



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio Preliminar de la Diversidad Genética del Capulí (*Prunus serotina*) en 5 Provincias de la Región Andina de Ecuador Mediante el Uso de Marcadores Moleculares Microsatélites**

**JUAN JOSÉ GUADALUPE LÓPEZ**

María de Lourdes Torres, PhD, directora de tesis

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

Procesos Biotecnológicos

Quito, diciembre de 2012

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Estudio Preliminar de la Diversidad Genética del Capulí (*Prunus serotina*) en 5 Provincias de la Región Andina de Ecuador Mediante el  
Uso de Marcadores Moleculares Microsatélites**

**Juan José Guadalupe López**

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Director de la tesis y

Miembro de Comité de Tesis

---

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

---

José Tobar, MSc

Miembro del Comité de Tesis

---

Stella de la Torre, Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias

Biologicas y Ambientales

---

Quito, febrero del 2011

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

-----

Nombre: Juan José Guadalupe López

C. I.: 1721644084

Fecha:

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mis padres y mi hermana que me han apoyado toda la vida en cada uno de mis pasos, me han dado más de lo que han podido y no han dudado en ningún momento de mí. En verdad espero algún día poder retribuir todo ese cariño que han dado. Muchas gracias por creer en mí.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi familia que ha sido un pilar de apoyo toda la vida, a mis tíos, a mis primos y a mis abuelos, que con una sonrisa, una broma o un abrazo supieron levantarme cuando pensé que no lo iba a lograr. Por otro lado, quiero agradecer a mis compañeros de carrera (Daniel, Vivi, Bernardo, Cris, Dianita, Marisa) que más que amigos, se convirtieron en mi familia y me ayudaron en cada paso del proceso. A mis amigos de otras carreras (Chepo, Marieli, Rommel, Ale, Daniel S.) y los que me han acompañado desde el colegio (Nati, José) muchísimas gracias por estar conmigo siempre y por aguantarme cada locura o cada malgenio y por ser un oído para mí cuando más lo necesitaba.

Agradezco también a mis profesores María de Lourdes y Venancio que supieron confiar en mí y me ayudaron en cada duda o problema que se presentó en la realización de este trabajo.

No voy a olvidar nunca su apoyo y pienso que las palabras no son suficientes para darles las gracias a todos por todo lo que han dado por mí.

## Resumen

El capulí (*Prunus serotina*) es una especie tetraploide de la familia Rosaceae, originaria de Norteamérica, presente también en Centro América, Ecuador y Perú. La especie está distribuida ampliamente en la sierra ecuatoriana y tiene un gran valor para granjeros locales por la comercialización de su fruto y para crear cortinas rompe vientos en los campos agrícolas. Esta investigación constituye el primer estudio de diversidad genética para *P. serotina*, realizado en 5 provincias de la sierra ecuatoriana mediante el uso de 8 marcadores moleculares microsátélites heterólogos, provenientes de otras especies del género *Prunus*. Se analizó un total de 129 accesiones de capulí y se encontró un total de 48 alelos distintos en los 8 loci analizados. Con estos datos se generó una matriz binaria con la que se construyó un dendograma y un análisis de coordenadas principales (PCoA). Los resultados indican una alta diversidad genética intraespecífica, pero no se pudo establecer un patrón de agrupación por provincia, sino más bien una distribución aleatoria. Estos resultados preliminares muestran la necesidad de aumentar la fiabilidad del agrupamiento mediante el análisis de un mayor número de loci y evaluando la población con pruebas estadísticas específicas para especies tetraploides. Estos primeros datos muestran una alta posibilidad de realizar programas de mejoramiento y así ayudar a aumentar el potencial de explotación y conservación de este recurso biológico.

### **Abstract**

Black cherry (*Prunus serotina*) is a tetraploid species that belongs to the Rosaceae family, native to North America, but also found in Central America, Ecuador and Peru. This species is widely spread throughout the Ecuadorian highlands and has a great commercial value for local farmers due to its fruit and its use as a windbreak curtain in agricultural fields. This research represents the first study of genetic diversity for *P. serotina*, in 5 provinces of the Ecuadorian highlands using 8 heterologous microsatellite molecular markers from other species of the genus *Prunus*. A total of 129 accessions were analyzed and a total of 48 different alleles were found in the 8 analyzed loci. With these data, a binary matrix was generated with which a dendrogram and a principle coordinate analysis (PCoA) were built. The results indicate a high intraspecific genetic diversity and a random distribution of capuli throughout the provinces evaluated. This preliminary analysis shows the need to improve the clustering reliability through the use of a higher number of loci, and evaluate the population with specific statistical analysis for tetraploid species. These initial data show a high probability to perform breeding programs and thus increase the farming and conservation potential of this biological resource.



## **Tabla de Contenidos**

<b>1. Introducción</b> .....	<b>14</b>
1.1 <i>Prunus serotina</i> .....	14
1.2 Diversidad Genética .....	17
1.3 Marcadores Moleculares .....	18
1.3.1 Marcadores genéticos .....	18
1.3.2 Marcadores genéticos basados en el ADN .....	19
1.3.3 Marcadores moleculares Microsatélites.....	20
1.4 Programas de mejoramiento en base a marcadores moleculares .....	21
<b>2. Objetivo General</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Objetivos Específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>4. Área de Estudio</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Justificación</b> .....	<b>24</b>
<b>6. Materiales</b> .....	<b>25</b>
6.1 Colección de material vegetal .....	25
6.2 Extracción de ADN .....	25
6.3 Cuantificación de ADN.....	26
6.4 Amplificación de regiones microsatélites .....	26
6.5 Electroforesis en gel de agarosa .....	26
6.6 Electroforesis en gel de acrilamida .....	27

6.7	Tinción de Plata.....	27
<b>7.</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>28</b>
7.1	Recolección de accesiones de capulí.....	28
7.2	Toma de datos pasaporte.....	28
7.3	Extracción y cuantificación de ADN .....	29
7.4	Selección y Evaluación de Primers .....	30
7.5	Electroforesis en gel de Poliacrilamida.....	31
7.6	Toma de datos y análisis estadístico .....	31
<b>8.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
8.1	Extracción de ADN.....	32
8.2	Amplificación con primers heterólogos .....	32
8.3	Análisis de datos .....	33
<b>9.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>35</b>
<b>10.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>11.</b>	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>43</b>
<b>12.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>45</b>
<b>13.</b>	<b>Tablas.....</b>	<b>50</b>
<b>14.</b>	<b>Figuras .....</b>	<b>52</b>
<b>15.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>64</b>

## Contenido de tablas, figuras y anexos

### Tablas

<b>Tabla 1.</b> Primers microsatélites seleccionados para la determinación de variabilidad genética en una colección de capulí de 5 provincias de la sierra ecuatoriana. (Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo y Carchi).....	50
<b>Tabla 2.</b> Resumen de las muestras colectadas e información obtenida en los análisis moleculares para cada una de las provincias analizadas en el estudio .....	51
<b>Tabla 3.</b> Valores de bootstrap representativos (> a 65) por provincia .....	51

### Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa georeferenciado que muestra los lugares en donde fueron colectadas las muestras de Carchi, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi y Chimborazo. El programa utilizado fue ARCGIS v.10 * .....	52
<b>Figura 2.</b> Electroforesis en gel de Agarosa 1,5% de ADN genómico de 15 muestras de capulí de la provincia de Tungurahua. Se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen) o marcador de peso molecular, seguido de las muestras T1 al T15. ....	53
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación en una PCR de estandarización, usando los pares de primers de códigos A, B, C y D (Tabla 1). Orden del gel: Ladder (L = 100bp (Invitrogen)); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el primer A (A1-A4); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el primer B (B1-B4); cuatro	

muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el primer C (C1-C4); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el (D1-D4). Se observan bandas de 150 a 170 pb..... 54

