

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estandarización de marcadores microsatélites específicos
para *Ilex guayusa* y su aplicación para análisis de diversidad
genética**

Proyecto de investigación

Daniela Estefanía Rojas Kozisek
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación de pregrado presentada como requisito para la
obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 11 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Estandarización de marcadores microsatélites específicos para *Ilex guayusa* y su aplicación para análisis de diversidad genética

Daniela Estefanía Rojas Kozisek

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, PhD.

Firma del profesor:

Quito, 11 de diciembre de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, 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 esas Políticas.

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 del estudiante: _____

Nombre y apellidos: Daniela Estefanía Rojas Kozisek

Código: 00118264

Cédula de Identidad: 1721833398

Lugar y fecha: Quito, 11 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi segunda madre Annelie, a mi hermana Bianka y a mi mamá Erika. Por ser siempre mi fortaleza, mi fuente de amor infinita, mi motivación para siempre seguir adelante y cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

A mi tía Annelie, gracias por todo lo que has hecho por mí, en tantos aspectos, sin ti no sería la persona que soy y nada de lo que he logrado en mi vida hubiera sido posible.

A mi hermana Bianka, por ser mi alma gemela, por darme alegrías, risas y fuerzas en los momentos que más he necesitado. Por siempre ayudarme a creer en mí misma.

A mi mamá Erika, por todo el amor, las enseñanzas y la fe que siempre pones en mí.

A María de Lourdes Torres directora de mi tesis, gracias por sus enseñanzas, su paciencia, su confianza, por abrirme las puertas en este laboratorio y permitirme aprender tanto.

A Jennifer Rowntree por su colaboración con la parte inicial del diseño de los primers microsatélites para guayusa.

A los fondos COCIBA por el financiamiento de este proyecto.

A Nina Espinosa de los Monteros, Bernardo Gutiérrez, Mercedes Cobo, Majo Pozo, Gaby Pozo y Juan Guadalupe por toda su ayuda y guía durante este largo proyecto. A Nina también agradezco por la recolección de las muestras de guayusa.

A los chicos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Darío, Migue, Andre, Ricky, y Ani por todo su apoyo, compañerismo y su linda amistad.

A mis amigos Micaela, Mary, Dominique, María Paula, Sebas, Michu, Pame, Santi y Nathy por todos los momentos compartidos de risas, llantos, estrés, paciencia y amistad durante esta hermosa etapa de mi vida.

RESUMEN

La guayusa, *Ilex guayusa*, es una planta que se encuentra en Ecuador, Perú y Colombia. El consumo ancestral del té de guayusa en comunidades ecuatorianas amazónicas se debe a las propiedades medicinales que se le atribuyen principalmente como energizante, antioxidante y antiinflamatorio. Estos atributos han sido respaldados por investigaciones en las que se han aislado metabolitos de interés en esta especie. Sin embargo, hasta el momento no se conoce en detalle información acerca de su diversidad genética, parámetro importante para establecer programas de manejo y conservación en una especie con tanto potencial. En un estudio preliminar de la diversidad genética de la guayusa se usó marcadores moleculares ISSRs y se concluyó que la guayusa tiene baja diversidad genética. Esto posiblemente se deba a que su reproducción es asexual; los órganos sexuales de la guayusa se encuentran atrofiados y se la cultiva por medio de estacas. Para caracterizar con mayor profundidad la diversidad genética de esta especie se diseñaron 30 marcadores microsatélites específicos para la guayusa. Se analizaron 60 muestras de diferentes individuos provenientes de la provincia de Morona Santiago de los cuales se extrajo su ADN, se realizó las amplificaciones correspondientes y se logró el genotipado de los individuos analizados. Las muestras provenían de tres parroquias: Sinaí, Sevilla Don Bosco y Santa Marianita de Jesús. Se lograron genotipar 29 de los 30 marcadores SSRs y en estos 29 marcadores se encontró una diversidad genética moderada ($He = 0.564$). Mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) se encontró que el 87% de la variabilidad genética de la guayusa proviene de los individuos (intrapoblacional), mientras que el 13% de la variabilidad genética es explicada por las parroquias (interpoblacional). Con respecto al poder informativo de los primers se determinó que 16 de los 29 primers son polimórficos y altamente informativos por el alto número de alelos encontrados (de 3 a 17) y los valores de PIC (superiores a 0.5). Mediante los valores F_{st} , el dendograma obtenido por Neighbor Joining y el PCoA se observa dos agrupaciones: una formada por la parroquia Sevilla Don Bosco y otra formada por las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús. Además, por medio de los análisis en STRUCTURE se observó que existen dos acervos genéticos en la muestra de Morona Santiago (K óptimo de 2): el primer acervo predomina en Sinaí y Santa Marianita de Jesús, mientras que el segundo acervo es predominante en Sevilla Don Bosco. Para comprender mejor los resultados obtenidos, se debe estudiar a profundidad aspectos geológicos, composición del suelo y condiciones ambientales que podrían explicar las agrupaciones encontradas. En esta investigación se reportan por primera vez primers microsatélites específicos para la guayusa y con un análisis de una muestra en Morona Santiago, se determinó que son altamente polimórficos e informativos. Estas herramientas permiten aumentar el conocimiento de la guayusa para poder crear estrategias de un manejo sustentable para su conservación.

Palabras clave: *Ilex guayusa*, Amazonía, Morona Santiago, microsatélites, diversidad genética, conocimiento ancestral.

ABSTRACT

Guayusa (*Ilex guayusa*) is a plant found in Ecuador, Perú and Colombia. The ancestral consumption of its tea in the communities of the Ecuadorian Amazon is due to its medicinal properties such as energy booster, antioxidant and anti-inflammatory. These characteristics have been confirmed in different studies in which different metabolites have been isolated. Nonetheless, to date there is a lack of information about its genetic diversity, a key parameter to establish conservation and management programs in species with great potential. In a preliminary study, genetic diversity in guayusa Ecuadorian populations was assessed using ISSR markers. A low genetic diversity was found possibly due to asexual reproduction. In this species, sexual organs are damaged, and therefore, its dispersion occurs through stakes. In order to better characterize the genetic diversity in this species, 30 microsatellite markers were designed. 60 samples from different individuals from Morona Santiago province were analyzed. Its DNA was extracted, amplified and individuals were genotyped. Samples were collected from three parishes which were the following: Sinaí, Sevilla Don Bosco and Santa Marianita de Jesús. 29 out of 30 SSR markers were successfully genotyped. A moderate genetic diversity was found ($H_e = 0.564$). Through an analysis of molecular variance (AMOVA), it was found that 87% of variance comes from individuals (intra-population), whereas 13% of variations comes from parish (inter-population). In order to evaluate the capacity of the molecular markers, it was established that 16 of the 29 primers were polymorphic and highly informative, because they had high number of alleles (from 3 to 17) and high PIC values (above 0.5). The results of the: F_{st} distances, the Neighbor Joining Dendrogram and the PCoA graphic indicated that it is possible that there are 2 populations in the province. The parish Sinaí and Santa Marianita de Jesús represent the first population, and Sevilla Don Bosco represents the second population. Through an analysis in the software STRUCTURE it was observed that in this sample there are 2 genetic stocks (by a K optimum of 2). The first genetic stock is mainly influencing the parishes Sinaí and Santa Marianita de Jesús, while the second genetic stock is influencing Santa Marianita de Jesús. To get a better understanding of the population structure obtained through these analyses is necessary to carefully study the geology, composition of soil and environmental conditions of the area of study. For the first time microsatellite molecular markers specific to guayusa are reported and by attempting to analyze the genetic diversity of a small sample of Morona Santiago, it was demonstrated that these developed molecular markers are highly polymorphic and informative. These are important tools that are useful to increase the knowledge of the guayusa, in order to create sustainable strategies for its conservation.

Keywords: *Ilex guayusa*, Amazon, Morona Santiago, microsatellites, genetic diversity, ancestral knowledge.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	4
Agradecimientos	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Tabla de contenido.....	8
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	11
Anexo.....	12
1. Introducción.....	13
1.1. Generalidades sobre <i>Ilex guayusa</i>	13
1.2. Uso de esta planta en la Amazonía Ecuatoriana	14
1.3. Metabolitos de la guayusa.....	14
1.4. Importancia y definición de la diversidad genética.....	15
1.5. Conocimiento actual de la diversidad genética de la guayusa	17
1.6. Comparación entre marcadores moleculares SSR y ISSRs.....	18
1.7. Importancia comercial de la guayusa	19
2. Objetivos.....	21
2.1. Objetivo General	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. Área de estudio.....	22
4. Justificación.....	22
5. Materiales.....	24
5.1. Material Vegetal	24
5.2. Extracción de ADN de guayusa	24
5.3. Cuantificación de ADN de guayusa	24
5.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	24
5.5. Amplificación de regiones microsatélites SSR mediante PCR.....	25
5.6. Armado de placas	25
5.7. Genotipado de marcadores microsatélites	25
5.8. Análisis de datos	25
6. Métodos.....	27
6.1. Recolección de muestras.....	27
6.2. Diseño de primers específicos de guayusa	27

6.3.	Extracción de ADN de individuos de guayusa	28
6.4.	Preparación de muestras	28
6.5.	Estandarización de temperatura de annealing de primers de guayusa	29
6.6.	Amplificación y genotipado de primers microsatélites de <i>Ilex guayusa</i>	29
6.7.	Análisis de datos	30
7.	Resultados.....	33
7.1.	Extracción de muestras y cuantificación	33
7.2.	Diseño de primers específicos de guayusa	33
7.3.	Estandarización de primers específicos de guayusa.....	33
7.4.	Genotipado y evaluación del desempeño de los marcadores microsatélites.	34
7.5.	Análisis de datos	35
7.5.1.	Diversidad alélica de la guayusa por marcador microsatélite.....	35
7.5.2.	Diversidad y distancias genéticas entre las 3 parroquias.....	35
7.5.3.	Estructura poblacional	37
8.	Discusión.....	38
8.1.	Diseño y amplificación con primers microsatélites.....	38
8.2.	Genotipado y evaluación de la habilidad informativa de los marcadores	39
8.3.	Distancias genéticas entre las parroquias de recolección de guayusa	42
8.4.	Estructura poblacional de la guayusa en Morona Santiago	44
9.	Conclusiones.....	45
10.	Recomendaciones.....	46
11.	Bibliografía.....	47
12.	Tablas:.....	54
13.	Figuras:.....	57
14.	Anexo:.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: 30 marcadores microsatélites seleccionados de la lista de 353 marcadores generados por el diagrama de flujo descrito en Griffiths <i>et al.</i> , 2016, con sus secuencias forward (F), reverse (R), motivos, tamaño esperado, temperatura de annealing y fluoróforos utilizados.....	54
Tabla 2: Parámetros utilizados para medir la diversidad genética de <i>Ilex guayusa</i> en Morona Santiago. Para cada marcador se calculó el número de alelos (Na), la heterocigosidad esperada (He), la heterocigosidad observada (Ho), contenido de información polimórfica (PIC), radio efectivo múltiple (EMR) y el índice del marcador (MI).....	55
Tabla 3: Parámetros utilizados para medir la diversidad genética de <i>Ilex guayusa</i> en Morona Santiago. En cada localidad se midió el número de individuos muestreados, el número de alelos (Na), el número de alelos privados con corregidos con rarefacción (Npr), el número de alelos privados (Np), la heterocigosidad esperada (He), la heterocigosidad observada (Ho) y la proporción total de alelos encontrados en cada localidad.....	55
Tabla 4: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en los individuos de <i>Ilex guayusa</i> muestreados en Morona Santiago.....	55
Tabla 5: Matriz de distancias genéticas de Weir y Cockerham (Fst) entre individuos de guayusa de 8 localidades.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa de la provincia de Morona Santiago donde se observan los sitios de recolección de los 60 individuos de *Ilex guayusa* en las 3 provincias.....57
- Figura 2:** Análisis de variación molecular (AMOVA) intrapoblacional e interpoblacional.....57
- Figura 3:** Dendograma obtenido mediante el método de Neighbor Joining (NJ) de los 60 individuos de las 3 provincias de *Ilex guayusa* en Morona Santiago.....58
- Figura 4:** PCoA de los individuos de *Ilex guayusa* muestreados en Morona Santiago....58
- Figura 5:** Estructura poblacional obtenida mediante el software STRUCTURE de los 60 individuos de *Ilex guayusa* muestreados en la provincia de Morona Santiago.....59

ANEXOS

- Anexo 1:** 60 individuos de *Ilex guayusa* usados para la estandarización y análisis de diversidad genética y estructura poblacional de los marcadores microsatélites.....**60**
- Anexo 2:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el ADN extraído de *Ilex guayusa* en la provincia de Morona Santiago.....**61**
- Anexo 3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para observar la amplificación de los loci microsatélites mediante el uso del sistema de tres primers a partir de las muestras de ADN de *Ilex guayusa* de Morona Santiago.....**61**
- Anexo 4:** Picos de fluorescencia generados después de la electroforesis capilar analizados en el software GeneMarker.....**62**

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre *Ilex guayusa*

La guayusa *Ilex guayusa* es una planta que pertenece a la familia Aquifoliaceae, la cual cuenta con 600 especies y, específicamente, el género *Ilex* se distribuye a lo largo de América, Asia y Europa, siendo América del Sur una de las áreas con mayor diversidad de especies dentro de este género (Cuénoud *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 2005).

Las plantas pertenecientes al género *Ilex* se caracterizan por tener una considerable diversidad morfológica, ya que pueden presentarse como árboles, arbustos e inclusive, como epífitas. Además, este género presenta plantas funcionalmente deciduas, es decir, su reproducción sexual está comprometida, tanto como por sus pistilos rudimentarios en flores estaminadas, como por sus estambres estériles en flores pistiladas (Gottlieb *et al.*, 2005).

Ilex guayusa se ha registrado que existe en tres países: Colombia, Ecuador y Perú, de los cuales el Ecuador es el que tiene el mayor número de cultivos ancestrales de guayusa (Radice y Vidari, 2007). Su distribución se da desde los bosques andinos bajos hasta los bosques amazónicos entre alturas de 0 a 1500 m.s.n.m. (Loizeau y Barrera, 1999).

