto	Dispersas	2577	22.55
AZU 013	04-03-12	Azuay	Vía a San Bartolo	S 02° 58' 07.2"/ W 078° 49' 08.0"	Joven	Dispersas	2577	14.80
AZU 014	04-03-12	Azuay	San Juan	S 02° 58' 39.4"/ W 078° 49' 01.2"	Joven	Dispersas	2609	23.45
AZU 015	04-03-12	Azuay	San Juan	S 02° 58' 39.9"/ W 078° 49' 00.9"	Adulto	Erectas	2612	15.50
AZU 016	04-03-12	Azuay	San Bartolo	S 02° 59' 13.6"/ W 078° 49' 14.9"	Adulto	Dispersas	2698	25.25
AZU 017	04-03-12	Azuay	San Bartolo	S 02° 59' 13.5"/ W 078° 49' 14.6"	Adulto	Erectas	2700	16.45
AZU 018	04-03-12	Azuay	Camino a Sigsig	S 02° 59' 50.3"/ W 078° 50' 01.6"	Adulto	Dispersas	2691	21.00
AZU 019	04-03-12	Azuay	Camino a Sigsig	S 03° 00' 46.8"/ W 078° 49' 12.7"	Adulto	Dispersas	2482	21.85
AZU 020	04-03-12	Azuay	Chordeleg	S 02° 55' 34.9"/ W 078° 46' 44.0"	Joven	Dispersas	2387	25.50
AZU 021	04-03-12	Azuay	Paute	S 02° 50' 16.4"/ W 078° 45' 52.7"	Adulto	Dispersas	2256	ASF
AZU 022	04-03-12	Azuay	Paute	S 02° 48' 20.2"/ W 078° 45' 06.2"	Adulto	Dispersas	2609	ASF
AZU 023	04-03-12	Azuay	Paute	S 02° 48' 18.4"/ W 078° 45' 02.4"	Adulto	Dispersas	2631	22.00
AZU 024	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 52' 34.1"/ W 078° 56' 27.1"	Joven	Dispersas	2405	ASF
AZU 025	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 20.4"/ W 078° 57' 14.8"	Adulto	Dispersas	2469	ASF
AZU 026	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 52' 53.7"/ W 078° 57' 44.2"	Adulto	Dispersas	2463	ASF
AZU 027	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 52' 53.8"/ W 078° 58' 36.7"	Adulto	Dispersas	2509	20.05
AZU 028	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 14.8"/ W 079° 01' 22.3"	Adulto	Dispersas	2614	23.05
AZU 029	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 20.1"/ W 079° 01' 20.9"	Adulto	Dispersas	2596	18.90
AZU 030	04-03-12	Azuay	Cuenca	S 02° 53' 17.9"/ W 079° 00' 15.8"	Adulto	Dispersas	2596	ASF

Anexo 1. Continuación.

Código	Fecha de colección	Provincia	Lugar	Coordenadas Geográficas	Edad	Estructura de las ramas	Altitud (m.s.n.m)	Grados Brix (fruto)
CAN 001	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 44' 54.9"/ W 078° 51' 02.7"	Joven	Dispersas	2480	23.85
CAN 002	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 44' 54.8"/ W 078° 51' 02.7"	Joven	Dispersas	2481	14.55
CAN 003	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 13.9"/ W 078° 50' 27.8"	Adulto	Dispersas	2546	23.30
CAN 004	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 13.6"/ W 078° 50' 28.2"	Adulto	Dispersas	2542	19.55
CAN 005	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 24.2"/ W 078° 50' 19.3"	Adulto	Dispersas	2577	23.45
CAN 006	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 23.2"/ W 078° 50' 20.1"	Adulto	Dispersas	2575	26.75
CAN 007	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 27.8"/ W 078° 50' 12.9"	Adulto	Dispersas	2597	21.40
CAN 008	03-03-12	Cañar	Sageo	S 02° 43.1' 16.8"/ W 078° 52' 32.6"	Adulto	Dispersas	2576	20.75
CAN 009	03-03-12	Cañar	Biblián	S 02° 42.1' 10.8"/ W 078° 53' 25.6"	Adulto	Dispersas	2733	21.55
CAN 010	03-03-12	Cañar	Biblián	S 02° 42.1' 10.2"/ W 078° 53' 26.6"	Adulto	Dispersas	2734	17.60
CAN 011	03-03-12	Cañar	Biblián	S 02° 41' 57.3"/ W 078° 53' 29.6"	Adulto	Dispersas	2756	18.60
CAN 012	03-03-12	Cañar	Biblián	S 02° 41' 21.0"/ W 078° 53' 24.5"	Medio	Dispersas	2825	ASF
CAN 013	03-03-12	Cañar	Ingapirca	S 02° 34' 05.3"/ W 078° 56' 13.3"	Adulto	Dispersas	3181	ASF
CAN 014	03-03-12	Cañar	Ingapirca	S 02° 32' 20.0"/ W 078° 55' 57.0"	Adulto	Erectas	2980	ASF
CAN 015	03-03-12	Cañar	Ingapirca	S 02° 32' 19.3"/ W 078° 55' 56.9"	Adulto	Dispersas	2990	ASF
CAN 016	03-03-12	Cañar	Ingapirca	S 02° 31' 43.3"/ W 078° 55' 15.4"	Adulto	Dispersas	2872	ASF
CAN 017	03-03-12	Cañar	Parroquia Juncal	S 02° 28' 51.0"/ W 078° 58' 53.6"	Joven	Dispersas	2927	ASF
CAN 018	03-03-12	Cañar	Ingapirca	S 02° 33' 46.3"/ W 078° 56' 30.7"	Adulto	Dispersas	3128	ASF
CAN 019	03-03-12	Cañar	Biblián	S 02° 41' 50.2"/ W 078° 53' 26.8"	Adulto	Dispersas	2780	25.50
CAN 020	03-03-12	Cañar	Biblián	S 02° 43' 22.2"/ W 078° 53' 20.4"	Adulto	Dispersas	2600	20.35
CAN 021	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 25.6"/ W 078° 51' 16.5"	Joven	Dispersas	2513	ASF
CAN 022	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 40.0"/ W 078° 51' 28.6"	Joven	Dispersas	2526	ASF
CAN 023	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 45' 56.4"/ W 078° 51' 38.7"	Adulto	Dispersas	2541	22.70
CAN 024	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 47' 25.2"/ W 078° 52' 04.0"	Adulto	Dispersas	2511	ASF
CAN 025	03-03-12	Cañar	Azoguez	S 02° 48' 09.1"/ W 078° 52' 51.7"	Joven	Erectas	2440	20.30