**Figura 4.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de amplificación con el Primer B en 5 muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua. Se probó temperaturas de annealing de 61 y 62°C. No hay diferencias aparentes en la eficiencia de amplificación al comparar las dos temperaturas..... 55

**Figura 5.** Amplificación de primer L para muestras de Tungurahua. En el primer carril se observa el Ladder de 10 bp. Seguido de muestras de Tungurahua (T1-T9). Se muestran también los 6 alelos encontrados: A', A, B, C, D, E. El tamaño de banda esperado fue de 98-111 pb..... 56

**Figura 6.** Dendograma realizado a partir de la matriz binaria, con las 129 muestras, usando el programa NT-SYS 2.21. Se observa la formación de 9 grupos de los cuáles 2(6 y 7) contienen muestras de las cinco provincias estudiadas, 3 (1, 2 y 5) de cuatro provincias, 3 (3, 4 y 9) de 3 provincias y únicamente 1 (8) contiene muestras solo de una provincia. .... 57

**Figura 7.** PCoA obtenido de la matriz binaria con datos de las 129 muestras, usando el programa DARwin 5.0.158..... 58

**Figura 8.** Dendogramas para cada provincia realizados usando el programa NT-SYS 2.21 mediante el método de agrupación UPGMA..... 59

**Figura 8. 1.** Carchi ..... 59

**Figura 8. 2.** Chimborazo ..... 60

**Figura 8. 3.** Cotopaxi ..... 61

**Figura 8. 4.** Imbabura..... 62

**Figura 8. 5.** Tungurahua..... 63

## **Anexos**

**Anexo 1.** Registro de Acciones ..... 64

## 1. Introducción

### 1.1 *Prunus serotina*

El capulí, *Prunus serotina*, es una especie arbórea originaria de Norte América, aunque también se la considera endémica de Ecuador, México y Perú, donde sus usos como fruto comestible datan desde el tiempo de los Incas (Downey e Iezzoni, 2000; Popenoe y Pachano, 1922; Fresnedo-Ramirez et al, 2011).

En los Andes Ecuatorianos, la distribución de esta especie es abundante y es altamente valorada por los granjeros locales, tanto por el fruto como por su uso para construir cortinas rompe vientos en los campos agrícolas. Su tendencia de crecimiento es mesofítica, es decir, crece entre clima medio seco e inundado, por lo que se encuentra confinada en cañones, valles y otros sistemas de drenaje junto a árboles deciduos (específicamente reportado en Norte América) (Auclair y Cottam, 1971). En el Ecuador se reporta una distribución altitudinal entre 1800 a 3350 metros y una intolerancia al crecimiento en zonas de sombra, en la cual los árboles lucen cortos, pierden su vigor o incluso mueren (Auclair y Cottam, 1971).

En América del norte, el fruto del capulí no es valorado como en la Región Andina, ya que su tamaño es menor a 10 mm en comparación con el fruto de nuestra región que puede llegar a medir hasta 3.5 cm de diámetro. Se piensa que esta diferencia de tamaño surgió por la domesticación y selección por nativos en América Central (Downey e Iezzoni, 2000; Popenoe y Pachano, 1922). En Estados Unidos y Canadá la distribución de la planta se sitúa en los bosques deciduos del este y en las áreas semiáridas o áridas del sur este y México (Auclair y Cottam, 1971). En América del Norte la importancia de esta especie

radica en la calidad de su madera (Downey e Iezzoni, 2000). A pesar de ello, solo el 10% de los árboles son suficientemente rectos o libres de defectos para ser utilizados en la industria maderera, por lo que programas de mejoramiento resultan de alto interés (Maynard, 1994).

El cultivo de capulí también se ha llevado a bosques europeos en Escandinavia y en las islas británicas con el fin de restaurar hábitats con suelos pobres, de allí que se conozca la cualidad de esta especie para recuperar nutrientes del suelo (Muys et al., 1992; Auclair y Cottam, 1971).

En el Ecuador, no se ha consolidado un programa de cultivo de esta especie. Su comercialización se basa únicamente en la recolección de frutos por parte de campesinos en toda la Sierra Ecuatoriana, la producción apenas satisface el mercado local en determinadas temporadas del año (J. Tobar, comunicación personal, 15 Octubre 2011).

En cuanto a su clasificación taxonómica, *Prunus serotina* pertenece a la familia Rosaceae y estudios de filogenética lo ubican en un clado cercano a los subgéneros *Padus* y *Laurocerasus* (Pairen y Jacquemart, 2008). Se compone de 5 subespecies botánicas que han sido establecidas en base a características morfológicas de hojas, flores y frutos, clasificación que ha sido ampliamente discutida por su ambigüedad (Fresnedo-Ramirez et al, 2011).

El árbol puede llegar a medir 15 metros de altura en individuos vistos en Ecuador, mientras que en México y América Central es de tan solo 10 metros, también es común que

se presente en forma arbustiva. En los primeros años de crecimiento es delgado y crece en forma piramidal, más tarde la copa del árbol se expande (Popenoe y Pachano, 1922).

Las hojas son oblongas, lanceoladas y acuminadas en el ápice con un tamaño entre 7 a 12 centímetros, su borde es aserrado, y se distinguen por un color verde oscuro y brillante. Las flores nacen en racimos, son blancas y suelen desprender una fragancia distintiva (Popenoe y Pachano, 1922). El ovario de las flores es libre y sésil, unilocular con dos óvulos, el estilo es simple con estigma peltado (Mille, 1942).

El fruto es una drupa globosa que se da en racimos delgados, cuando se encuentra maduro suele tener un color negro, con una cáscara delgada, la carne es jugosa y con un sabor entre dulce y amargo. En cuestión de tamaño se han encontrado frutos con diámetros de hasta 2,5 cm en la serranía ecuatoriana (Popenoe y Pachano, 1922). En el Ecuador, el capulí florece en enero y sus frutos maduran en Julio (Popenoe y Pachano, 1922). La producción de semillas es abundante, y su dispersión por aves es amplia, el sistema radicular es superficial (Popenoe y Pachano, 1922).

El capulí ha tenido usos medicinales desde tiempos prehispánicos, específicamente para enfermedades como diarrea e inflamaciones respiratorias asociadas con la tos. Probablemente el uso del capulí en estas enfermedades se debe a la gran gama de compuestos fenólicos como taninos y flavonoides, de los que se conoce sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y su capacidad para remover oxígeno reactivo y radicales libres. Dos antocianinas ya reportadas en capulí son la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinosido (Jimenez et al. 2011).



## 1.2 Diversidad Genética

La diversidad biológica se define como la variación presente en los seres vivos. La diversidad ocurre en tres diferentes niveles: diversidad genética o la variación en genes y genotipos, diversidad de especies y diversidad de ecosistemas. La biodiversidad ha ganado mayor importancia durante las últimas décadas. Se la considera esencial para permitir un desarrollo sustentable en varias actividades del ser humano; ésta puede, por ejemplo, contribuir al desarrollo de sistemas económicos y sociales que permitan alcanzar una soberanía alimentaria (Rao y Hodgkin, 2002).