En el Ecuador, *Ilex guayusa* se encuentra en todas las provincias de la Amazonía: Sucumbíos, Orellana, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe y Orellana (Radice y Vidari, 2007). Además, se ha observado guayusa en las provincias de Pichicha y Tungurahua (Jorgensen y León-Yáñez, 1999).

La guayusa se caracteriza por ser un árbol perenne que está presente, mayoritariamente, en toda la región Amazónica del Ecuador, sin embargo, fue descrita por primera vez en 1901 en el Perú (Shemluck, 1979). Su tamaño oscila entre los 10 y 20 m, tiene un follaje denso, un tronco de corteza blanca y lisa, hojas coriáceas con distinta morfología: simples

o alternas, enteras, oblongo-elípticas; una flor con corola blanco-verdosa y un fruto en forma de baya globosa (García, 1992). A pesar, de la presencia del aparato reproductor en esta especie, la guayusa se reproduce asexualmente por medio de estacas (Dueñas *et al.*, 2010).

1.2. Uso de esta planta en la Amazonía Ecuatoriana

La guayusa ha sido consumida como planta medicinal desde 500 años d.C. en la región andina amazónica. Se la ingiere como bebida de ritual, debido a que la infusión de hojas de guayusa proporciona: mejor digestión, mejor apetito, fortaleza en el cuerpo, cura para las enfermedades venéreas, incremento de la fertilidad, efecto estimulante, calma para el dolor, repelente, entre otros usos (Dueñas *et al.*, 2010).

Indígenas amazónicos como los Kichwas tienen varias plantas de guayusa cerca de sus casas para tener acceso rápido a sus hojas y preparar sus infusiones diarias (Dueñas *et al.*, 2010). Además de beneficiarse de su aspecto medicinal, la guayusa es una parte importante de las culturas nativas amazónicas ecuatorianas, debido a que la preparación y consumo de ésta fortalece la convivencia entre la comunidad; los hombres de la comunidad comparten anécdotas e historias, mientras que los ancianos y las mujeres interpretan sueños; es decir, se le atribuye también propiedades espirituales (Overing y Passes, 2000). La guayusa también forma parte de la cultura de las etnias Shuar, Achuar, Jíbaros, Cofán, Secoya y Tsa'chi (Descola, 1996; de la Torre *et al.*, 2008).

1.3. Metabolitos de la guayusa

Aunque el conocimiento ancestral sobre la funcionalidad de la guayusa es generalizado, no existen tantos estudios sobre sus características fitoquímicas y biológicas, que permitan relacionar estos dos aspectos: medicina tradicional y aplicaciones farmacéuticas y nutricionales (Radice *et al.*, 2016).

Algunos estudios de carácter químico han logrado concluir que las hojas de guayusa contienen cafeína, teobromina, flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, guanidina, quinonas, glicósidos, aminoácidos, triterpenos, ácido oleanólico, ácido ursólico, extractos etanólicos e hidroalcohólicos, entre otros (Radice *et al.*, 2016; Gan *et al.*, 2018).

La cafeína y teobromina tienen efectos estimulantes y protectores en las células; los compuestos fenólicos y flavonoides también tienen un rol protector en las células en contra de estrés oxidativo; la guanidina tiene un efecto hipoglicémico; los ácidos oleanólicos y ursólicos tienen capacidad antiinflamatoria y antiviral; mientras que los extractos etanólicos tienen actividad estrogénica (Radice *et al.*, 2016). Todos estos metabolitos explican de forma científica cada una de las propiedades atribuidas al consumo de la guayusa del conocimiento ancestral de las comunidades indígenas amazónicas.

Cabe recalcar la importancia de esta planta, que se dice que tiene mayor actividad antioxidante que el té verde y más cafeína que el café (ProEcuador, 2013). Se ha comprobado que la guayusa tiene el mismo poder antioxidante que la yerba mate y el té. En este estudio se ha aislado e identificaron los distintos tipos de fenoles y carotenoides de la guayusa y se determinó que su consumo regular tiene efectos positivos para la salud (García *et al.*, 2017).

1.4. Importancia y definición de la diversidad genética

La diversidad genética es la variación en secuencias de ADN entre individuos de una población, especies o entre varias poblaciones (Ellegren y Galtier, 2016). Esta diversidad se puede o no reflejar en diferencias fenotípicas, pero sí es evidenciable en diferencias genéticas (Hughes *et al.*, 2008). La riqueza en diversidad genética otorga a los organismos la capacidad de responder a cambios ambientales, lo cual en plantas influye directamente en estrategias de mejoramiento o conservación de especies en peligro (Hake y Ross, 2015;

Ellegren y Galtier, 2016). En contraste, la pérdida de la variabilidad genética ocasiona vulnerabilidad en las especies con respecto a cambios repentinos del ambiente y, también a pestes y enfermedades. Por estas razones es de gran importancia conocer la diversidad genética en las especies, con el fin de conocer el estado de una población y en base a esto dar un uso sustentable a estos recursos genéticos y conservarlos (Esquinas, 2005).

Existen fenómenos tales como: mutaciones en las secuencias de ADN, selección natural, deriva génica o flujo de genes por medio de migraciones que son algunos factores responsables de generar polimorfismo o diversidad genética (Ramanatha y Hodgkin, 2002). No obstante, fluctuaciones ambientales, brotes de plagas y las actividades humanas afectan significativamente el estado de diversidad genética (Ellegren y Galtier, 2016).

La diversidad genética se puede caracterizar con herramientas que evidencien la variabilidad a manera de alelos discretos o como caracteres continuos, por lo ende, existen diferentes métricas para la diversidad genética (Hughes, 2008). En el caso del análisis del número o frecuencia de alelos discretos, que se definen como el número de formas alternativas de un locus, los marcadores moleculares son una herramienta ampliamente utilizada por su uso relativamente sencillo y barato (Klug *et al.*, 2009). Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN polimórfico que tienen: una posición específica dentro del genoma y patrones de expresión reconocibles (Cuberos, 2002). Para realizar análisis de diversidad genética se caracterizan los alelos y se determina niveles de heterocigosidad y eficacia biológica, los cuales están relacionados directamente con el estado de vulnerabilidad de una especie (Reed *et al.*, 2003).

El conocimiento de la diversidad genética puede ser la base para emprender programas de mejoramiento y conservación a través de bancos de genes y reservorios naturales.

1.5. Conocimiento actual de la diversidad genética de la guayusa

A pesar del alto potencial de la guayusa, esta planta no ha sido ampliamente estudiada y por ahora se desconoce su estado de conservación y sus características genéticas. Se sabe que su hábitat se ha reducido considerablemente debido a la deforestación y degradación de bosques, suelos y aguas amazónicos a causa de las actividades humanas en industrias petroleras, agrícolas, madereras, etc. (López *et al.*, 2013).

Existe un solo estudio preliminar de la diversidad genética de la guayusa. En este se usaron marcadores moleculares ISSR (inter simple sequence repeats) en 157 individuos de guayusa en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Se encontró una heterocigosidad esperada de 0.19 y se determinó que existe una baja diversidad genética de esta planta. Sin embargo, los autores explicaron que los resultados pudieron tener influencia por un sesgo en el muestreo y relacionaron su baja diversidad genética con la propagación clonal de la guayusa (Torres *et al.*, 2017).

Pese a que no existen más estudios en guayusa, hay algunos estudios de diversidad genética en plantas emparentadas. En *Ilex paraguariensis*, conocida con el nombre vernáculo de yerba mate, han existido varias investigaciones de diversidad genética. Una fue realizada en Brasil con marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) en donde se encontró una baja diversidad (Gauer y Cavalli-Molina, 2000); en otro estudio del 2013 en Brasil se diseñaron y probaron marcadores SSR (simple sequence repeats) y se encontró una alta diversidad genética (Pereira *et al.* 2013); y en una investigación de Uruguay usando los mismos marcadores SSRs desarrollados por Pereira *et al.*, 2013 se encontró una alta diversidad genética de la población analizada de yerba mate (Cascales *et al.*, 2014).

Lo que se puede rescatar de estos estudios, es que ha existido una tendencia al uso de microsatélites, debido a sus ventajas posteriormente descritas. Aunque una limitación de este tipo de marcador molecular es el costo de su diseño inicial, con estos estudios en países con limitaciones económicas como el Ecuador, se ha optado por desarrollar marcadores microsatélites homólogos, ya que, con el avance de la tecnología, los costos de secuenciamiento para formar bibliotecas genómicas de microsatélites han disminuido, y se quiere optar por el uso de marcadores más específicos y, por ende, confiables (Azhar *et al.*, 2017).

1.6. Comparación entre marcadores moleculares SSR y ISSRs.

Tradicionalmente, la identificación de plantas se realizaba por caracterización morfológica. No obstante, esto se puede considerar como un método subjetivo debido a que individuos que son genéticamente distintos pueden compartir características morfológicas. Además, las características morfológicas pueden cambiar debido a condiciones ambientales. Se considera que la información que se puede obtener por medios moleculares otorga mayor evidencia para la clasificación en plantas (Soltis y Soltis, 1995). Las características que son de interés agrícola como resistencia a estrés ambiental como salinidad, acidez o resistencia a plagas, no son distinguibles por este método de categorización; por ende, se recalca la importancia del uso de marcadores moleculares (Azhar *et al.*, 2018).

Existen dos tipos de marcadores moleculares según el método de análisis: los basados en hibridación y los basados en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Semagn *et al.*, 2006).

Los marcadores moleculares basados en amplificación por PCR, dentro de los cuales se encuentran los ISSR y los SSR, tienen las siguientes ventajas: requieren una cantidad de ADN inicial baja, no requieren de sondas radioactivas, su metodología es accesible y fácil, detectan

muchos locus porque se diseñan a partir de regiones polimórficas de ADN (Semagn *et al.*, 2006; Azhar *et al.*, 2018).

Los marcadores ISSR y SSR se basan en polimorfismos de regiones entre y dentro de microsatélites que son regiones de ADN no codificante que tienen secuencias de 2, 3, 4 y hasta 6 pares de bases repetidas en tándem, por lo tanto, los alelos de microsatélites se originan por distinto número de repeticiones. La diferencia de ambos marcadores es que los ISSR amplifican entre regiones de microsatélites, mientras que los SSR amplifican directamente la región del microsatélite, por lo tanto, la ventaja de los ISSR frente a los SSR es que no necesitan de conocimiento de la secuencia, son simples, rápidos y muestran grandes niveles de polimorfismo. Sin embargo, tienen herencia dominante, es decir, no permiten diferenciar entre condición homocigota y heterocigota y su reproducibilidad no es tan buena (Semagn *et al.*, 2006; Azhar *et al.*, 2018).

Los marcadores SSR son específicos para cada especie, son más sensibles y su reproducibilidad es mejor, además, son codominantes. La principal limitante del uso de estos marcadores es el tiempo y dinero necesarios para generar una librería de regiones microsatélites (Semagn *et al.*, 2006). En el caso de este estudio esto no fue un limitante ya que se realizó una colaboración para el secuenciamiento y construcción de librerías de microsatélites de la Universidad Metropolitana de Manchester. Con esto se considera factible el uso de este tipo de marcadores para establecer índices de diversidad genética en la guayusa de la Amazonía ecuatoriana.

1.7. Importancia comercial de la guayusa

Gracias a los efectos estimulantes y medicinales de la guayusa, esta ha sido comercializada en EE. UU. desde el 2010, y la empresa Runa ha realizado convenios con los productores indígenas de la Amazonía en la que se han establecido precios estables por libra de hojas

(Alvarado, 2016). Esto representa una ventaja en comparación a otros cultivos de la Amazonía como son el café y el cacao que tienen precios volátiles, y que también están sufriendo de mayor presión por fitoenfermedades y su cosecha es periódica. En contraste la cosecha de la guayusa es constante y se han establecido precios fijos de este cultivo (Krause y Ness, 2017).

Además, se le da un valor adicional a la guayusa porque se cultiva orgánicamente, sin el uso de pesticidas o fertilizantes (Alvarado, 2016).

En los últimos años se ha difundido las propiedades medicinales y nutricionales de la guayusa. Esto ha generado que desde el 2010 existan empresas dedicadas a la exportación y comercialización de la guayusa en el mercado estadounidense. Inclusive, se reporta que el 90% del procesamiento de la guayusa ocurre en el extranjero (Krause y Ness, 2017). Siendo la guayusa un recurso biológico ecuatoriano y el conocimiento ancestral perteneciente a los indígenas amazónicos, es necesario incentivar la investigación nacional, para que los beneficios de estas investigaciones se queden dentro del país.

Debido al gran potencial de la guayusa, tomando en cuenta su gran cantidad de componentes bioactivos y al estado general de desconocimiento de esta planta ancestral, el presente trabajo busca incrementar el conocimiento que se tiene de la misma y para esto se sintetizaron y estandarizaron 30 pares de marcadores microsátélites para *Ilex guayusa* con el fin de entender preliminarmente el estado de la diversidad genética en una muestra de 60 individuos de la provincia de Morona Santiago.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Estandarizar y evaluar nuevos marcadores moleculares microsatélites SSRs específicos de guayusa (*Ilex guayusa*).

2.2. Objetivos Específicos

- a) Seleccionar y sintetizar 30 pares de marcadores microsatélites específicos para *Ilex guayusa* a partir de las secuencias correspondientes a microsatélites obtenidas mediante el secuenciamiento del genoma de la guayusa.
- b) Estandarizar un protocolo de amplificación para los marcadores seleccionados y evaluar la calidad de su amplificación.
- c) Seleccionar y analizar el nivel de polimorfismo de los marcadores microsatélites SSRs estandarizados para utilizarlos en estudios posteriores de diversidad genética.
- d) Analizar preliminarmente la diversidad genética y estructura poblacional en una muestra de 60 individuos de guayusa pertenecientes a la provincia de Morona Santiago para determinar la funcionalidad de los marcadores microsatélites diseñados.

3. ÁREA DE ESTUDIO

Para desarrollar esta investigación se usaron muestras de ADN extraídas a partir de hojas de guayusa recolectadas en 3 parroquias de la provincia de Morona Santiago: Sinaí, Sevilla Don Bosco y Santa Marianita de Jesús (Figura 1). El área de recolección de la muestra fue de 493 km² lo cual representa casi el 2% del total de la superficie de la provincia (25690 km²). Las muestras de guayusa recolectadas provenían en su gran mayoría de cultivos familiares en casas (Sinaí y Santa Marianita de Jesús) y algunas en chacras de comunidades indígenas (Sevilla Don Bosco). De cada individuo se recolectó de 4 a 10 hojas y se obtuvieron hojas de un total de 100 individuos. Estas hojas fueron almacenadas a -20 °C, se extrajo su ADN, el cual fue utilizado posteriormente para este estudio realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. El análisis de genotipado mediante electroforesis capilar se realizó en MACROGEN INC, Corea del Sur.

4. JUSTIFICACIÓN

Ecuador se considera como uno de los lugares con mayor biodiversidad del mundo, esa biodiversidad representa una cantidad intangible de recursos biológicos. La guayusa debe considerarse como una prioridad en la investigación científica, debido a que es de importancia cultural para varias comunidades indígenas amazónicas. Además, tiene un enorme potencial económico gracias a su composición rica en compuestos activos que le otorgan propiedades medicinales y nutricionales. Esto la hace candidata como una fuente de sustento importante para las familias de las comunidades indígenas amazónicas ecuatorianas (Bass *et al.*, 2010; Alvarado, 2016). Para tomar decisiones informadas de su manejo y conservación es esencial tener información sobre la variabilidad y estructura genética de la especie (Harding y Benson, 2013). Esto es de extrema importancia por la manera actual de cómo se propaga la guayusa, es

decir, por propagación clonal, lo cual en unos años podría significar la pérdida de la especie por los cambios climáticos que provocaran alteraciones en la distribución, tiempos de reproducción, composición de las comunidades vegetales, en los ecosistemas y tasas de extinción mayores (Rao y Shatpit, 2013).

Es necesario enfatizar la relevancia de estar preparados para estos efectos, y esta prevención viene justamente de conocer la diversidad genética: los recursos que permitirán resistir a estrés biótico y abiótico (Rao y Shatpit, 2013).

Hasta el momento solo se ha realizado un estudio que analiza la diversidad genética de la guayusa, en el cual se usaron marcadores ISSRs que no son específicos para la guayusa (Torres *et al.*, 2017), por lo tanto, los resultados de esta investigación pueden no ser lo más confiables.

Dentro de la realidad tecnológica y económica del Ecuador, el desarrollo y uso de herramientas moleculares efectivas, reproducibles, confiables y fáciles de usar como son los microsatélites específicos para la guayusa es uno de los primeros pasos para primero tener información robusta y confiable sobre la diversidad genética y por medio de esta establecer estrategias factibles para su cultivo sustentable y su conservación.

5. MATERIALES

5.1. Material Vegetal

Hojas de 100 individuos de *Ilex guayusa* recolectados en 3 parroquias de la provincia de Morona Santiago (Anexo 1).

5.2. Extracción de ADN de guayusa

- Hojas de individuos de guayusa.
- Nitrógeno líquido.
- Cama de arena Multi-Block Heater (Thermo Scientific).
- Termómetro.
- Sorbona (BIOBASE).
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).
- Buffer de extracción CTAB 2X.
- Cloroformo alcohol isoamílico 24:1.
- Alcohol isopropílico al 100 % (Merck).
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO).
- Tris base 10 mM, EDTA, 1 mM, pH: 8 (TE).
- 2 β -mercaptoetanol (Bio-Rad).
- Etanol 70%

5.3. Cuantificación de ADN de guayusa

- ADN extraído de la guayusa.
- Nanodrop 100 (Thermo Scientific).
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO).

5.4. Electroforesis en geles de agarosa

- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO).
- UltraPure™ Agarose (Invitrogen).
- TBE 1 X (Tris-base-Ácido Bórico-EDTA).
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen).

- Blue Juice 10 X Loading Buffer (Invitrogen).
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen).
- Cámara de electroforesis Enduro Gel WL (Labnet International).
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BioRad).

5.5. Amplificación de regiones microsatélites SSR mediante PCR

- ADN diluido de *Ilex guayusa* 100 ng/μl
- 30 pares de primers SSR específicos para guayusa (Tabla 1).
- Taq DNA polimerasa Platinum 5U/μl (Invitrogen).
- Buffer PCR 10 X (Invitrogen).
- BSA 10 mg/ml (Thermo Fisher Scientific)
- MgCl₂ 50 mM (Invitrogen).
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO).
- dNTP's 10 mM (Invitrogen).
- Cola universal A (5' GCCTCCCTCGGCCA) marcada con distintos fluoróforos (6FAM, NED, PET, VIC) (Invitrogen) (Blacket *et al.*, 2012)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).
- T100 Thermocycler (BioRad).

5.6. Armado de placas

- MicroAmp® Optima 96-well Reaction Plate (Invitrogen).
- MicroAmp®8-Cap Strip (Invitrogen).

5.7. Genotipado de marcadores microsatélites

- ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems ®).
- GeneMarker ® v2. 6. 3 (SoftGenetics LLC, 2014).

5.8. Análisis de datos

- GenAlex v6. 5 (Peakall y Smouse, 2012).
- Microsoft Excel 2010 ®.
- Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012).
- Software HP-RARE v1. 1 (Kalinowski, 2005).

- Software MEGA v7. 0 (Kumar *et al.*, 2008).
- Software PGDSpider v2. 1. 0. 3. (Lischer y Excoffier, 2012).
- Software R Studio (R CoreTeam, 2013).
 - Paquetes ade4 (Dray y Dufour, 2007).
 - Paquete adegenet (Jombart *et al.*, 2018).
 - Paquete ape (Paradis *et al.*, 2004).
 - Paquete diveRsity (Keenan *et al.*, 2013).
 - Paquete hierfstat (Goudet y Thibaut, 2015).
 - Paquete genepop (Rousset, 2008).
 - Paquete pegas (Paradis, 2010).
 - Paquete polysat (Clark y Jasienjuk, 2011).
 - Paquete poppr (Kamvar *et al.*, 2013).
- Software STRUCTURE 2.3.4. (Pitchard *et al.*, 2000).

6. MÉTODOS

6.1. Recolección de muestras

Se realizó una salida de campo en octubre del 2016 en la provincia de Morona Santiago. Se recolectaron 4-10 hojas de un total de 100 individuos de *I. guayusa*. Los individuos provienen de las parroquias urbanas de Sinaí y Santa Marianita de Jesús y de la parroquia rural conformada por comunidades indígenas de Sevilla de Don Bosco. Estas tres parroquias están separadas al menos 10 km entre ellas. Las hojas se recolectaron de cultivos familiares de casas y de chacras de las comunidades. De cada individuo se tomaron los datos de las coordenadas mediante un GPS y se almacenaron las hojas en fundas Ziploc, se mantuvieron en coolers con hielo y cuando llegaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ se pusieron en congelación a -20 °C.

6.2. Diseño de primers específicos de guayusa

Gracias a la colaboración con Jennifer Rowntree, Universidad Metropolitana de Manchester, un individuo *I. guayusa* fue secuenciada mediante la plataforma de secuenciación profunda bidireccional (pair-end sequencing) MiSeq (Illumina, San Diego, California). Las lecturas fueron filtradas por el programa *Trimmomatic* y recortadas utilizando la función sliding window con threshold de 20. Después, los loci microsatélite y sus regiones flanqueantes fueron identificados mediante el programa *PAL finder v.0.02*. En este programa se realizó el diseño de los primers en base a las recomendaciones del protocolo del kit Type-it Microsatellite PCR kit (Qiagen, Germany), que incluía pares de bases óptimas entre 20-30, 40-60% de contenido de CG, temperatura de melting (T_m) óptima de 62 °C, con un rango entre 59 °C y 65 °C, y una diferencia máxima de T_m de 3 °C entre primer forward y reverse. *PAL finder v.0.02* fue configurado para buscar como mínimo 8 unidades repetidas en cada locus microsatélite, variando entre motivos de dos a seis nucleótidos. De la lista generada de loci microsatélites se

seleccionaron 30 marcadores con motivos de 2 y 3 nucleótidos. Se estableció un número de 30 marcadores moleculares para analizar una importante proporción del genoma de la guayusa. También cabe recalcar que durante el secuenciamiento hubo problemas, por lo que solo se generaron marcadores de motivos 2 y 3 pares de bases nitrogenadas. Se sintetizaron sets de primers para estos 30 loci, para los cuales en los primers forward se incluyó la secuencia denominada Cola A (Tail A) propuesta por Blacket *et al.*, 2012, para lograr incorporar el fluoróforo durante el proceso de amplificación mediante PCR. Además, se calcularon los tamaños esperados de los productos amplificados mediante el software MEGA v7. 0 (Kumar *et al.*, 2008) al concatenar las secuencias de los primers forward y reverse.

6.3. Extracción de ADN de individuos de guayusa

El ADN de los individuos se extrajo utilizando el protocolo que utiliza buffer CTAB (Shagai *et al.*, 1984) con ciertas modificaciones para la guayusa. Estas modificaciones consistían en aumentar el tiempo de centrifugación inicial a 30 minutos y en dejar a las muestras en congelación durante 20 minutos, antes de la precipitación con alcohol isopropílico.

Se resuspendieron las muestras en 50 µl de H₂O de PCR y fueron posteriormente almacenadas a -20°C.

6.4. Preparación de muestras

El ADN obtenido de los 100 individuos de guayusa fue cuantificado mediante espectrofotometría en un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Las muestras fueron diluidas a una concentración de 100 ng/µl.

Como control de calidad e integridad, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5% del ADN extraído de los 100 individuos. Se corrieron los geles durante 1 hora a 80 V.

Para este proyecto de investigación se seleccionaron 60 de los 100 individuos recolectados (Anexo 1) según criterios de distribución geográfica, calidad y concentración de ADN.

6.5. Estandarización de temperatura de annealing de primers específicos de guayusa

Se realizó la estandarización de la temperatura de annealing de los 30 pares de primers microsatélites con pruebas iniciales con 3 individuos utilizando las condiciones de amplificación descritas por Blacket *et al.*, (2012) con ciertas modificaciones como la adición de buffer BSA y la modificación de la concentración final del primer forward y del MgCl₂. En cada reacción se utilizó un volumen total de 10 µl que contenían 4.95 µl de H₂O de PCR, 1 µl de Buffer de PCR 1X (Invitrogen, California, USA), 1 µl de BSA 10 ml/mg, 0.5 µl MgCl₂ 2 mM (Invitrogen, California, USA), 0.15 µl de primer forward con cola universal 10 µM, 0.5 µl de primer reverse 10 µM, 0.5 µl de primer marcado con fluoróforos 10 µM (6FAM, VIC, PET o NED), 0.2 µl de dNTP's 50 mM, 1 µl de Taq polimerasa Platinum 5U/ µl (Invitrogen, California, USA) y 1 µl de ADN de 100 ng/µl. El programa de amplificación consistía en 35 ciclos con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 15 minutos, 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 90 segundos de annealing a temperaturas desde 54 °C hasta 68 °C, 1 minuto de extensión a 72 °C y 5 minutos de elongación final a 72 °C. Se utilizó el termociclador T100 BioRad para las amplificaciones.

Se corrieron los productos amplificados en geles de agarosa al 1.5% y se realizó la electroforesis a 100 V durante 30 minutos.

6.6. Amplificación y genotipado de primers microsatélites específicos para *Ilex guayusa*

Después de la estandarización de la temperatura de annealing de los 30 pares de primers microsatélites (Tabla 1), se amplificaron 60 individuos de guayusa con el siguiente protocolo

de amplificación: por cada reacción se utilizó un volumen total de 30 μl que contenían 16.65 μl de H_2O de PCR, 3 μl Buffer de PCR 1X (Invitrogen, California, USA), 3 μl BSA 10 ml/mg, 1.8 μl MgCl_2 50 mM (Invitrogen, California, USA), 0,75 μl de primer forward con cola universal 10 μM , 1.5 μl de primer reverse 10 μM , 1.5 μl de primer marcado con fluoróforos 10 μM (6FAM, VIC, PET o NED), 0.6 μl de dNTP's 10 mM, 0.2 μl de Taq polimerasa Platinum 5U/10 μl (Invitrogen, California, USA) y de 1 μl ADN de 100 ng/ μl .

Debido a que se obtuvieron individuos sin picos identificables en el genotipado, se decidieron realizar modificaciones en el programa de amplificación como aumentar el número de ciclos y prolongar el tiempo de extensión.

Por lo anteriormente explicado, el nuevo programa de amplificación consistía en 55 ciclos con una desnaturalización inicial a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos, 30 segundos de desnaturalización a 94 $^{\circ}\text{C}$, 90 segundos de annealing estandarizada de cada primer (Tabla 1), 2 minutos de extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ y 5 minutos de elongación final a 72 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó el termociclador T100 BioRad para las amplificaciones.

Para comprobar que la amplificación fue exitosa se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1.5% durante 30 minutos a 100 V. Se mezclaron 5 μl de producto de PCR con 2 μl de Blue Juice 10 X (Invitrogen). Además, se utilizó 1 μl de Ladder 100 pb.

Los productos de las amplificaciones se enviaron a MACROGEN INC. (Corea del Sur) para que ser genotipados mediante electroforesis capilar con el sistema ABI 3730XL (Applied Biosystems, California, USA).

6.7. Análisis de datos

Para la identificación de alelos generados por la electroforesis capilar se utilizó el programa GeneMarker $\text{\textcircled{R}}$ v2. 6. 3. Con los datos de los 60 individuos de guayusa de Morona Santiago

amplificados con los 29 pares de primers SSRs se construyó una matriz diploide codominante con cada par de alelos (en pb) por cada locus.

Se establecieron como poblaciones a las parroquias donde se realizó el muestreo: Sinaí, Sevilla Don Bosco y Santa Marianita de Jesús. Cabe recalcar que cada una de estas parroquias están separadas al menos 10 km entre ellas.

La conversión de formatos de la matriz diploide de alelos para que esta pueda ser utilizada por cada uno de los softwares usados se la realizó con PGDSpider v2. 1. 0. 3. (Lischer y Excoffier, 2012).

Los datos de diversidad genética por locus y población (número de alelos, heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o), contenido de información polimórfica (PIC), radio efectivo múltiple (EMR) y el índice del marcador (MI) fueron analizados en el programa R Studio (RStudio Team, 2015). Los análisis de distancias genéticas de Weir y Cockerham F_{st} (Weir y Cockerham, 1984), el análisis de componentes principales (PCoA), el dendograma mediante el método Neighbor Joining (Felsenstein y Kuhner, 1994) se hicieron con el programa R Studio (R CoreTeam, 2013).