Los recursos genéticos vegetales se encuentran entre los recursos naturales más importantes del mundo, por lo que su conservación requiere muchísima atención. En los últimos años se han incrementado los esfuerzos para realizar conservación in situ de estos recursos, incluyendo los parientes silvestres de los principales cultivos (Rao y Hodgkin, 2002).

La agroindustria desarrollada en las últimas décadas ha tenido una tendencia a la siembra de cultivares mejorados de especies de interés, provenientes de un limitado número de líneas élites, lo que tiende a reducir la base genética de los cultivos. Esto en conjunto con el cultivo a gran escala ha aumentado la vulnerabilidad genética de las principales especies usadas agrónomicamente, produciendo catástrofes como la pérdida de resistencia a determinados parásitos o virus, destruyendo cultivos completos. Muchos de estos eventos han sido sobrellevados por programas de mejoramiento utilizando diversas fuentes de recursos genéticos. Por esta razón la diversidad genética puede ser utilizada

como defensa contra los problemas causados por la vulnerabilidad genética (Rao y Hodgkin, 2002).

La diversidad genética es la base para la supervivencia y la adaptación. Muchos procesos de extinción pueden deberse a factores de estrés biótico o abiótico, causados por competencia, parasitismo, enfermedades, aislamiento, alteración de hábitat, cambio climático, catástrofes naturales, o actividades humanas, por lo que conocer y comprender la diversidad genética en los recursos genéticos de las plantas es esencial para su conservación y uso (Rao y Hodgkin, 2002).

### 1.3 Marcadores Moleculares

#### 1.3.1 Marcadores genéticos

Marcador molecular es el nombre que se le da a cualquier fragmento de ADN que indique una determinada posición en un genoma, y que tenga una expresión identificable. Un marcador genético ideal debe cumplir algunas condiciones: ser de fácil detección en todas las fases fenotípicas, ser codominante, tener una expresión temprana en el desarrollo de un individuo, no interactuar con otros marcadores, requerir cantidades mínimas de material para ser identificado, tener una distribución homogénea en el genoma y presentar un alto nivel de polimorfismo o un gran número de variantes (Cubero, 2002).

Los marcadores genéticos son herramientas clave para la identificación de plantas y el mejoramiento de las mismas. La tecnología de marcaje genético ha ido evolucionando conforme pasa el tiempo, los primeros marcadores fueron morfológicos pero la información obtenida de los mismos estaba limitada por el número de variables de los que

se podía obtener información como forma de las hojas, número de hojas, entre otras. Estos no muestran codominancia y generalmente requieren que la planta tenga un desarrollo completo (Cubero, 2002). Estas falencias fueron superadas por métodos basados en el ADN (Henry, 2013).

### 1.3.2 Marcadores genéticos basados en el ADN

Los marcadores genéticos basados en ADN se fundamentan en la técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* inventada por Kary Mullis de la corporación Cetus en 1983, es usada para replicar o amplificar una región específica del ADN miles de millones de veces en pocas horas. Esta amplificación es dirigida por primers u oligonucleótidos diseñados como secuencias complementarias a los nucleótidos que flanquean las regiones que se desea amplificar (Loeffelholz y Deng, 2006). El fundamento técnico de este procedimiento consiste en realizar un ciclo que consta de los siguientes pasos: denaturación de las hebras de ADN, anidación de los primers con las regiones donde exista complementariedad y extensión de la cadena copiada mediante la intervención de una ADN polimerasa que une nucleótidos libres presentes en la matriz de la reacción. Este ciclo debe repetirse un número elevado de veces para conseguir una cantidad de amplificación significativa que pueda visualizarse mediante otras técnicas de laboratorio como electroforesis (Ferralli et al, 2007).

El desarrollo de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a finales de 1980 provocó un cambio en los análisis de ADN incluyendo el marcaje del mismo. Los métodos de análisis basados en PCR remplazaron a los anteriores por su alta sensibilidad, su alto

poder de discriminación y su facilidad de automatización. La poca información que se tenía de las secuencias en un inicio limitaba la aplicación de la PCR por lo que comenzaron a nacer técnicas basadas en amplificación arbitraria para generar marcadores como los RAPDs y los AFLPs. Mientras la cantidad de secuencias con las que se contaba aumentó, las técnicas que usaban PCR se dedicaron a amplificar secuencias polimórficas conocidas. Así las diferencias en el tamaño del fragmento o en la secuencia del mismo fueron detectadas con facilidad (Henry, 2013).

Las ventajas que tienen estos marcadores son su facilidad de detectar variaciones con mínima cantidad de material, pueden detectarse en cualquier estado de desarrollo, están distribuidos por todo el genoma y muchos de éstos son codominantes (Cubero, 2002).

### 1.3.3 Marcadores moleculares Microsatélites

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), son repeticiones en tándem de mono, di, tri, o tetra unidades de nucleótidos. Los más frecuentes son  $(A)_n$ ,  $(TC)_n$ ,  $(TAT)_n$ ,  $(GATA)_n$ ; el valor de  $n$  podría ir desde unas pocas unidades hasta varias decenas de unidades. Estos patrones son comunes en eucariotas, lo que significa que una SSR puede estar presente en cientos de copias en el genoma de la especie. En plantas, se ha estimado que estas secuencias repetidas se encuentran entre cada 30 a 100kb en el caso de dinucleótidos y en frecuencias similares para tri y tetranucleótidos (de Vienne, 2003).

Probablemente, estas secuencias surgieron a partir de secuencias no repetidas que sufrieron inserciones o sustituciones, creando estas repeticiones en tándem. Posteriormente, estas secuencias tendieron a expandirse, por mecanismos como el deslizamiento de la

polimerasa en la replicación. Este fenómeno dio lugar a modificaciones en el número de las secuencias microsatélites en tándem lo que le añade poder al uso de SSRs como marcadores moleculares. Además de estar distribuidos en todo el genoma, su alta tasa de polimorfismo los vuelve ideales para análisis de genética de poblaciones, mapeo genético, estudios evolutivos, fingerprinting y análisis de pedigree (de Vienne, 2003). Los SSR son reconocidos en la actualidad como uno de los marcadores moleculares más importantes. En estudios de diversidad genética son usados por su hipervariabilidad su abundancia y su simple diagnóstico por PCR (Lorz y Wenzel, 2008; Downey e Iezzoni, 2000).

El uso de estos marcadores suele ser restringido por el costo que implica identificarlos a partir de una librería de ADN y la secuenciación de los fragmentos seleccionados. Pero si los primers diseñados para amplificar un loci en una especie determinada son usados para amplificarlo en otra especie relacionada, los costos y tiempo necesarios para generar este tipo de marcadores disminuyen; a esto se conoce como marcadores heterólogos. En el caso del género *Prunus* se conocen primers SSR para sweet cherry, sour cherry y durazno; los cuales fueron usados en el presente estudio. El éxito de la amplificación con primers heterólogos depende de las distancias evolutivas de la especie con la especie original (Downey e Iezzoni, 2000).

#### 1.4 Programas de mejoramiento en base a marcadores moleculares

El mejoramiento de las especies vegetales es fundamental y ha sido un objetivo de la humanidad desde el inicio de la agricultura. Como resultado de los primeros regímenes de domesticación, el ser humano ha originado cuellos de botella genéticos, conllevando a que sean pequeñas fracciones del pool genético inicial las que aún se mantienen. Por esta

razón, el uso de marcadores moleculares es una herramienta extremadamente útil para distinguir germoplasma de interés y variabilidad genética, con lo cual se puede realizar introgresiones de características deseadas en las especies vegetales (Ferne et al, 2006).

Los desarrollos en genómica han permitido encontrar nuevas herramientas para descubrir y señalar alelos y genes que podrían resultar interesantes, estas herramientas pueden mejorar la eficiencia de programas de cruces siendo usados en programas de selección asistida. Así, se puede seleccionar secuencias o genes que se quieren en un cultivo y seguirlos en cruces para lograr un resultado deseable (Xu y Crouch, 2008).

La selección, siendo un proceso sistemático, consiste en la identificación de individuos superiores que coexistan con individuos de la población. Estos individuos pueden ser usados como parentales para una siguiente generación, así la selección cambia la estructura genética de las poblaciones como resultado de preservar alelos de importancia y descartar aquellos que no se desean. Para el mejoramiento por selección, se necesita descubrir la variabilidad genética y luego la selección de genotipos con características favorables. Para lograr que estas características se transmitan eficientemente, el uso de marcadores moleculares es en extremo útil (Budak et al, 2004).

En base a la información analizada, este estudio pretende ser una primera aproximación para conocer la diversidad genética del capulí en 5 provincias de la Región Andina del Ecuador. Por medio de marcadores moleculares SSRs, se analizó la diversidad genética existente en 8 loci, con el fin de obtener información que pueda ser útil para un

futuro establecimiento de un programa de mejoramiento y conservación de esta especie en nuestro país.

## **2. Objetivo General**

- Mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites, determinar la variabilidad genética del capulí en 5 provincias de la Sierra ecuatoriana: Carchi, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo.

## **3. Objetivos Específicos**

- Establecer un protocolo de extracción de ADN de capulí.
- Determinar el porcentaje de transferibilidad de primers heterólogos a capulí.
- Determinar la diversidad genética de capulí usando marcadores microsatélites.
- Generar agrupamientos en base a similitud para inferir patrones de distribución de la especie.

## **4. Área de Estudio**

El material vegetal utilizado en el proyecto fue colectado de 5 provincias de la sierra ecuatoriana: Chimborazo, Cotopaxi, Carchi, Imbabura y Tungurahua. Dado que el capulí es un árbol usado como fuente de alimento y como rompe vientos se tomó las muestras de campos dedicados a la agricultura, de casas en el campo y de los lados de la carretera (Anexo 1). La extracción de ADN, las amplificaciones y el análisis estadístico

fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Quito- Ecuador.

## **5. Justificación**

El capulí (*Prunus serotina*), es un árbol que crece en la sierra ecuatoriana a altitudes entre 2000 y 3000 msnm. El alto rango de distribución del capulí y su alto grado de adaptabilidad a climas cambiantes, a diferentes suelos y a factores biológicos es un indicativo de su variabilidad genética (Auclair y Cottam, 1971).

En Ecuador, el capulí aún no se constituye como un cultivo, sino que se lo planta en los bordes de los campos para delimitarlos y proveer protección contra el viento. Los frutos se los cosecha en familia y se los comercializa de manera artesanal en los mercados locales. Se conoce también que es empleado para la obtención de un licor destilado (Popenoe y Pachano, 1922). El fruto tiene gran potencial debido a su sabor, el cual es muy apetecido por la población y por sus propiedades medicinales, su alto contenido de antocianinas y otros factores alimenticios (Jimenez et al, 2011). La alta calidad de la madera de capulí podría también ser explotada, como ocurre en América del Norte.

En el país no se han emprendido tareas de colección de germoplasma y determinación de la diversidad genética que son las bases sobre las que se sustenta el mejoramiento genético. De estudios realizados en otras latitudes se conoce que el rendimiento en términos de germinación o de producción en el caso de la fruta, está influido por las zonas geográficas, por los polinizadores o por el genotipo de la planta, lo



que indica que cruces y selección dirigida podrían llevar a mejoras genéticas (Maynard, 1994).

Así, el presente proyecto proveerá información importante de la diversidad de esta especie de gran potencial de uso en la agricultura y en la industria agroforestal. Los resultados iniciales que se obtengan resultarán útiles para emprender programas de mejoramiento y conservación de germoplasma en búsqueda de generar un cultivo con características de interés comercial de *P. serotina* en el Ecuador.

## **6. Materiales**

### 6.1 Colección de material vegetal

El material biológico utilizado en este estudio, frutos maduros y hojas jóvenes, fue colectado en las provincias de Carchi, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi y Chimborazo (Figura 1 y Anexo 1).

### 6.2 Extracción de ADN

- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Buffer de extracción CTAB 2X
- Isopropanol
- Nitrógeno líquido
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)

- Tubos Eppendorf 1.5mL
- 2, B-mercaptoetanol

### 6.3 Cuantificación de ADN

- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- NANODROP 1000 (Thermo Scientific)

### 6.4 Amplificación de regiones microsatélites

- Taq ADN polimerasa 5U/μL (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTPs 10 mM (Invitrogen)
- Set de Primers (Tabla 1)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

### 6.5 Electroforesis en gel de agarosa

- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR
- SeaKem® LE Agarose
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell®)

- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- TBE 1X (Tris – Acido Borico – EDTA)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)

#### 6.6 Electroforesis en gel de acrilamida

- UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)
- UltraPure™ N,N' - Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 10X (Tris – Acido Borico – EDTA)
- UltraPure™ UREA (Invitrogen)
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethilenediamine)
- Sigmacote ® (SIGMA)
- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)
- Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)
- Bind-Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane)
- Solución de tratamiento de vidrios (etanol 96 %, ácido acético 0.5% )
- Rain.X™
- Ladder 10bp (Invitrogen)
- Buffer de carga ( Glicero , Azul de Bromofenol)
- Etanol 70%

#### 6.7 Tinción de Plata

- Cámara de fotos Canon XPOSZ

- Transiluminador de luz blanca
- Agua destilada
- Ethyl Alcohol Denatured (J.T. Baker)
- Ácido Acético Glacial (MERCK)
- Nitrato de Plata (FISHER)
- Formaldehído 37% (MERCK)
- Hidróxido de Sodio (MERCK)

## **7. Métodos**

### **7.1 Recolección de accesiones de capulí**

Se visitó 41 localidades en las provincias de Tungurahua, Imbabura, Cotopaxi, Chimborazo y Carchi en busca de árboles de capulí con frutos maduros (Anexo 1 y Figura 1). De cada sitio se tomó una muestra de alrededor de 5 hojas jóvenes para la extracción de ADN y 10 frutos maduros/accesión. Las semillas fueron almacenadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ debidamente identificadas y documentadas. Se intentó cubrir la mayor extensión de las provincias donde existía producción de capulí. Los datos de la colección realizada pueden ser observados con mayor detalle en la Tabla 2.

### **7.2 Toma de datos pasaporte**

En los sitios de colección se tomó los siguientes datos pasaporte: edad del árbol (de acuerdo al tamaño), estructura del tronco pudiendo ser erecta o dispersa, altitud en metros sobre el nivel del mar y la posición referenciada por un GPS (Anexo 1 y Figura 1).

### 7.3 Extracción y cuantificación de ADN

A partir de las hojas de capulí colectadas en cada una de las localidades se procedió a la extracción de ADN siguiendo un protocolo a base de CTAB (Kieleczawa, 2006), con ciertas modificaciones que se detallan a continuación. En un mortero se congeló y pulverizó 80 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido y se adicionó 800  $\mu$ l de CTAB y 8  $\mu$ l de  $\beta$ - mercaptoetanol. La mezcla se colectó en un tubo Eppendorf y se incubó por 1 hora en un baño de arena a 62°C con agitación cada 15 minutos. A esto se añadió 500  $\mu$ l de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y se dejó la solución en reposo por 20 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13200 rpm por un periodo de 20 minutos, y se recuperó el sobrenadante. Se añadió 800  $\mu$ l de isopropanol y se mezcló para precipitar el ADN. Para formar el pellet, se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm, se descartó el isopropanol y se lavó el pellet con etanol al 70%. Finalmente, se eliminó el etanol y se resuspendió el pellet en TE (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8).