Para determinar el número de alelos privados se utilizó el software HP-RARE v1. 1, el cual sirve para corregir la falta de homogeneidad en el número de individuos por cada parroquia para evitar que las diferencias encontradas sean a causa de los distintos tamaños de las parroquias. El software pide un número de “genes” para analizar los alelos con rarefacción y este se determina como el número de individuos muestreados en la parroquia con la muestra más pequeña. Se estableció un número de 16 “genes” por cada parroquia (en Santa Marianita de Jesús se recolectaron hojas de 8 plantas de guayusa, y cada una de estas representa dos “genes”). Con esto se pudo calcular correctamente el número de alelos y alelos privados en cada parroquia (Kalinowski, 2005).

El análisis de estructura poblacional se realizó mediante el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) que utiliza inferencia bayesiana. Se realizó una corrida preliminar de los datos con un número posible de linajes de los individuos analizados (K) entre K=1 y K=10 con 10 iteraciones, 10000 pasos de burn-in y 100000 pasos de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Con los resultados de esta corrida inicial, se subieron los resultados a la plataforma en línea Structure Harvester (Evanno *et al.*, 2005) para determinar el número de linajes por medio del valor óptimo del ΔK . Con este valor de K óptimo se volvió a hacer otra corrida de los datos obtenidos de la primera corrida en STRUCTURE con valores de K de 1 a 2 (ya que 2 fue el K óptimo) con 20 iteraciones, con 1000000 pasos de burn-in y 1000000 pasos de MCMC.

Finalmente, se utilizó la herramienta GenAlex v6. 5 (Peakall y Smouse, 2012) para realizar el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

7. RESULTADOS

7.1. Extracción de muestras y cuantificación

Se logró extraer ADN de 100 individuos de *Ilex guayusa* recolectadas en la provincia de Morona Santiago. Mediante la cuantificación se determinó que el ADN tenía buena calidad y las concentraciones de los individuos oscilaban entre 122 ng/ μ l a 4713 ng/ μ l (Anexo 1). Además, se garantizó la buena calidad e integridad del ADN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Anexo 2).

7.2. Diseño de primers específicos de guayusa

Se identificaron 353 locus de microsatélites con regiones flanqueantes mediante el uso de *PAL_finder v.0.02*, de estos locus se encontraron 5 loci microsatélites con motivos de trinucleótidos y 348 loci con dinucleótidos.

A partir de estos, se seleccionaron 30 marcadores SSR: los 5 con motivos de tri-nucleótidos y los 25 restantes con motivos de dinucleótidos se seleccionaron al azar, debido a que no había ninguna diferencia en criterios de calidad. Las longitudes de los primers son de 21 a 30 pb y a cada primer forward se le incorporó la cola universal (tail A) en el extremo 5' (Blacket *et al.*, 2012).

7.3. Estandarización de primers específicos de guayusa

Se probó los 30 pares de primers seleccionados para la guayusa y se logró estandarizar un protocolo de amplificación exitosa con 30 de éstos (Tabla 1). Se logró amplificar el 100% de los primers.

7.4. Genotipado y evaluación del desempeño de los marcadores microsatélites de la guayusa.

Se logró genotipar 60 individuos de guayusa con 29 pares de primers SSRs diseñados para la especie. Esto corresponde a un porcentaje de 96% de eficiencia en el genotipado. El único primer en el que no se logró genotipar fue el primer GYS01, a pesar de mostrar amplificación exitosa con todos los individuos, no se generaron picos de fluorescencia analizables en la electroforesis capilar. En el Anexo 3A se observa los productos de la amplificación con el primer GYS01 y sus respectivos resultados del genotipado Anexo 4A. En contraste, se observa los productos de la amplificación exitosa con el primer GYS20 en el Anexo 3B y los resultados del genotipado de estas reacciones en las que se pueden identificar un alelo claramente en el Anexo 4B.

Se encontró de 2 a 17 alelos por marcador (con un promedio de 6.034 alelos por locus) y un total de 175 alelos (Tabla 2). El primer GYS17 fue el que presentó más alelos (17). Los primers: GYS04, GYS06, GYS10, GYS15, GYS16, GYS19, GYS27 y GYS29 presentaron únicamente 2 alelos. Además de evaluar el número de alelos por cada marcador, para establecer que tan informativos fueron los 29 primers se tomaron en cuenta los índices de PIC, EMR y MI. El índice PIC permite establecer la habilidad de un marcador en establecer niveles de polimorfismo según el número de alelos encontrados y las frecuencias de éstos. Además, los índices EMR y MI son parámetros estadísticos que permiten medir la eficiencia y utilidad, respectivamente, de marcadores moleculares (Chesnokov y Artemyeva, 2015).

En el set de 29 primers microsatélites con una muestra de 60 individuos de Morona Santiago se obtuvo valores de PIC desde 0.033 hasta 0.844, valores EMC desde 0.023 hasta 1.286 e índices de MI desde 0.001 hasta 1.036 (Tabla 2). Considerando todos estos parámetros previamente mencionados se determinó que 16 marcadores microsatélites del total del set de

19 marcadores resultaron ser informativos y polimórficos. Ya que con estos marcadores se identificaron más de 3 alelos y estableció valores altos de PIC, EMR y MI (GYS02, GYS03, GYS07, GYS08, GYS09, GYS11, GYS12, GYS13, GYS17, GYS20, GYS21, GYS22, GYS23, GYS25, GYS26 y GYS28). Los 13 marcadores microsatélites restantes se los considero como los menos informativos por presentar menos de 3 alelos y valores de PIC, EMR y MI bajos (GYS04, GYS05, GYS06, GYS10, GYS15, GYS16, GYS18, GYS19, GYS24, GYS27, GYS29 y GYS30).

7.5. Análisis de datos

7.5.1. Diversidad alélica de la guayusa por marcador microsatélite.

Se analizó la cantidad de alelos y alelos privados corregidos por rarefacción por cada parroquia (Tabla 3) y la parroquia Sevilla Don Bosco presentó el mayor número de alelos 115, seguida por la parroquia Sinaí con 88 alelos y, finalmente, la parroquia Santa Marianita de Jesús con 90 alelos. Se encontraron 14 alelos privados en la parroquia Sinaí, pero con la corrección estadística de rarefacción se establecieron 11 alelos privados. En la parroquia Sevilla Don Bosco hubo 38 alelos privados y con corrección de rarefacción se determinaron 39 alelos privados. Mientras que en la parroquia Santa Marianita de Jesús hubo 5 alelos privados y 13 alelos privados con rarefacción.

7.5.2. Diversidad y distancias genéticas entre las 3 parroquias.

Como se mencionó anteriormente, se recolectaron 60 individuos de guayusa de la provincia de Morona Santiago, de los cuales 37 provenían de la parroquia Sinaí, 15 de la parroquia Sevilla Don Bosco y 8 de la parroquia Santa Marianita de Jesús. Se realizaron análisis de diversidad genética por cada una de las parroquias.

La heterocigosidad esperada (H_e) vario desde 0.49 hasta 0.59 en las 3 parroquias, mientras que de la heterocigosidad observada (H_o) se obtuvieron valores dentro de un rango de 0.40

hasta 0.53. Sinaí fue la parroquia que obtuvo la menor He (0.49), mientras que Sevilla Don Bosco fue la que presentó mayor He (0.59). En comparación, Sevilla Don Bosco fue la parroquia que tuvo el valor de Ho más bajo (0.40) y la Ho de Santa Marianita de Jesús fue la más alta (0.53) (Tabla 3). Sin embargo, mediante una prueba T con un valor de significancia de 0.05, se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la He y la Ho (valor $p = 0.37$).

La heterocigosidad esperada (He) promedio de *Ilex guayusa* en la provincia de Morona Santiago fue de 0.564 y la heterocigosidad observada promedio (Ho) fue de 0.470 (Tabla 3). Estos valores indican una diversidad genéticamente moderada.

Por medio del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se pudo determinar que el 87% de la variación genética es intrapoblacional, mientras que la variación genética entre las parroquias representó el 13% de la variación genética (Tabla 4; Figura 2).

En cuanto a distancias genéticas F_{st} de Weir y Cockerham se estableció que las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús presentan los valores más bajos ($F_{st} = 0.025$) lo cual indica una distancia genética baja, mientras que la parroquia Sevilla Don Bosco en comparación con la parroquia Sinaí ($F_{st} = 0.062$) y Santa Marianita de Jesús ($F_{st} = 0.058$) presentan distancias genéticas moderadas (Tabla 5) (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

Otro método de análisis de distancias genéticas es un gráfico denominado dendograma obtenido por medio del método de Neighbor Joining (Figura 3). En este dendograma las ramas entre parroquias son proporcionales a las distancias genéticas que existen entre ellas (Saitou y Nei, 1987). Las ramas más largas son las de las parroquias Sinaí y Sevilla Don Bosco. Sin embargo, las ramas entre las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús tienen sus ramas muy cercanas entre ellas. La parroquia Sevilla Don Bosco se encuentra más distanciada genéticamente del resto de parroquias.

Por medio de la Figura 4 se observa el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) en el que se distingue una distribución aleatoria de los individuos en cada parroquia, sin embargo, en un nivel más amplio se pueden diferenciar dos grupos: uno formado por las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús y el segundo grupo conformado por la parroquia Sevilla Don Bosco (Figura 4).

7.5.3. Estructura poblacional.

Se realizaron los análisis de estructura poblacional mediante el software STRUCTURE 2.3.4. (Pitchard *et al.*, 2004). En una corrida inicial se establecieron de 2 a 10 posibles grupos y definió por medio del valor más alto del ΔK (16.52) en un K de 2, es decir, que la población del estudio está dominada por dos posibles líneas ancestrales como se ve en la Figura 5. El primer acervo genético representado con color rojo se ve que predomina en la parroquia Sevilla Don Bosco. Las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús se encuentran con una predominancia por el acervo genético de color verde. Cabe recalcar que estos resultados son congruentes con los obtenidos por el dendograma por Neighbor Joining y por el PCoA.

8. DISCUSIÓN

8.1. Diseño y amplificación con primers microsatélites específicos para la guayusa

Los marcadores microsatélites presentan dos principales ventajas en comparación a otro tipo de marcadores moleculares: son codominantes y son altamente polimórficos (Cole, 2005). Esto es claramente evidenciable en los índices de riqueza alélica y diversidad genética, en los que 16 de los marcadores microsatélites desarrollados para esta investigación resultaron ser altamente informativos.

La utilidad de este tipo de marcadores moleculares se puede evidenciar en otros estudios con especies emparentadas. Para *Ilex chinensis* se diseñaron 25 microsatélites con motivos de dinucleótidos y se observaron niveles de heterocigosidad y número de alelos similares a los de este estudio: número de alelos desde 3 hasta 12 y He de 0.30 a 0.83 (Chen *et al.*, 2015). Con *Ilex paraguariensis* también existen investigaciones en las que se diseñaron marcadores microsatélites con dinucleótidos, y los resultados también son similares a los de este estudio con un número de alelos de 2 a 10 y una He de 0.60 (Pereira *et al.*, 2013). En otro estudio posterior con la misma especie (*I. paraguariensis*) en Uruguay usando los marcadores microsatélites desarrollados por Pereira *et al.*, (2013) se encontró una heterocigosidad esperada de 0.504 y un valor promedio de PIC de 0.48 (Cascales *et al.*, 2014). Debido a la falta de estudios de diversidad genética en guayusa, se hace esta comparación con la yerba mate debido a que es una especie emparentada a la guayusa, que se encuentra dentro del mismo continente y en países con limitaciones tecnológicas y económicas similares a las del Ecuador. Lo relevante de estas investigaciones es que también se decide utilizar marcadores SSR gracias a su gran poder estadístico y su alta capacidad de discriminación entre genotipos (Halkett *et al.*, 2005). Otras ventajas de los marcadores microsatélites es que permiten identificar alelos, son

fáciles de utilizar, se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma, su abundancia dentro del genoma es mediana, detectan altos niveles de polimorfismo y su tipo de herencia es codominante (Semagn *et al.*, 2006). Por todas estas características se considera que el desarrollo de nuevos primers microsatélites para la guayusa es sumamente útil y necesario.

Aunque el diseño de nuevos marcadores microsatélites se consideraba costoso y complicado, gracias al avance de las técnicas de secuenciación de siguiente generación, el costo de la identificación de varios loci microsatélites en especies no modelo se ha reducido notablemente (Guichoux *et al.*, 2011).

8.2. Genotipado y evaluación de la habilidad informativa de los marcadores microsatélites de la guayusa

A pesar de lograr una amplificación exitosa de los 30 pares de cebadores, con el primer GYS01 no se logró obtener resultados. Esto puede deberse a que la amplificación de este primer no estaba optimizada, ya que, aunque se observó bandas cuando se corrieron los geles de agarosa, estas eran super tenues, lo que puede influir en que no hubiera señal de fluorescencia en el genotipado de este primer.

Además del número de alelos, por medio de los índices de PIC, EMR y MI se establecieron 16 marcadores microsatélites altamente polimórficos e informativos por tener valores superiores a 0.5 en el PIC. Moges *et al.*, (2016) consideran que valores de PIC superiores a 0.5 indican que un marcador es altamente informativo. Sin embargo, el resto de los marcadores tenían índices bajos tanto en número de alelos, como en PIC, EMR y MI. Por lo tanto, no se consideran a estos 13 primers como informativos o polimórficos.