Posterior a la extracción y a la cuantificación de ADN, la calidad de las muestras se evaluó mediante la visualización en un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD), a partir de electroforesis de geles de agarosa al 1,5 % con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) (Figura 2) y mediante espectrofotometría medida usando un Nanodrop 1000.

El ADN de todas las accesiones fue conservado a tres concentraciones: Stock (concentración original), 50ng/ $\mu$ l y 10 ng/ $\mu$ l. Estas muestras se almacenaron a -20°C para su uso en los análisis moleculares.

#### 7.4 Selección y Evaluación de Primers

Para seleccionar los primers, se realizó una búsqueda de publicaciones relacionadas con estudios moleculares en el género *Prunus*, y se encontró algunos primers heterólogos, desarrollados para otras especies como sweet cherry (*Prunus avium*) (Downey e Iezzoni, 2000), sour cherry (*Prunus cerasus*) (Downey e Iezzoni, 2000), y durazno (*Prunus persica*) (Testolin et al, 2000; Pairon y Jacquemart, 2005). A partir de toda la bibliografía consultada se seleccionó 12 primers (1 de sour cherry, 1 de sweet cherry y 10 de durazno) (Tabla 1).

Cada par de primers fue probado en reacciones de amplificación por PCR usando muestras de ADN de capulí al azar y estandarizando el ciclaje de cada reacción (Figura 3). Finalmente, se escogió 8 de los 12 primers inicialmente seleccionados para las amplificaciones definitivas (Códigos de los Primers: A, B, C, D, F, G, I, L).

Las reacciones de PCR definitivas consistieron en el uso de 15-20 ng ADN, Buffer de PCR (1X) (Invitrogen), 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.2 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), 0.5 mM de dNTPs (Invitrogen) y 0.2 mM de cada primer (Downey, 2000).

El programa de amplificación consistió en una temperatura inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, temperaturas de annealing que dependían del primer (48-63°C) (Tabla1) por 1 minuto y 45 segundos a 72°C para extensión y finalmente, un período de extensión final de 8 minutos a 72°C (Tabla 1) (Taberlet et al, 1991).

### 7.5 Electroforesis en gel de Poliacrilamida

Se usó un protocolo basado en el de Benbouza (2006) con ciertas modificaciones; se limpió tanto el vidrio del gel como el vidrio de la cámara de electroforesis de acrilamida (BIORAD) con Alconox, usando Kimwipes, al estar ambos secos se los limpió con alcohol al 70% y se los trató con Bind-Silane y Sigmacote respectivamente. Se armó la cámara siguiendo las instrucciones del fabricante y se añadió 100 mL de una solución de poliacrilamida (urea 5M, acrilamida: bisacrilamida 19:1). Una vez polimerizado el gel, se cargo 5ul del producto de PCR después de añadir buffer de carga y denaturar a 90 grados por 6 minutos. Las condiciones de corrida consistieron en 2 horas y media a 80 watts, seguida de tinción con nitrato de plata (Figura 4 y 5) (Benbouza, 2006).

### 7.6 Toma de datos y análisis estadístico

A partir de la visualización del perfil de bandas para cada microsatélite en toda la población, se construyó una matriz binaria a base de presencia o ausencia de determinado alelo (1, 0 respectivamente). A través del software estadístico NT-SYS 2.20 (Rohlf, 2008), se realizó un dendograma usando una matriz de similitud (simple matching), posteriormente se hizo un análisis de agrupamiento a base del método UPGMA en la opción SAHN del programa tanto para las 129 accesiones, como para cada provincia por separado.

Por otro lado, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) usando el paquete estadístico Dissimilarity Analysis and Representation for Windows (DARwin 5.0.158) (Perrier, Jacquemoud-Collet, 2006) usando una matriz de disimilaridad, y el

coeficiente DICE; el gráfico se elaboró con la opción Factorial Analysis del mismo programa.

Finalmente, se realizó un análisis de Bootstrap usando el software WinBoot (Yap y Nelson, 1996), mediante una matriz de similitud con el fin de determinar el nivel de confianza de los agrupamientos encontrados.

## **8. Resultados**

### 8.1 Extracción de ADN

Se extrajo ADN de las 129 muestras colectadas en las cinco provincias. El protocolo de extracción de ADN utilizado mostró ser válido para la especie y rindió altas concentraciones de buena calidad (Tabla 2 y Figura 2).

### 8.2 Amplificación con primers heterólogos

Se probaron doce primers heterólogos (1 de sweet cherry, 1 de sour cherry, 10 de durazno) (Downey e Iezzoni, 2000; Pairen y Jacquemart, 2005; Testolin et al, 2000) (Tabla 1), los cuales fueron evaluados para determinar su utilidad en el estudio de diversidad genética en el capulí. En la publicación de Downey e Iezzoni (2000) se reporta amplificación satisfactoria para muestras de capulí (*Prunus serotina*), donde se encontraron 54 alelos en 66 muestras de Estados Unidos, México y Ecuador; el objetivo de este paper era precisamente demostrar que podía usarse primers heterólogos a partir de otras especies de *Prunus* en capulí. De los 12 primers probados, 8 fueron usados en el análisis de la totalidad de muestras debido a que mostraron amplificación polimórfica y permitieron una fácil visualización en geles de poliacrilamida (Figura 4 y 5) (Tabla 1). A fin de mejorar la



visualización de los resultados en geles de poliacrilamida al 6% se hicieron ciertos ajustes en las temperaturas de annealing (Figura 4). Las muestras de capulí amplificadas mediante PCR con los primers seleccionados mostraron ser polimórficas en todos los casos con un número de alelos por locus microsatelite que varió entre 3 y 10. El primer que resultó ser más informativo fue el A proveniente de sour cherry y el menos informativo fue el F proveniente de durazno. En total se pudo identificar 48 alelos en los 8 loci para toda la población.

### 8.3 Análisis de datos

A partir de los geles de poliacrilamida se realizó una matriz binaria de los datos tomando 1 como presencia de un alelo y 0 como su ausencia. Se tomaron como alelos las bandas (dobles por la denaturalización del ADN) que se encontraban en el tamaño esperado reportado en la especie de origen, o en tamaños cercanos (Tabla 1). El número de alelos encontrados para cada primer se presenta también en la Tabla 1. La matriz obtenida con todos los primers fue usada posteriormente para los análisis de agrupamiento y de dispersión realizados para la totalidad de las muestras.

En el dendograma realizado para todas las muestras, se pudo apreciar la formación de 9 grupos (señalados con números del 1 al 9 en el mismo) (Figura 6). Se encontró que únicamente el grupo 8 tiene muestras que pertenecen a una sola provincia, Cotopaxi, pese a que otras muestras de esta provincia se encuentran distribuidas por todo el dendograma. En los demás grupos se observó predominancia de ciertas provincias como Imbabura en el grupo 7 o Chimborazo en el grupo 3, pero no se tiene un agrupamiento determinado por la ubicación geográfica de la colección. Se realizó un bootstrap con la matriz binaria con 400

permutaciones para respaldar la información obtenida en el dendograma, la mayoría de valores de bootstrap fueron bajos o menores a 60% con excepción de dos agrupamientos con valores altos o mayores a 65%. Estos fueron H12 – H13 en la provincia de Chimborazo, provenientes de Huayco Pungo (65,1) y Imb 4-Imb5 de la localidad Calpi, en la provincia de Imbabura (76.7) (Tabla 3).

En el Análisis de Coordenadas Principales, se pueden observar las muestras distribuidas por distintos colores de acuerdo a cada una de las provincias. Azul corresponde a Tungurahua, gris a Chimborazo, rosa a Cotopaxi, verde a Carchi y naranja a Imbabura (Figura 7). Al igual que en el dendograma, la distribución no está determinada por la ubicación geográfica de las muestras. Sin embargo, se observa una predominancia de las muestras de Tungurahua y Chimborazo en los cuadrantes superior e inferior izquierdo, mientras que en el cuadrante superior e inferior derecho se observan conjuntos de las muestras de Cotopaxi, Carchi e Imbabura.

Se realizó también un análisis individual para cada provincia. La información sobre el número de muestras, número de alelos identificados por provincia y coeficientes de distancia resultantes del análisis UPGMA se presentan en la Tabla 2. Como resultado de este análisis se encontró los coeficientes de distancia más altos en el dendograma para las provincias de Chimborazo, Tungurahua e Imbabura lo cual indica que las mayores diferencias interpoblacionales se encuentran en estas provincias. Los dendogramas realizados para cada provincia se presentan en la Figura 8. Estos dendogramas respaldan la información ya expuesta, en las provincias de Chimborazo, Tungurahua e Imbabura se

encuentra la mayor dispersión de muestras mientras que Carchi aparece como la provincia con la dispersión más limitada.

## **9. Discusión**

Los estudios de diversidad genética son una fuerte base para emprender programas de mejoramiento en especies vegetales así como para comprender el estado de las poblaciones y llevar a cabo control y conservación de las mismas (Ferne et al, 2006). Siendo el capulí una especie conocida en el país y con un amplio potencial en la industria agrícola, se realizó un análisis preliminar de diversidad genética a partir de muestras colectadas en 5 provincias de la sierra ecuatoriana usando marcadores microsatélites con primers heterólogos.

Se probó doce primers heterólogos (1 de sweet cherry, 1 sour cherry y 10 de durazno) de los cuales 8, es decir, el 67%, pudieron ser transferidos al capulí, 4 de éstos (1 de sweet cherry, 1 de sour cherry y 6 de durazno) ya se habían usado previamente en un estudio en capulí por Downey e Iezzoni en el 2000 y resultaron ser muy informativos y polimórficos. Los otros 4 se desarrollaron en durazno (Pairol y Jacquemart, 2005) (Testolin et al, 2000) y también se tuvo éxito en la amplificación. Las temperaturas de annealing tuvieron que ser estandarizadas en la mayoría de casos mediante PCR en gradiente (Tabla 1).

Con los restantes 4 primers heterólogos ensayados (Pairol y Jacquemart, 2005; Testolin et al, 2000) (Tabla 1) pese a modificar algunas variables, los resultados no fueron

los esperados; el tamaño de las bandas encontrado no pertenecía al rango esperado o simplemente no hubo amplificación.

El uso de primers heterólogos se justifica porque el desarrollo de microsatélites suele resultar costoso por la necesidad de aislarlos de bibliotecas genómicas, aun así las regiones flanqueantes de estos suele ser muy conservadas en especies familiares por lo que los primers diseñados para una especie pueden ser utilizados para el estudio de genomas de especies emparentadas. En el caso del género *Prunus* se ha establecido que existe un porcentaje de transferencia de 75.6% del durazno hacia otras especies del género (Dirlewanger et al, 2002; Cipriani et al, 1999). Con este estudio se puede corroborar la eficiencia de esta transferencia que fue del 67%. En varios estudios realizados en el género *Prunus* se ha reportado que al utilizar primers heterólogos su transferibilidad depende de su secuencia y muchas veces es independiente de la especie de la que proviene y su distancia genética con la especie en estudio. Estas publicaciones manifiestan que la cercanía de una especie con otra en estudio tiene mayor relevancia cuando se utiliza primers heterólogos entre géneros que en especies clasificadas en un mismo género (Downey e Iezzoni, 2000). La eficiencia de la transferibilidad de primers de una especie a otra depende mucho de cada género. Por ejemplo, en el estudio realizado por Torres et al. (2008) se encontró una transferibilidad del 27% al utilizar microsatélites de papa (*Solanum tuberosum*) en naranjilla (*Solanum quitoense*) y sus parientes silvestres.

Los resultados obtenidos del análisis de 8 loci microsatélites en las 129 accesiones del estudio muestran una distribución aleatoria de las muestras. Es decir, pese a que una opción era encontrar un patrón de distribución por provincia, ni en el dendograma ni en el

PCoA se logró identificar clados de acuerdo a la distribución geográfica de las muestras. Este tipo de distribución resulta común en muchos estudios de diversidad genética. Por ejemplo, en un estudio realizado con *Prunus davidiana* con primers heterólogos de durazno, las relaciones filogenéticas observadas no estuvieron basadas en sus lugares de origen, lo que implica que las accesiones en cada lugar provenían de diferentes progenitores y eran resultantes de intercruces entre poblaciones lejanas (He et al, 2007). Este fenómeno también ha sido reportado para otras poblaciones silvestres de especies de *Prunus* como *P. armeniaca* y *P. avium* donde accesiones de diferentes orígenes se agrupaban en grupos específicos (Guarino et al, 2009; Cheng, 2011).

Este estudio representa el primer reporte de la distribución de capulí en Ecuador. Es importante señalar que no existen registros previos de la forma que esta especie se ha extendido en el país. En 1922, el estadounidense Wilson Popenoe y Pachano describieron a la planta y explicaron que la propagación de la misma se realizaba por semilla y en pocos casos por injertos o yemas. En cuestión de diversidad Popenoe y Pachano dijeron que los árboles provenientes de semillas no tenían frutos iguales y que existían tantas variedades como árboles, pero que solamente pocos eran dignos de propagación y que pocos son los que tienen “reputación de superioridad”.

En base a estas observaciones realizadas ya en 1922 existen 2 puntos importantes de análisis. En primer lugar, la inexistencia de un cultivo establecido de capulí es consecuente con su distribución aleatoria puesto que esta puede deberse a movimientos de las accesiones de mayor interés de un lugar a otro en la sierra ecuatoriana por parte de agricultores, como se analizará más adelante. El segundo punto de análisis es que la

altísima diversidad en esta especie ya ha sido reportada, así como también la existencia de especímenes de mayor interés que otros por productividad, calidad del fruto, entre otros (Popenoe y Pachano, 1922). La riqueza de esta diversidad vuelve meritorio su estudio para llegar a identificar dichos especímenes de interés con el fin de conservarlos, utilizarlos para establecer un cultivo definitivo de la especie o emprender programas de mejoramiento.