Los índices globales de diversidad genética presentaron de un nivel moderado, en contraste con el único estudio preliminar de diversidad genética de esta especie con marcadores ISSRs de Torres *et al.*, (2017) en el que se estableció una diversidad genética baja. Existen varias

diferencias entre estas investigaciones: primero es que el tipo de marcador molecular es diferente, en el estudio de 2017 se utilizaron ISSRs, mientras que en este estudio se diseñaron y probaron por primera vez marcadores microsatélites específicos para la guayusa. Además, las poblaciones de cada estudio fueron diferentes, en el estudio de Torres *et al.*, 2017 la muestra provenía de toda la Amazonía Ecuatoriana, en la presente investigación la muestra proviene únicamente de la provincia de Morona Santiago. Cabe resaltar que los marcadores ISSRs, fueron diseñados para varias especies del género *Ilex* en China, es decir, no eran específicos para la guayusa (Zhou, 2009) y la reproducibilidad y confiabilidad de estos es menor en comparación a los SSRs (Semagn *et al.*, 2006). Además, se reporta la existencia de un bosque natural de árboles de guayusa de hasta 20 m de altura, cerca de la parroquia Sevilla Don Bosco en la provincia de Morona Santiago (Radice y Vidari, 2007). Un bosque natural refleja mayor antigüedad en las plantas de guayusa, lo cual podría significar la acumulación de un mayor número de mutaciones, evidenciable en los índices globales de diversidad genética moderados obtenidos en el estudio de justamente esta provincia. Además, al tratarse de un bosque natural, sin intervención humana, podría ser que en algún momento las plantas de guayusa de este aún se reproducían sexualmente, generando así una mayor diversidad genética. Sin embargo, estas son especulaciones y es necesario investigar a profundidad las características fisiológicas de la guayusa, así como su historia evolutiva.

También es importante recalcar que, según Alvarado, existen 3 variedades de guayusa: tradicional, morada y Limoncocha (2016). Como esta información no se sabía al momento de la recolección y las características de estas tres variedades son morfológicas, no se tomó en cuenta esta consideración al momento de la recolección de la muestra. Quizás dentro de los 60 individuos podrían existir ejemplares de distintas variedades, sobre todo de la tradicional y la Limoncocha que tienen solo la diferencia de la forma en como crecen sus hojas: la Limoncocha es más frondosa y sus hojas crecen en forma de abanico (Alvarado, 2016). Es importante

mencionar que no se ha determinado si es que las tres variedades tienen diferencias genéticas significativas entre ellas, como para hacer una distinción real.

Una característica que está directamente relacionada a la diversidad genética es la naturaleza de la reproducción de la especie en estudio, debido a que se considera que la reproducción sexual, debido a la recombinación de cromosomas, genera diversidad (Simils *et al.*, 2001). En el caso de la guayusa solo se ha reportado que se reproduce asexualmente, por medio de estacas (Dueñas *et al.*, 2010). En una revisión sobre los aspectos genéticos y evolutivos de la reproducción asexual, se recalca que la propagación vegetativa que produce clones induce a producir un exceso de heterocigotos, en asociación con la deriva génica y con las mutaciones. De hecho, se espera que, aunque sea contra deductivo, si existen organismos con ausencia de reproducción sexual, que todos los locus sean heterocigotos, por lo tanto, el polimorfismo inclusive se podría mantener mejor en poblaciones con reproducción asexual, en comparación a la reproducción sexual (Meuus *et al.*, 2007).

Los resultados de una diversidad genética moderada basada en heterocigosidad espera, también se apoyan en argumentos de que en organismos con reproducción asexual ocurre el efecto Meselson, en el cual se esperan niveles altos de heterocigosidad debido a que no ocurre segregación de cromosomas, por ende, las mutaciones se mantienen en estado de heterocigosis porque es improbable que la mutación ocurra en las mismas dos copias del alelo, y como se producen clones y no se recombinan los cromosomas, se mantiene esta condición (Wright *et al.*, 2013; Balloux *et al.*, 2003). No obstante, esto no implica que los organismos con reproducción asexual respondan mejor a cambios ambientales en comparación con organismos sexuales, debido a que su potencial de adaptabilidad se reduce por la falta de capacidad de generar nuevos alelos por recombinación (McDonald *et al.*, 2016).

8.3. Distancias genéticas entre las parroquias de recolección de guayusa

En cuanto al análisis de varianza molecular AMOVA, se determinó que el 87% de la variación es intrapoblacional y esto es similar a los resultados de Torres *et al.* (2015) con guayusa y Gauer y Cavalli con la yerba mate (2000), donde la variación intrapoblacional correspondió al 82% y al 85%, respectivamente. Se podría explicar esta diferenciación porque el área de estudio representaba únicamente el 2% de la superficie de toda la provincia y como la distancia entre todos los puntos de recolección no era significativamente grande, las guayusas podrían provenir de un mismo pool de clones. Es interesante que, a pesar de este factor previamente mencionado, mediante el cálculo de las distancias F_{st} , la parroquia Sevilla Don Bosco en relación con las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús tiene una distancia genética moderada. Esta separación genética es evidenciable en el dendograma obtenido por Neighbor Joining. Como no se ha reportado reproducción sexual de la guayusa en los últimos 46 años, no se discute la idea de que exista flujo génico (Schultes, 1972). Este argumento es apoyado también por el hecho de que la H_e y la H_o son estadísticamente iguales y esto está relacionada a un apareamiento poco frecuente, que se da por accidente según Chesnokov y Artemyeva (2015). Lo cual es cierto en la guayusa, que solo se ha reportado que se reproduce por estacas.

Pese a que la separación geográfica entre las tres parroquias del área de estudio es apenas de 10 km, existen algunas diferencias importantes entre ellas en aspectos como: formaciones geológicas, órdenes de suelos y factores de intervención humana. El área en donde se recolectaron las muestras de guayusa de la parroquia Sevilla Don Bosco corresponde a la formación geológica Chapiza y el suelo del orden Entisol. Este tipo de suelos son francos arcillosos en su mayoría, lo que permite un buen drenaje (SNI, 2014). Mientras que las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús están dentro de la formación geológica Mera con

suelos del orden Inceptisoles. Este orden tiene alta cantidad de materia orgánica, pero un mal drenaje por la naturaleza de su suelo arcilloso amorfo (SNI, 2015; SNI, 2015).

Cabe recalcar que, según el Sistema Nacional de información (2014), el 64% de la cobertura vegetal de la Sevilla Don Bosco es bosque nativo, esto indica un alto grado de conservación ya que el suelo usado para áreas urbanas o bosques con intervención no llega al 8%. Dentro de esta parroquia existen asentamientos humanos sin conexión vial, por lo que, moverse entre estos solo es posible caminando o por vía aérea. Este aislamiento fue evidente cuando se recolectaron hojas de guayusa de esta parroquia, que fue la más difícil de acceder y en la única que se recolectaron algunas hojas desde chacras de comunidades indígenas (SNI, 2014). Debido a las características de suelo y la amplia cobertura de bosques naturales sin mucha intervención humana en la parroquia Sevilla de Don Bosco, se sugiere que esta parroquia es diferente en estos aspectos a los demás. Esto podría indicar que una existiese influencia de estas distinciones en las distancias genéticas moderadas que se encontraron.

En contraste, las parroquias de Sinaí y Santa Marianita de Jesús son similares en varios aspectos. La mayor parte del suelo de esta parroquia es para uso residencial (SNI, 2015). La movilidad entre la parroquia Sinaí y la parroquia Santa Marianita de Jesús es facilitada por su cercanía de solo 18 km de distancia y por el buen estado de la vía Estatal E45 que atraviesa ambas parroquias. El traslado de productos agrícolas es común. En contraste, las carreteras que se conectan a las comunidades presentes predominantemente en Sevilla Don Bosco se encuentran en un estado regular ya que no tienen un mantenimiento adecuado y esto puede reducir la comunicación entre esta parroquia y el resto de las parroquias (SNI, 2015).

El flujo de plantas de guayusas entre Sevilla Don Bosco y las parroquias de Sinaí y Santa Marianita de Jesús claramente puede verse restringido por este aislamiento antropológico, ya que la única posible manera de que se reproduzca esta planta es por medio de estacas, es decir,

con intervención humana. El hecho de que no haya tanta movilidad desde y hacia la Sevilla Don Bosco podría tener alguna repercusión en la composición genética de la guayusa en esta parroquia.

8.4. Estructura poblacional de la guayusa en Morona Santiago

Los resultados del análisis bayesiano con STRUCTURE indicaron que el valor óptimo de linajes es de 2 y con el gráfico obtenido de estos mismos resultados, parece que existen dos linajes bien diferenciados dentro de la muestra de Morona Santiago. Además, los dos potenciales linajes: una representado por Sevilla Don Bosco y la otra por las parroquias de Sinaí y Santa Marianita de Jesús son congruentes con los resultados de los valores F_{st} , del dendograma por Neighbor Joining y por el gráfico del PCoA. Geográficamente las parroquias de Sinaí y de Santa Marianita de Jesús se encuentra más separadas, sin embargo, pertenecen a un mismo linaje. Esto puede deberse a que existe mayor conexión entre estas dos parroquias por su mayor grado de urbanidad, mayor conectividad por actividades humanas, su similitud en cuanto al uso de suelos y en su composición geológica, mientras que la parroquia Sevilla Don Bosco se mantiene sin mayor intervención por parte del ser humano, por esto se conservan sus cultivos naturales y, además, se ha reportado que puede existir un bosque natural de árboles de guayusa (SNI, 2014; SNI, 2015; Radice y Vidari, 2007).

9. CONCLUSIONES

- Por primera vez se reporta el diseño de marcadores moleculares microsatélites específicos para la *Ilex guayusa*. Se obtuvieron 16 primers SSRs polimórficos e informativos que pueden ser usados para estudios posteriores.
- La heterocigosidad esperada global de la provincia de Morona Santiago fue de 0.564 y la heterocigosidad observada global fue de 0.470. No existen diferencias significativas entre las dos y estas representan una diversidad genética moderada.
- Los valores de heterocigosidad esperada son similares a los reportados en la literatura por especies emparentadas y en estudios con marcadores microsatélites.
- Según los valores F_{st} , el PCoA y el dendograma por Neighbor Joining la parroquia Sevilla Don Bosco se encuentra separada genéticamente de las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús. Las parroquias Sinaí y Santa Marianita de Jesús son cercanas genéticamente. Esta distinción se debe a factores geológicos y al grado de intervención humana.
- Se observó una potencial estructura poblacional con dos linajes (Sinaí y Santa Marianita de Jesús con predominancia del primer acervo y Sevilla Don Bosco con predominancia del segundo acervo).

10. RECOMENDACIONES

- Como la guayusa es una planta con un gran número de metabolitos secundarios se recomienda realizar una extracción de ADN muy cuidadosa, con material joven, y quizás se recomienda probar extraer el ADN de la guayusa con algún kit comercial, para evitar que existan inhibidores que no permitan una amplificación exitosa por medio de PCR.
- Por el mismo argumento anterior, se sugiere el uso de BSA en todas las reacciones de amplificación con esa planta, ya que el BSA actúa en contra los inhibidores y mejora la actividad de la polimerasa.
- Finalmente, se espera ampliar el estudio de diversidad genética y estructura poblacional de esta planta en una muestra más grande que incluya a individuos de todas las provincias de la Amazonía Ecuatoriana

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, E. (2016). *Guía Técnica del Cultivo de Guayusa*. Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit GIZ. Extraído en línea desde: <http://www.eco-consult.com/fileadmin/user_upload/pdf/downloads/Guayusa_kichwa_11_2016.pdf>
Fecha de consulta: (2018-11-18).
- Azhar, M., Amjad, M., Qasim, M., Dogan, Y., Comertpay, G., Yildiz, M., Hatipoglu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Ozkan, H., Chung, G. y Shehzad, F. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32 (2): 261-285.
- Balloux, F., Lehmann, L. y de Meuis, T. (2003). The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics*, 164: 1635-1644.
- Balloux, F. y Lugon, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11, 155-165.
- Bass, M., Finer, M. Jenkins, C., Kreft, H., Cisneros, D., McCracken, S., Pitman, N., English, P., Swing, K., Villa, G., Di Fiore, A., Voigt, C. y Kunz, T. (2010). Global Conservation Significance of Ecuador's Yasuni National Park. *PLoS ONE*, 5 (1): e8767.
- Blacket, M., Robin, C., Good, R., Lee, S. y Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3): 456-463.
- Cascales J., Bracco, M., Poggio, L. y Gottlieb, A. (2014). Genetic diversity of wild germplasm of “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. *Genetica*, 142 (6): 563-573.
- Chen, W., Xiao, Z., Tong, X, Liu, Y. y Li, Y. (2015). Development and characterization of 25 microsatellites primers for *Ilex chinensis* (Aquifoliaceae). *Applications in Plant Sciences*, 3 (10).
- Chesnokov, Y. y Artemyeva, A. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Bioinformatics and math statistics*, 50 (5): 571-578.

- Clark, L. y Jasienjuk, M. (2011). Polysat: a R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3): 562–566.
- Cole, C. (2005). Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*). *New Phytologist*, 167, 155-164.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, M. Macía, M. y Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA y Herbario AAU.
- Descola, P. (1996). *In the society of nature: A native ecology in Amazonia*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Dray, S. y Dufour, A. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4): 1–20.
- Dueñas, J., Jarrett, C., Cummins, I. y Logan-Hines, E. (2010). Amazonian Guayusa (*Ilex guayusa* Loes.): A Historical and Ethnobotanical Overview. *Notes on Economic Plants*, 70 (1): 85-91.
- Earl, D. y von Holdt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359-361.
- Ellegren, H. y Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17: 422-434.
- Esquinas, J. (2005). Protecting crop genetic diversity for food security: political ethical and technical challenges. *Nature Publishing Group*, 6: 946-953.
- Gan, R., Zhang, D., Wang, M. y Corke, H. (2018). Health benefits of Bioactive Compounds from the Genus *Ilex*, a Source of Traditional Caffeinated Beverages. *Nutrients*, 10. DOI: 10.3390/nu10111682
- García, A., Baneas, N., Moreno, D. y Ruales, J. (2017). Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. *J. Sci. Food. Agric.* 97 (12): 3929-3936.
- García, H. (1992). *Flora Medicinal de Colombia*. 2da edición. Bogotá, Colombia: Editores Tercer Mundo.