Conociendo estos antecedentes, se puede interpretar los resultados obtenidos en este estudio piloto de diversidad. El dendograma realizado permite observar 9 grupos principales. En el grupo 1 se observa muestras de Cotopaxi y Tungurahua. Resulta interesante que 14 muestras de las 39 pertenecientes a Tungurahua se encuentran en este grupo que contiene a 26 muestras. Otro punto importante es que encontramos 2 muestras de la provincia de Imbabura y estas pertenecen al pueblo de Araque. En el grupo dos encontramos agrupadas 11 muestras, las cuales pertenecen a 4 provincias. En los primeros dos grupos no se evidencia la presencia de muestras de la provincia de Carchi. El tercer grupo se compone de 15 muestras, once de las cuales pertenecen a Chimborazo. Aquí encontramos muestras de las mismas localidades o de localidades cercanas en la misma provincia lo que le da más sentido al agrupamiento (Anexo 1). En el cuarto grupo se encuentran 10 muestras de 3 provincias diferentes; algo interesante en este grupo es que las muestras H12 y H13, provenientes de Calpi, Chimborazo, se encuentran agrupadas, ambas presentan las mismas coordenadas geográficas y el bootstrap para este agrupamiento muestra un porcentaje de 65,1 que nos permite inferir que es una agrupación confiable (Baldauf, 2003). El grupo 5 se compone de 11 muestras, 8 pertenecen a Chimborazo y las otras tres pertenecen a 3 diferentes provincias. El grupo 6 se compone también de 11

muestras con ninguna provincia predominante. El grupo 7 contiene a 21 muestras en su mayoría de Imbabura (12). Resulta importante destacar que el bootstrap para la agrupación de las muestras IMB4 y IMB5 es 76.7% que da confiabilidad al agrupamiento, las dos pertenecen a Huyco Pungo por lo que, probablemente, están emparentadas. El grupo 8 se compone de 4 muestras exclusivamente de la provincia de Cotopaxi. Finalmente, en el grupo 9 encontramos 11 muestras con la presencia de las 4 provincias exceptuando Cotopaxi, este tampoco presenta mayoría de ninguna provincia en especial. En resumen, de los 9 grupos, 2 (6 y 7) contienen muestras de las 5 provincias, 3 (1, 2 y 5) contienen muestras de 4 provincias, 3 (3, 4 y 9) contienen muestras de 3 provincias y únicamente 1 (8) contiene solo muestras de una provincia (Cotopaxi)

En los 9 grupos los valores de bootstrap no fueron lo suficientemente altos como para garantizar la fiabilidad de las agrupaciones. Esto justifica la necesidad de aumentar el número de loci a analizar para que los porcentajes suban y se pueda realizar una agrupación más confiable.

El análisis de coordenadas principales corrobora en cierta medida lo visto en el dendograma, sigue sin aparecer un agrupamiento exclusivo por provincias y se sigue viendo una distribución amplia de muestras por todo el diagrama. Resulta interesante que las muestras de las provincias de Chimborazo y Tungurahua se encuentran distribuidas en su mayoría en el cuadrante superior e inferior izquierdo mientras que muestras de Cotopaxi e Imbabura en los cuadrantes derechos, una posible explicación es que más del 50% de las muestras del estudio son provenientes de estas dos provincias, con lo que al aumentar el número de muestras de Imbabura, Carchi y Cotopaxi, podría verse una distribución por

completo aleatoria. En el caso del aparente agrupamiento de muestras de Imbabura en los cuadrantes derechos se podría decir que existe una provincia (Pichincha) de intermedio por lo que aumentar a los datos las muestras de esta provincia podría establecer una conexión entre los cuadrantes de la derecha y la izquierda.

Como se señaló antes, la forma de propagación indicada por Popenoe y Pachano en 1922 podría explicar en cierto grado la diversificación casi aleatoria de las muestras. Los métodos de agricultura tradicionales y la propagación por semillas podrían demostrar que individuos con distintos orígenes geográficos estén relacionados genéticamente. Por otro lado, Popenoe y Pachano indicaban que Ambato en la provincia de Tungurahua era un centro importante de mejoramiento y de diversidad de la planta por lo que una hipótesis podría indicar que especímenes con características deseables pudieron salir de esta provincia para ser distribuidas por toda la serranía ecuatoriana a lo largo del tiempo.

Con el fin de comprobar la diversidad existente por cada provincia, se realizó un dendograma para cada una de ellas (Figura 8) En estos dendogramas se pudo comprobar la existencia de elevada diversidad en cada una de las poblaciones. Las provincias con coeficientes de similitud más elevados fueron Chimborazo (0.3), Imbabura (0.32) y Tungurahua (0.3). Esta elevada diversidad comprueba la encontrada en el dendograma realizado para las 129 accesiones (dendograma general, Figura 6), con excepción de Imbabura que no mostraba tanta dispersión en el mapa general. Esto puede deberse a que para esta provincia se tenía únicamente 21 muestras, en contraste con Chimborazo y Tungurahua que representan las poblaciones con mayor número de muestras. Probablemente si se incrementara el número de muestras de Imbabura, el elevado



coeficiente de similitud se podría visualizar de manera más clara mediante la distribución de las muestras de esta provincia por todo el dendograma tal como ocurre para Chimborazo y Tungurahua.

Es importante mencionar que el capulí es una especie tetraploide ( $2n=32$ ). El número de copias en un loci microsatélite no se puede determinar porque no se puede deducir la repartición de alelos basado en la intensidad de bandas (Downey e Iezzoni, 2000; Pairon y Jacquemart, 2008). Este problema impide determinar frecuencias alélicas en el estudio por lo que no se puede realizar las pruebas de genética de poblaciones más ampliamente conocidas (heterocigocidad, valor PIC, etc.). En la actualidad existen modelos matemáticos diseñados exclusivamente para análisis poblacional de especies poliploides (Pairon y Jacquemart, 2008). Sin embargo, estas herramientas son complejas y los resultados que arrojan no son tan informativos. Debido a que al momento de la culminación de este trabajo no se contaba con dichas herramientas, esta información no se incluye como parte de esta tesis.

Con el objetivo de aprovechar las colecciones realizadas, de cada árbol se tomó 10 frutos para medir su carnosidad (peso del fruto colectado- peso después de la extracción del zumo) y su concentración de azúcar (grados brix). La selección de estos frutos fue aleatoria, no se consideró madurez, edad del árbol, entre otras variables importantes, por lo cual no es posible tener un soporte estadístico de la información obtenida a partir de este análisis. A pesar de ello si se puede indicar que se encontró un gran rango de valores en las variables medidas. En cuanto a la concentración de azúcar, el rango identificado fue de 12.8 a 31.7°, mientras que para la carnosidad, el rango fue de 4.2 a 30.54 g. Para ambas

variables, los valores encontrados más altos corresponden a la provincia de Tungurahua. Esta información destaca el hecho de que es Tungurahua la provincia donde se podría concentrar la diversidad más rica de esta especie, y donde se podría buscar los especímenes con mayor potencial para programas de mejoramiento. En dichos programas de mejoramiento se requeriría utilizar marcadores relacionados con las características deseadas: características del fruto, tamaño del tronco, etc. Otra opción sería identificar fenotípicamente las características deseadas en toda la población encontrada. Para esto sería necesario estandarizar las condiciones de cultivo del capulí, realizar un cultivo con las accesiones más informativas y controlar todas las condiciones bióticas y abióticas del cultivo de manera que estos factores no influyan en el fenotipo expresado de las accesiones que se esté analizando. A pesar de que la información morfológica no se analice en detalle en este trabajo, los datos tomados de las colecciones de frutos realizadas se presentan en el Anexo 1.

## **10. Conclusiones**

Se pudo realizar el estudio utilizando primers heterologos obtenidos de distintas especies de *Prunus* que mostraron ser polimórficos y útiles para evaluar la diversidad genética del capulí.