- Gauer, L. y Cavalli-Molina, S. (2000). Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity* 84:647–654
- Google. (s.f.). [Mapa de Morona Santiago, Ecuador en Google Maps]. Extraído en línea desde: <https://www.google.com/maps/d/u/0/edit?mid=18NJAMZItLFdBfzRdko_n95v2gCg&hl=es>. Fecha de consulta: (2018-09-15).
- Gottlieb, A., Giberti, G. y Poggio, L. (2005). Molecular Analyses of the Genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in South America, Evidence from AFLP and ITS Sequence Data. *American Journal of Botany*, 92 (2): 352-369.
- Goudet, J. y Thibaut, J. (2015). *Hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics*. Extraído en línea desde: <<https://cran.r-project.org/package=hierfstat>>. Fecha de consulta: (2018-10-02).
- Griffiths, S., Fox, G., Briggs, P., Donaldson, I., Hood, S., Richardson, P., *et al.* (2016). A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimized, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data. *Conservation Genetics Resources*, 8(4) : 481-486.
- Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F. y Petit, R. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591-611.
- Hake, S. y Ross, J. (2015). Genetic, evolutionary and plant breeding insights from the domestication of maize. *eLife*. DOI: 10.7554/eLife.05861
- Halkett, F. y Balloux, S. (2005). Tackling the population Genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends Ecol. Evol.*, 20: 194-201.
- Harding, K. y Benson, E. (2013). *Biomarkers from Molecules to Ecosystems and Biobanks to Genebanks*. Normah, M., Chin, H. y Reed, B. (Ed.), Conservation of Tropical Plant Species. New York, EEUU: Springer Science+Business Media.
- Hughes, R., Inouye, B., Johnson, M., Underwood, N. y Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11 (6): 609- 623.
- Jombart, T., Zhian, N., Collins, C., Lustrik, R., Beugin, P., Knaus, B., Solymos, P., Mikryukov, V., Schliep, K., Maié, T., Morkovsky, L., Ahmed, I., Cori, A., Calboli, F. y Ewing, R. (2018). *Package “adegenet”*. Extraído en línea desde:

- <<https://cran.rproject.org/web/packages/adegenet/adegenet.pdf>>. Fecha de consulta: (2018-10-02).
- Jorgensen, P. y León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. EEUU: Missouri Botanical Garden.
- Kalinowski, S. (2005). HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 1877-189.
- Kamvar, Z., Tabarima, J. y Grünwald, N. (2014). Poppr: a R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2: e281.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cros, T. y Crozier, W. (2013). DiveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 782-788.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C. y Palladino, M. (2009). *Concepts of Genetics*. 9th edition. EEUU: Pearson
- Krause, T. y Ness, B. (2017). Energizing agroforestry: Ilex guayusa as an additional commodity to diversify Amazonian agroforestry systems. *International Journal of Biodiversity Science*, 13 (1): 191-203.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. y Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4): 299–306.
- Lischer, H., y Excoffier, L. (2012). PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2): 298–299.
- Loizeau, P.-A., y Barriera, G. (1999). Aquifoliaceae. En Jørgensen, P. y Yáñez, S. (Eds.), *Catalogue of the vascular plants of Ecuador* (pp 225–227). Monogr. Syst. Bot. Missouri Botanical Garden.
- López, V., Espíndola, F., Calles, J. y Ulloa, J. (2013). *Atlas “Amazonía Ecuatoriana Bajo Presión”*. Quito, Ecuador: EcoCiencia.
- McDonald, M., Rice, D. y Desai, M. (2016). Sex speeds adaptation by altering the dynamics of molecular evolution. *Nature*, 531: 233-236.

- Meuus, T., Prugnolle, E. y Agnew, P. (2007). Asexual reproduction: Genetics and evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences*. DOI: 10.1007/s00018-007-6515-2.
- Moges, A., Admassu, B., Belew, D., Yesuf, M., Njuguna, Y., Kyalo, M. y Ghiire, S. (2016). Development of microsatellite markers and analysis of genetic diversity and population structure of *Colletotrichum gloeosporioides* from Ethiopia. *PLoS One*, 11 (3): e0151257.
- Overing, J. y Passes, A. (2000). *The Anthropology of Love and Anger: The Aesthetics of Conviviality in Native Amazonia*. EE. UU. y UK: Routledge.
- Paradis, E. (2010). Pegas: a R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419–420.
- Paradis, E., Claude, J. y Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(289), 290.
- Peakall, R. y Smouse, P. (2012). GenAlex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Pereira, M., Ciampi, A., Inglis, P., Souza, V. y Azevedo, V. (2013). Shotgun sequencing for microsatellite identification in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Appl Plant Sci*. DOI: 10.3732/apps.1200245
- ProEcuador. (2013). *Se exporta a EE. UU. guayusa para bebida energizante*. Extraído en línea desde: <www.proecuador.gob.ec/2013/11/18/se-exporta-a-ee-uu-guayusa-para-bebida-energizante/>Fecha de consulta: (2018-04-07).
- R Core Team. (2013). *R: A language and environment for statistical compute*. R Foundation For Statistical Computing. Extraído en línea desde: <<https://www.R-project.org/>>. Fecha de consulta: (2018-10-02).
- Radice, M., Cossio, N. y Scalvenzi, L. (2016). *Ilex guayusa*: A systematic review of its Traditional Uses, Chemical Constituents, Biological Activities and Biotrade Opportunities. *Mol2Net*, 2, Section M.
- Radice, M. y Vidari, G. (2007). Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja*, 6(3): 3-11.
- Ramanatha, V & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant resources. *Plan cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- Rao, S. y Shatpit, B. (2013). *Conservation of Tropical Plant Genetic Resources: In Situ Approach*. Normah, M., Chin, H. y Reed, B. (Ed.), Conservation of Tropical Plant Species. New York, EEUU: Springer Science+Business Media.

- Rousset, F. (2008). A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Saghai, M., Soliman, K., Jorgensen, R. y Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81 (24): 8014-8018.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Bio. Evol.*, 4 (4): 406-425.
- Samils, B., Stepien, V., Lagercrantz, U., Lascoux, M. y Gullberg, U. (2001). Genetic diversity in relation to sexual and asexual reproduction in populations of *Melampsora larici-epitea*. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 871-881.
- Semagn, K., Bjornstad, A. y Ndjiondjop, M. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5 (25): 2540-2568.
- Shemluck, M. (1979). The flowers of *Ilex guayusa*. *Botanical Museum Leaflet*, 27(5): 155-160.
- Sistema Nacional de Información. (2015). *Componente Biofísico: Parroquia Sinaí*. Extraído en línea desde: <http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1460016450001_PDYOT%20SINAI_30-10-2015_23-47-02.pdf>. Fecha de consulta: (2018-11-16).
- Sistema Nacional de Información. (2015). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Sucúa*. Extraído en línea desde: <http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/1460000880001_Diagnostico_Componentes_PDyOT_Sucua_2015_10-03-2015_10-38-29.pdf>. Fecha de consulta: (2018-11-16).
- Sistema Nacional de Información. (2014). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2014-2019: Sevilla Don Bosco*. Extraído en línea desde: <http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1460016370001_PDOT%20SEVILLA%20DON%20BOSCO%202014%202019_30-10-2015_22-13-06.pdf> Fecha de consulta: (2018-11-16).
- Soltis, P. y Soltis, D. (1995). Plant Molecular Systematics: Inferences of Phylogeny and Evolutionary Processes. En Hecht, M., Macintyre, R. y Clegg, M. (Eds.), *Evolutionary Biology* (pp. 139-186). New York, E.E.U.U.; Plenum Press.

- Torres, A., Mosquera, J., Jaramillo, V., Arahana, V. y Torres. M. (2017). Preliminary assessment of the genetic diversity of Ecuadorian *Ilex guayusa* using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 9 (15). DOI: <http://dx.doi.org/10.18272/aci.v9i15.456>
- Weir, B. S., y Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6): 1358.
- Wright, S., Kalisz, S. y Slotte, T. (2013). Evolutionary consequences of self-fertilization in plants. *Proc. R.Soc*, 280 (1760). DOI: 10.1098/rspb.2013.0133
- Zhou, X. (2009). *Inter-Simple Sequence Repeat Molecular Markers in Ilex and the Tissue Culture System of Ilex cornuta Lindl Ex Paxt.* (Disertación). Henan, China: Henan Agricultural University.

12. TABLAS:

Tabla 1: 30 marcadores microsatélites seleccionados de la lista de 353 marcadores generados por el diagrama de flujo descrito en Griffiths *et al.*, 2016, con sus secuencias forward (F), reverse (R), motivos, tamaño esperado, temperatura de annealing y fluoróforos utilizados.

Primers ID		Primer	Motivos	Tamaño esperado (pb)	Ta (°C)	Fluoróforo
GYS01	F	GCCTCCCTCGCGCCATGGTATATGTAAGACCACAGAGTCTCAGC	TCC(30)	80	57	PET
	R	CTCGTCAAGTCTGGCGACTCCAACC				
GYS02	F	GCCTCCCTCGCGCCAGCGTAGCGATCAATGAACTTTAAGTTAGC	ACC(30)	69	64	6FAM
	R	TTTGCCAAATTCCTCTCTCAACC				
GYS03	F	GCCTCCCTCGCGCCATGTAGTGGTGGATTCAATAAACG	ATT(33)	66	62	PET
	R	ACGACCATGGCACAAGGATGC				
GYS04	F	GCCTCCCTCGCGCCACAAGAGGCCAAAGTAGAGAAGAAAGAGG	TTC(24)	90	60	NED
	R	GGGGTTGTTCGAGACTTTGACTACG				
GYS05	F	GCCTCCCTCGCGCCACCACCACCAACATCGTGTGATCC	ACC(24)	137	64	6FAM
	R	TAGTGGTGGGCAATTGGTAGGG				
GYS06	F	GCCTCCCTCGCGCCAGGTGACTTAACAATAAAGACG	TC(20)	133	59	PET
	R	CACATACATCTCTCTCGTATAGC				
GYS07	F	GCCTCCCTCGCGCCACAAGAATCCATGATACAGTAGG	TC(24)	276	64	VIC
	R	ATTTACATACACACAGGTACCC				
GYS08	F	GCCTCCCTCGCGCCAGCTCTTCTTAGACAATACC	TC(30)	140	58	NED
	R	GAATTAGGTACACTTCATCTCC				
GYS09	F	GCCTCCCTCGCGCCATATGTCATAAGAGGAGGTTAGG	TC(60)	323	62	6FAM
	R	CTCCTAATAATTTACCCTCACC				
GYS10	F	GCCTCCCTCGCGCCAGATACAAACCTAGACTAACAGC	TC(24)	156	62	6FAM
	R	CCTGTTACAGAGTCTTTAGACC				
GYS11	F	GCCTCCCTCGCGCCACCATAGAGGGTATTAGTTAAGG	AT(24)	210	64	PET
	R	CTAGTTATCCCTTGGTTATCC				
GYS12	F	GCCTCCCTCGCGCCAAATAAATGTGGAGTGGTAGACC	TC(38)	242	60	VIC
	R	GAGTCTAACTATGCAGAAACC				
GYS13	F	GCCTCCCTCGCGCCAGTGTGTGTTAAAGGTGTACG	TG(28)	123	55	NED
	R	TCACTCTCTGCTTTTAGTCC				
GYS14	F	GCCTCCCTCGCGCCAAATGGACTACTAGAGAAGACTCG	TC(18)	56	59	FAM
	R	CTGGTCTTAGATAGTTCATCC				
GYS15	F	GCCTCCCTCGCGCCATTAGAGAAGACAGATGTGTGC	TC(16)	89	60	NED
	R	CTTGTCTTATATCTCTGTTGC				
GYS16	F	GCCTCCCTCGCGCCAGAGAGTCACTGTTGAGACC	TC(20)	255	58	6FAM
	R	TACTCTCTCACACACAGTCG				
GYS17	F	GCCTCCCTCGCGCCAGTATCTGATCTCTCTCATCG	TC(36)	153	62	VIC
	R	ATGTACATAACTCAAGGAGTGC				
GYS18	F	GCCTCCCTCGCGCCAACTCAAAGTAACATCGTACCC	TG(18)	88	64	NED
	R	TAGGTATCATTCGAGTCTTCC				
GYS19	F	GCCTCCCTCGCGCCATGTATACATACAGTGCAGAACCC	TC(42)	101	62	VIC
	R	CACTACTCCAGTACTCTCTCC				
GYS20	F	GCCTCCCTCGCGCCACACTAACACCAAGATTAAGACC	TC(20)	272	64	NED
	R	ACTTCAGTGTCTACATGAGC				
GYS21	F	GCCTCCCTCGCGCCAAAGTCTCTTACTCACCTGAACG	TC(22)	179	62	6FAM
	R	GTAGAGAATGAGGAATGAACC				
GYS22	F	GCCTCCCTCGCGCCACTTTGCAGTAGAGTGTGTTACC	TC(22)	142	60	VIC
	R	AATAGGGATAAGAGTACTAGC				
GYS23	F	GCCTCCCTCGCGCCAGTACCAACTATATCACTCTCG	TC(34)	262	62	6FAM
	R	CAACTGTAATCATCTCTTCC				
GYS24	F	GCCTCCCTCGCGCCACTCTCTTTTTCTCTTATCAGC	TC(16)	238	62	PET
	R	CATTACAGACTCTGTGTAGGC				
GYS25	F	GCCTCCCTCGCGCCACGTAGATGAAGGTAGATAAAGG	TC(40)	178	62	PET
	R	CCAGATCTAGACTTTCCTCC				
GYS26	F	GCCTCCCTCGCGCCAAAGAGAGTGTGTAGAAAATGG	TC(38)	238	60	VIC
	R	CGATAGTAGTTGCTAAATAGGG				
GYS27	F	GCCTCCCTCGCGCCAGAATCATATGCTGTCTCTGG	AT(18)	63	60	NED
	R	AGTTAGAGAGTTAGAACTTGGG				
GYS28	F	GCCTCCCTCGCGCCATATGACAGTAGGCTAGTGTGG	TC(28)	161	58	NED
	R	TTAGTGTAGCTGAGTTAGG				
GYS29	F	GCCTCCCTCGCGCCAGTATGGTTATGTCTGTTACTGC	TC(18)	286	60	NED
	R	AAGTGAAGGTAGACTTGAACC				
GYS30	F	GCCTCCCTCGCGCCAAAGACTAAGTTCAAACCTCTCC	TC(46)	174	60	PET
	R	GCAACTAGCATCTAACATAGG				

Primers elaborados con el apoyo y colaboración de Dr. Jenny Rowntree, Manchester Metropolitan University. Ta (°C): Temperatura de annealing estandarizada; pb: pares de bases.

Tabla 2: Parámetros utilizados para medir la diversidad genética de *Ilex guayusa* en Morona Santiago. Para cada marcador se calculó el número de alelos (Na), la heterocigosidad esperada (He), la heterocigosidad observada (Ho), contenido de información polimórfica (PIC), radio efectivo múltiple (EMR) y el índice del marcador (MI).

Primer	PIC	EMR	MI	Na	He	Ho	Primer	PIC	EMR	MI	Na	He	Ho
GYS02	0,616	0,280	0,172	7	0,675	0,271	GYS17	0,736	0,571	0,420	10	0,736	0,783
GYS03	0,816	0,463	0,378	9	0,815	0,367	GYS18	0,646	0,051	0,033	3	0,652	0,750
GYS04	0,532	0,023	0,012	2	0,499	0,967	GYS19	0,095	0,023	0,002	2	0,095	0,000
GYS05	0,421	0,280	0,118	7	0,521	0,071	GYS20	0,805	0,571	0,460	11	0,792	0,350
GYS06	0,064	0,023	0,001	2	0,064	0,000	GYS21	0,666	0,280	0,187	7	0,671	0,783
GYS07	0,806	1,286	1,036	17	0,821	0,133	GYS22	0,590	0,143	0,084	5	0,590	0,867
GYS08	0,649	0,091	0,059	4	0,643	0,733	GYS23	0,610	0,280	0,171	8	0,611	0,867
GYS09	0,721	0,280	0,202	7	0,721	0,583	GYS24	0,433	0,206	0,089	8	0,421	0,100
GYS10	0,497	0,023	0,011	2	0,497	0,783	GYS25	0,678	0,366	0,248	9	0,700	0,690
GYS11	0,804	0,691	0,556	11	0,803	0,683	GYS26	0,520	0,091	0,048	5	0,530	0,617
GYS12	0,532	0,366	0,195	8	0,621	0,304	GYS27	0,493	0,023	0,011	2	0,493	0,683
GYS13	0,649	0,143	0,093	6	0,651	0,650	GYS28	0,844	0,366	0,309	8	0,852	0,508
GYS14	0,505	0,051	0,026	3	0,505	0,000	GYS29	0,433	0,023	0,010	2	0,433	0,367
GYS15	0,033	0,023	0,001	2	0,033	0,033	GYS30	0,439	0,206	0,090	6	0,439	0,067
GYS16	0,464	0,023	0,011	2	0,464	0,633							
Promedio	0,676	0,429	0,174	6,034	0,564	0,470	Promedio	0,676	0,429	0,174	6,034	0,564	0,470

Tabla 3: Parámetros utilizados para medir la diversidad genética de *Ilex guayusa* en Morona Santiago. En cada parroquia se midió el número de individuos muestreados, el número de alelos (Na), el número de alelos privados (Np), el número de alelos privados con corregidos con rarefacción (Npr), la heterocigosidad esperada (He), la heterocigosidad observada (Ho) y la proporción total de alelos encontrados en cada localidad.

Parroquia	N.o individuos	Na	Nar	Np	Npr	He	Ho
Sinaí	37	123	88	14	11	0,49	0,50
Sevilla Don Bosco	15	149	115	38	39	0,59	0,40
Santa Marianita de Jesús	8	91	90	5	13	0,51	0,53
Global	60	121	98	57	63	0,53	0,48

Tabla 4: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en los individuos de *Ilex guayusa* muestreados en Morona Santiago

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Interpoblacional	555,150	33,545	1,27	12,87%
Intrapoblacional	438,000	7,300	7,30	87,13%
Total	993,150		8,575	100%

Tabla 5: Matriz de distancias genéticas de Weir y Cockerham (F_{st}) entre individuos de guayusa de las 3 agrupaciones

	Sinaí	Sevilla Don Bosco	Santa Marianita de Jesús
Sinaí	-	-	-
Sevilla Don Bosco	0,0626	-	-
Santa Marianita de Jesús	0,0252	0,0581	-

Valores entre 0 – 0,05 indican baja diferenciación genética; valores entre 0,05 – 0,15 indican moderada diferenciación genética; y valores entre 0,15 – 0,25 indican alta diferenciación genética (Balloux y Lugon-Moulin, 2002).

13. FIGURAS:

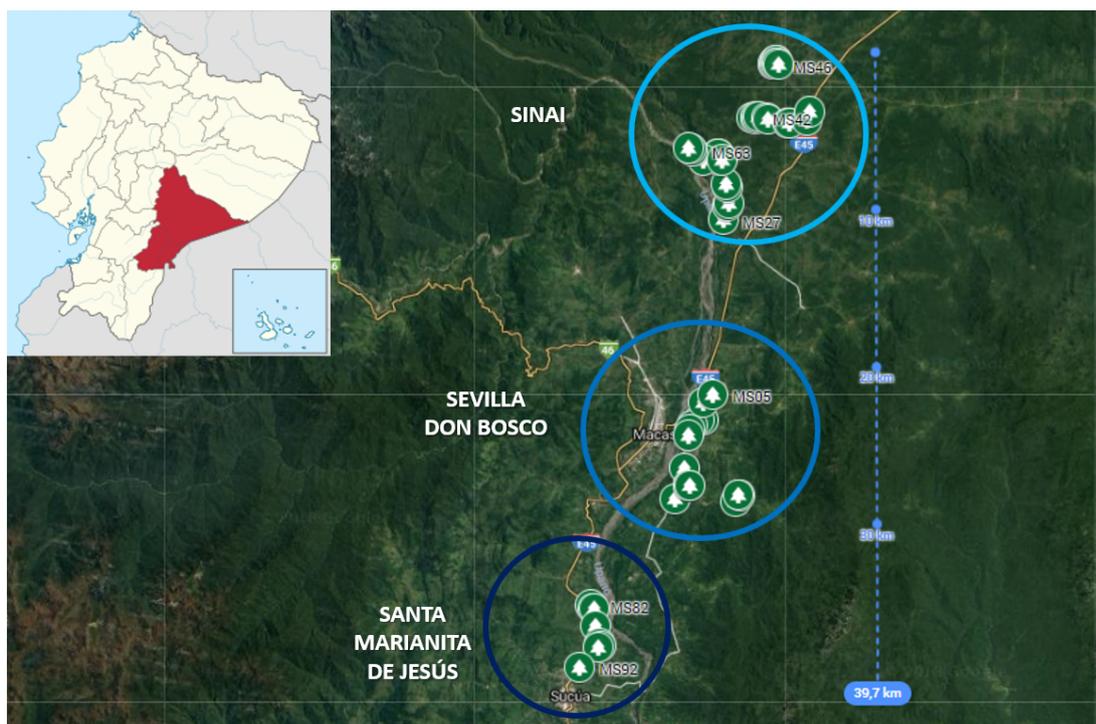


Figura 1: Mapa de la provincia de Morona Santiago donde se observan los sitios de recolección de los 60 individuos de *Ilex guayusa* en las 3 parroquias: Sinaí, Sevilla Don Bosco y Santa Marianita de Jesús (Google, s.f.).

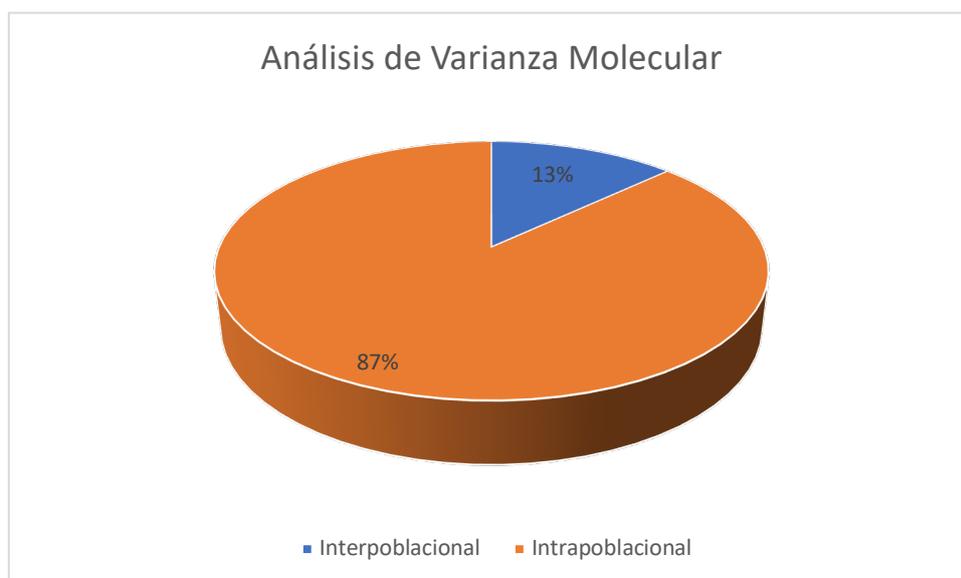


Figura 2: Análisis de varianza molecular (AMOVA). La variación intrapoblacional analiza la variación genética entre todos los individuos analizados. La variación interpoblacional indica la variación genética entre las 3 parroquias.



Figura 3: Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor Joining (NJ) de los 60 individuos de las 3 parroquias de *Ilex guayusa* en Morona Santiago. Las ramas representan las distancias genéticas.

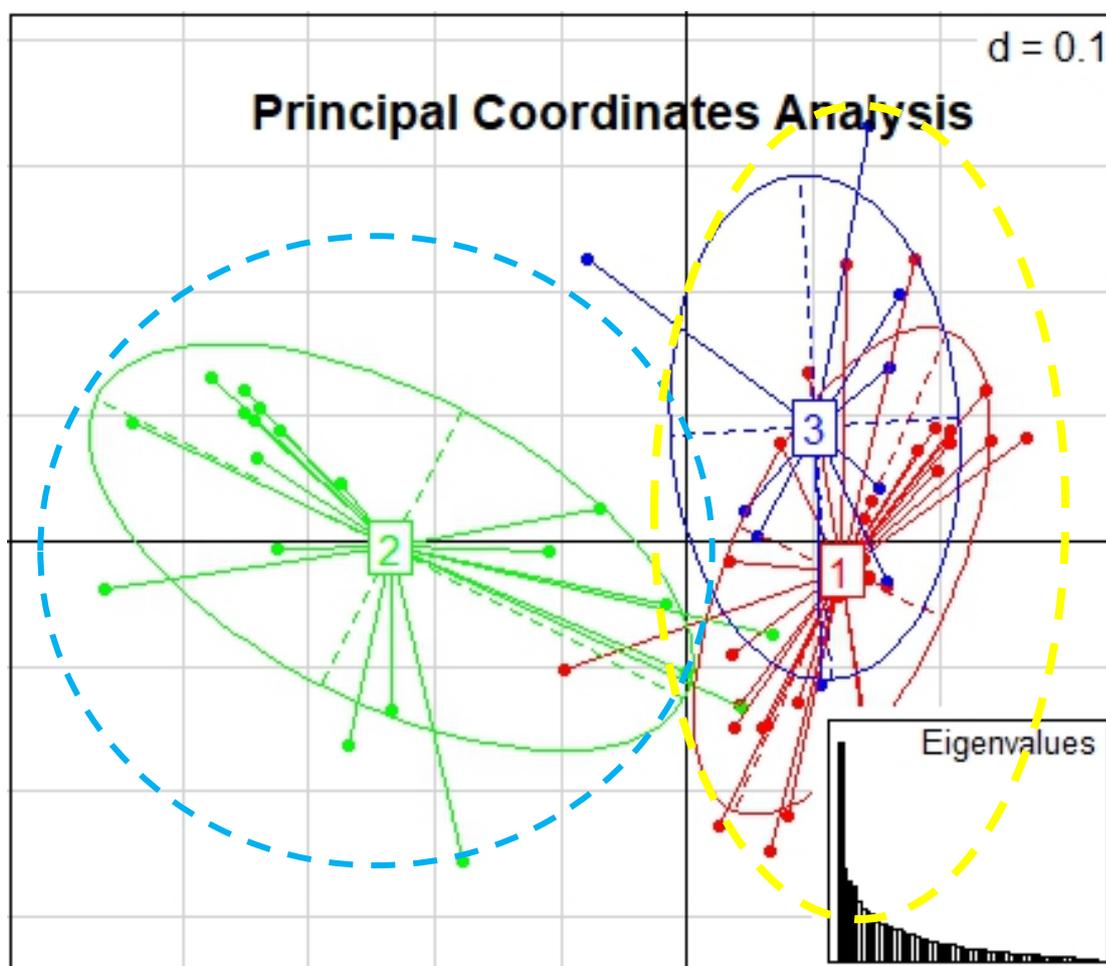


Figura 4: PCoA de los individuos de *Ilex guayusa* muestreados en Morona Santiago. Cada color representa a las 3 parroquias. Se sugiere que existen 2 poblaciones. La primera población (círculo celeste con línea entrecortada) representado por la parroquia Sevilla Don Bosco (2) y la segunda población (círculo amarillo con línea entrecortada) representado por las parroquias Siná (1) y Santa Marianita de Jesús (2).

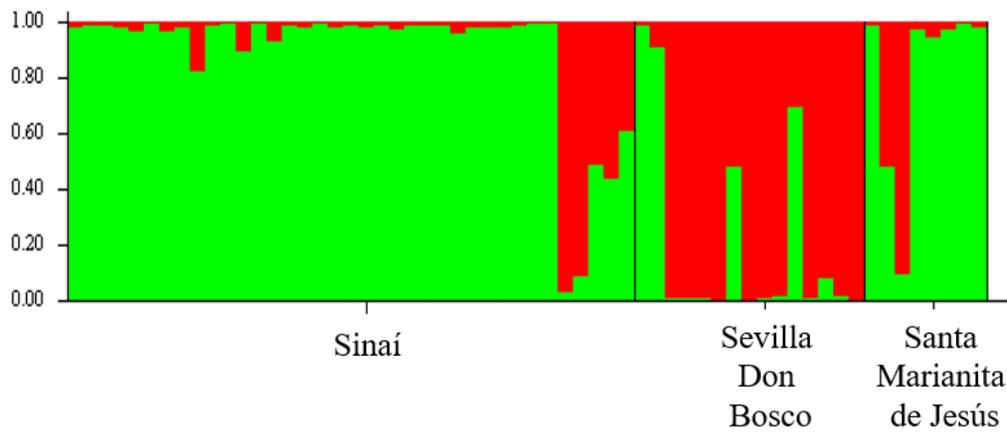


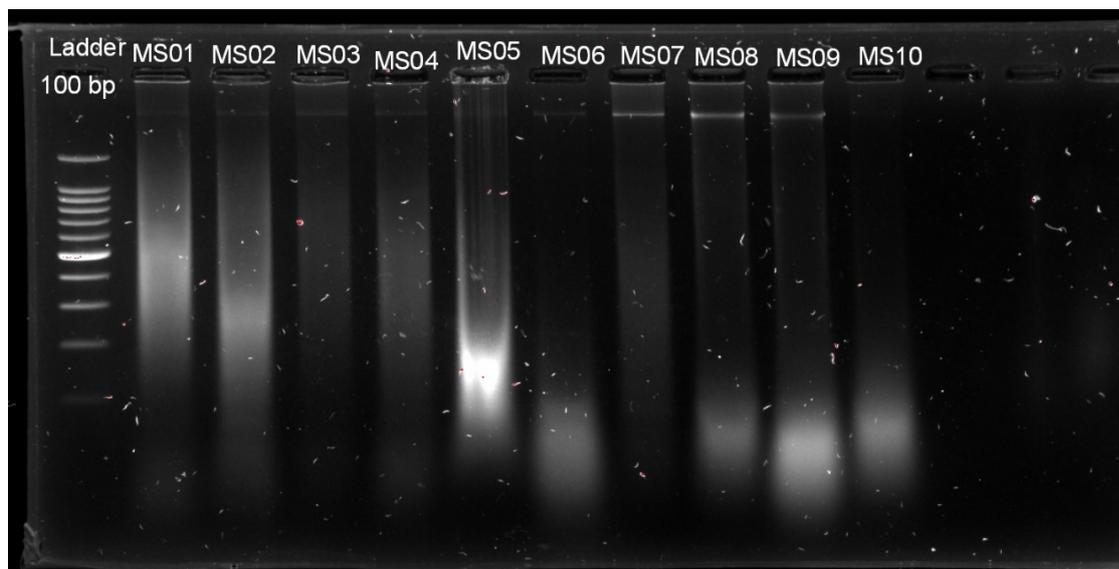
Figura 5: Estructura poblacional obtenida mediante el software STRUCTURE de los 60 individuos de *Ilex guayusa* muestreados en la provincia de Morona Santiago en las 3 parroquias. Se obtuvo un valor óptimo de $K=2$ y este valor corresponde al número de acervos genéticos que se representan en color verde y rojo, respectivamente.

14. ANEXO:

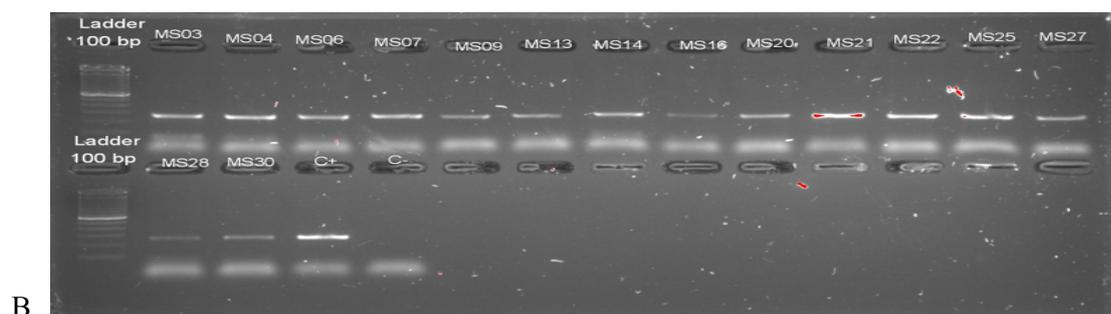
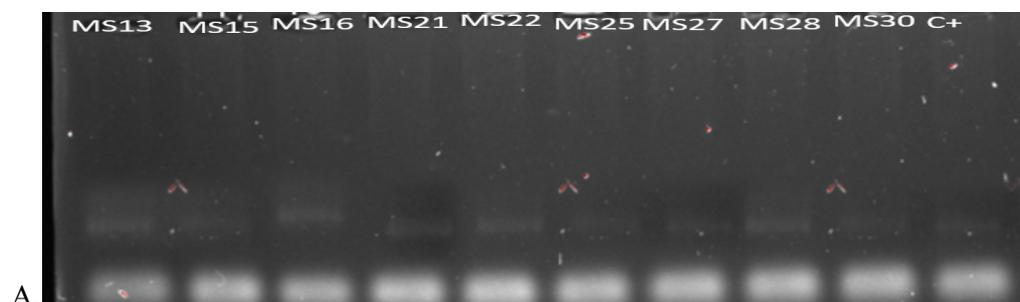
Anexo 1: 60 individuos de *Ilex guayusa* usados para la estandarización y análisis de diversidad genética y estructura poblacional de los marcadores microsatélites. Se incluye información de calidad de ADN, concentración (ng/ μ l) y coordenadas de recolección.

MS01	711,1	ng/ μ l	1,69	1,16	2° 17' 56.2999" S	78° 5' 37.2998" W
MS02	1170,8	ng/ μ l	1,78	1,19	02°17'57.0"S	078°05'03.2"W
MS03	324	ng/ μ l	1,74	1,1	02°17'57.0"S	078°05'47.2"W
MS04	496,3	ng/ μ l	1,6	0,92	02°18'07.8"S	078°05'59.0"W
MS05	827,9	ng/ μ l	1,53	0,23	02°17'20.9"S	078°05'36.6"W
MS07	525,9	ng/ μ l	1,74	1,07	02°17'03.7"S	078°05'17.1"W
MS09	4356,7	ng/ μ l	1,41	0,77	02°18'16.0"S	078°06'03.4"W
MS13	923,4	ng/ μ l	1,29	0,83	02°19'36.0"S	078°06'17.2"W
MS15	2319	ng/ μ l	1,99	1,51	02°20'39.8"S	078°06'36.6"W
MS16	1797,5	ng/ μ l	1,32	0,8	02°20'13.0"S	078°06'07.4"W
MS20	949,6	ng/ μ l	1,2	0,61	02°20'12.8"S	078°06'06.1"W
MS21	895,5	ng/ μ l	1,74	1,3	2° 20' 11.6999" S	78° 6' 4.7999" W
MS22	452,7	ng/ μ l	1,56	0,92	02°20'43.9"S	078°04'31.4"W
MS25	1420,8	ng/ μ l	1,69	1,14	02°20'31.2"S	078°04'23.2"W
MS27	639,9	ng/ μ l	1,66	1,13	02°20'30.2"S	078°04'26.1"W
MS28	721,7	ng/ μ l	1,52	0,97	02°18'29.4"S	078°06'06.6"W
MS30	2174	ng/ μ l	1,2	0,6	02°11'04.2"S	078°04'56.1"W
MS31	1740,2	ng/ μ l	1,29	0,64	02°10'36.2"S	078°04'46.5"W
MS32	550,8	ng/ μ l	1,75	1,16	02°10'31.6"S	078°04'45.3"W
MS34	1236,7	ng/ μ l	1,61	1,17	02°09'58.6"S	078°04'48.2"W
MS35	1078,7	ng/ μ l	1,5	0,88	02°09'52.0"S	078°04'51.0"W
MS36	852,3	ng/ μ l	1,63	1,06	02°09'02.4"S	078°05'03.6"W
MS38	950,3	ng/ μ l	1,5	0,98	02°08'53.2"S	078°05'07.8"W
MS39	692,3	ng/ μ l	1,84	1,4	02°08'51.7"S	078°05'07.8"W
MS40	1107,6	ng/ μ l	1,58	1,08	02°08'54.8"S	078°05'11.4"W
MS42	4723,3	ng/ μ l	1,36	0,63	02°08'51.1"S	078°05'07.5"W
MS44	842,6	ng/ μ l	1,7	0,96	02°08'50.3"S	078°05'07.4"W
MS46	1274,7	ng/ μ l	1,66	0,92	02°07'36.0"S	078°03'54.4"W
MS47	1807,5	ng/ μ l	1,68	0,94	02°07'36.9"S	078°03'57.8"W
MS48	447,7	ng/ μ l	1,8	1,07	02°05'46.9"S	078°03'14.3"W
MS49	543,3	ng/ μ l	1,43	0,64	02°05'44.1"S	078°03'12.6"W
MS51	685,7	ng/ μ l	1,56	0,82	02°05'45.3"S	078°03'11.7"W
MS53	787,8	ng/ μ l	1,43	0,22	02°05'37.8"S	078°03'09.5"W
MS54	168,9	ng/ μ l	2,11	0,45	02°05'38.7"S	078°03'08.3"W
MS58	620,1	ng/ μ l	1,47	0,18	02°05'42.7"S	078°03'08.3"W
MS60	194,2	ng/ μ l	1,63	0,88	02°05'43.8"S	078°03'07.0"W
MS63	580,2	ng/ μ l	1,7	0,88	2° 5' 47.2999" S	78° 3' 3.3998" W
MS66	379,1	ng/ μ l	1,43	0,37	02°09'02.0"S	078°05'36.2"W
MS67	345,7	ng/ μ l	1,92	0,81	02°08'45.2"S	078°06'00.3"W
MS68	573,4	ng/ μ l	1,98	1,4	02°08'39.5"S	078°06'02.7"W
MS70	238,2	ng/ μ l	1,75	0,88	02°08'36.8"S	078°06'06.1"W
MS71	191,9	ng/ μ l	1,73	4,95	02°09'01.5"S	078°04'59.0"W
MS72	3834,9	ng/ μ l	2,09	3,12	02°07'37.9"S	078°03'50.6"W
MS73	759	ng/ μ l	1,94	0,76	02°07'34.1"S	078°03'51.2"W
MS75	1391,9	ng/ μ l	2,03	2,3	02°07'35.4"S	078°03'47.4"W
MS76	1369,4	ng/ μ l	1,69	3,61	02°07'34.9"S	078°03'45.3"W
MS77	663,7	ng/ μ l	1,72	0,76	02°07'36.1"S	078°03'27.5"W
MS78	122,5	ng/ μ l	1,6	0,76	02°07'38.7"S	078°03'25.3"W
MS78	1391,9	ng/ μ l	2,03	2,2	02°07'45.5"S	078°02'43.8"W
MS79	4016,4	ng/ μ l	2,06	2,62	02°07'45.7"S	078°02'43.1"W
MS79	2621,6	ng/ μ l	1,62	0,56	02°07'46.5"S	078°02'40.5"W
MS81	468,2	ng/ μ l	1,53	2,2	02°07'40.6"S	078°02'06.7"W
MS82	763,8	ng/ μ l	1,65	0,7	02°07'23.5"S	078°01'58.7"W
MS82	972,8	ng/ μ l	1,66	3,64	02°24'16.1"S	078°09'27.2"W
MS83	1596,1	ng/ μ l	1,62	0,69	02°24'23.6"S	078°09'22.9"W
MS84	4204,5	ng/ μ l	1,99	2,16	02°24'24.0"S	078°09'20.2"W
MS86	2621,6	ng/ μ l	1,94	2,17	02°24'58.5"S	078°09'16.0"W
MS88	352	ng/ μ l	1,81	0,54	02°25'34.8"S	078°09'09.0"W
MS89	482,6	ng/ μ l	1,62	0,27	02°25'41.8"S	078°09'06.6"W
MS90	152,8	ng/ μ l	1,7	1,29	02°25'42.7"S	078°09'11.8"W
MS92	324	ng/ μ l	1,65	0,85	02°26'24.1"S	078°09'48.4"W

Anexo 2: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el ADN extraído de *Ilex guayusa* en la provincia de Morona Santiago (MS). Ladder 100 pb (Invitrogen). Muestras de la 1 a la 10 de Morona Santiago.

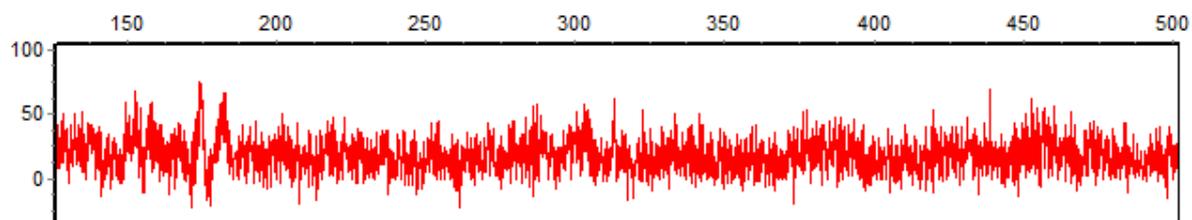


Anexo 3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para observar la amplificación de los loci microsatélites mediante el uso del sistema de tres primers a partir de las muestras de ADN de *Ilex guayusa* de Morona Santiago (MS). A. Amplificación con el primer GYS01 con las muestras MS13, MS14, MS16, MS20, MS21, MS22, MS25, MS27, MS28 Y MS30. Ladder 100 pb (Invitrogen), control positivo (C+) y control negativo (C-). B. Amplificación con el primer GYS20 con las muestras MS03, MS04, MS05, MS07, MS09, MS13, MS14, MS16, MS20, MS21, MS22, MS25, MS27, MS28 y MS30. Ladder 100 pb (Invitrogen), control positivo (C+) y control negativo (C-).

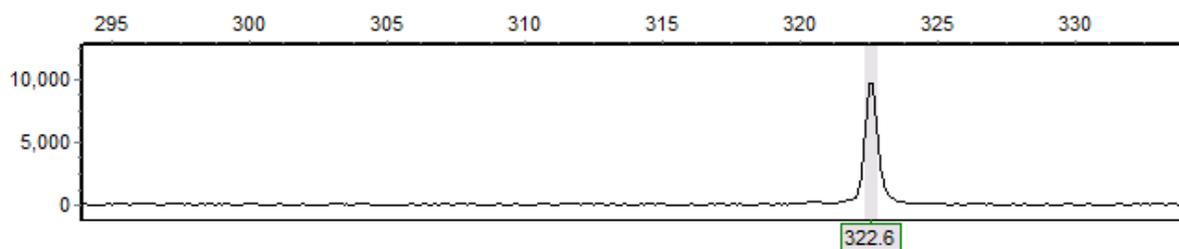


Anexo 4: Picos de fluorescencia generados después de la electroforesis capilar analizados en el software GeneMarker. A. Genotipado del primer GYS01 marcado con PET. B. Genotipado del primer GYS20 marcado con NED.

A.



B.



Se evidencia que, aunque existe amplificación en los dos casos, solo el primer GYS20 presenta un pico analizable en el genotipado de 322pb, mientras que el primer GYS01 no presenta ningún pico.