Existe una elevada diversidad genética en las accesiones utilizadas en este estudio, sin embargo, su distribución es aleatoria y no agrupada de acuerdo a la distribución geográfica. Esto puede deberse a que no existe un cultivo establecido de esta especie y que,

por el contrario, agricultores han dispersado los especímenes de mayor interés por toda la serranía ecuatoriana a lo largo del tiempo.

Las muestras de Tungurahua y Chimborazo son las que se encuentran mayormente distribuidas tanto en el dendograma como en el PCoA realizados. Esto puede deberse a las condiciones frutícolas de esta provincia que destaca por ser un centro de importante agrobiodiversidad para el país.

La identificación de esta elevada diversidad en las accesiones colectadas resulta de extremo interés tanto para emprender futuros programas de mejoramiento como para preservar el germoplasma de esta especie endémica.

Los resultados reflejan la necesidad de ampliar el número de loci analizados y de muestras colectadas en ciertas provincias (Carchi, Cotopaxi e Imbabura) para aumentar la fiabilidad de los agrupamientos encontrados.

Softwares diseñados para análisis de especies diploides no puede ser utilizados en especies poliploides como el capulí (tetraploide) debido a la incapacidad de determinar las frecuencias alélicas de estos genotipos. Es esencial realizar a futuro, análisis estadísticos que ya han sido previamente desarrollados para especies de mayor ploidía y que permitan obtener mayor información a partir del estudio realizado.

## **11. Recomendaciones**

- Ampliar el número de marcadores microsatélites u otros que sean de interés para fortalecer los resultados obtenidos en este estudio, fundamentalmente para

aumentar los valores del bootstrap permitiendo tener más confiabilidad en las distribuciones filogenéticas encontradas.

- Aumentar el número de muestras en algunas provincias, principalmente Carchi, de modo que el número sea similar en todas. Esto reforzaría los resultados obtenidos en el PCoA.
- Incluir otras provincias en el estudio tal como la provincia de Azuay y Pichincha para observar su distribución en el análisis de coordenadas principales a fin de ver alguna relación y poder realizar conclusiones que incluyan toda la Sierra Ecuatoriana.
- En caso de querer realizar un análisis morfológico que pueda ser correlacionado con el molecular se debe estandarizar tanto las condiciones de muestreo como homogenizar el cultivo de las plantas seleccionados para evitar el impacto ambiental que pueda afectar el fenotipo de las muestras.
- Realizar pruebas estadísticas previamente desarrolladas para especies con mayor ploidía y que puedan rescatar mayor información a partir de los datos obtenidos.

## 12. Bibliografía

Auclair, Allan N. y Cottam, Grant. 1971. Dynamics of Black Cherry (*Prunus Serotina* ERHR.) in souther Wisconsin oak forests. *Ecological Monographs*, Vol 41, No.2. pp 153-177

Baldauf, Sandra L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics*. Vol.19 No.6 pp 345-351

Benbouza, Halima. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2) P 77-81

Budak, Hikmet; Balek, Yuksel; Dakugucu, Terrican y Akkaya, Aydin. 2004. Potential Uses of Molecular Markers in Crop Improvement. *KSU Journal of Science and Engineering*. 7(1) pp 75-79

Cubero. Jose. 2002. *Introducción a la Mejora Genética Vegetal*. Mundi Prensa. Madrid pp 70-80

Cheng, Zhongping. 2011. Genetic Diversity and Genetic Structure in Natural Populations of *Prunus davidiana* Germplasm by SSR Markers. *Journal of Agricultural Science*. Vol 3 , No 4

Cipriani, G; Lot, G; Huang, W; Marrazzo, M; Peterlunger, E; Testolin, R. 1988. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor Appl Genet* vol 99: 65 -72

De Vienne, Dominique. 2003. *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. Paris, INRA

Dirlewanger, E; Cosson, Tavaud, M; Aranzana, M.J; Poizat, C; Zanetto, A; Arus, P y Laigret, F. 2002. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica*) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium*). *Theor Appl Genet.* 105: 127-138

Downey, Suzanne L y Iezzoni, Amy F. 2000. Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry. *J. Amer Soc. Hotr. Sci.* 125 (1): 76-80

Fernie, Alisdar; Radmor, Yaakov y Zamir, Dani. 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Plant Biology.*9: 196-202

Ferralli, Philip; Duick, John y Erickson, Floyd. 2007. Making Taq DNA polymerase in the undergraduate biology laboratory. *Bios* Vol. 78, No. 2 pp. 69-74.

Fresnedo-Ramirez, J; Segura, S. y Lua, A. Muratalla. 2011. Morphovariability of capulin in the central – western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. *Genetic Resources Crop Evolution* 58: 481-495

Guarino, C; Santoro, S; Simone, L.D. & Cipriani, G. 2009. *Prunus avium*: nuclear DNA study in wild populations and sweet cherry cultivars. *Genome*, 52, 320–337.

He, T.M; Chen, X.S; Xu, Z; Gao, J.S; Lin, P.J; Liu, W; Liang, Q. y Wu, Y. 2007. Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus*

*armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 563–572.

Henry, Robert. 2013. *Molecular Markers in Plants*. Wiley Blackwell. Iowa, United States. pp 3-10

Jan, Kieleczawa. 2006. *DNA Sequencing II Optimizing Preparation and Cleanup*. Jones and Bartlett Publishers. Ontario. P 49-53

Jimenez, M; Castillo, I; Azuara, E y Beristain, C.I. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp *capuli*) extracts. *Rev . Mex. Ing. Quimica* vol.10 no.1 Mexico

Loeffelholz, Michael y Deng, Helen. 2006. *PCR and Its Variations. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Part 1, pp 166-183

Lorz, Horst y Wenzel, Gerhard. 2008. *Biotechnology in Agriculture and Forestry Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Springer: Berlin.

Maynard, Charles A. 1994. Six year field test results of micropropagated Black cherry (*Prunus serotina*). *In Vitro Cell. Dev. Biol* 30P; 64-69

Mille, Luis. 1942. El Capuli. *FLORA Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador*. Vol II pp50 y 51

Muys, B., D. Maddelein, and N. Lust. 1992. Ecology, practice and policy of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) management in Belgium. *Silva Gandavensis* 27:28–45.

Ochman, Howard; Gerber, Anne S. y Hartl, Daniel L. 1988. Genetic applications of an inverse Polymerase chain reaction.. *Genetics* 120: 621-623

Pairon, M y Jacquemart, A. 2005. Disomic Segregation of Microsatellites in the Tetraploid *Prunus serotina* Ehrh. (Rosaceae). *Journal of the American Society of Horticultural Science* 130(5):729-734

Pairon, M. y Jacquemart, A. 2008. Detection and Characterization of genome specific Microsatellite markers in Allotetraploid *Prunus serotina*. *J. Amer. Soc. Hort. SCI.* 133(3):390–395.

Perrier, X; Jacquemoud-Collet, J.P. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>

Popenoe, W. y A. Pachano. 1922. The capulin cherry. *Journal of Heredity* 13:50-62

Rao, Ramanatha V. y Hodgkin, Toby. 2002. Genetic Diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68 : 1-19

Rohlf, F. J. 2008. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.

Taberlet, Pierre; Gielly, Lodovic; Pautou, Guy y Bouren, Jean. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: P 1105-1109



Testolin, R; Marazzo, T; Cipriani, G; Quarta, R; Verde, I; Dettorin, T; Pancald, M y Sansarin, S. 2000. Microsatellite DNA in peach and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Gemp,e* 43P 512-520

Torres, A; Arias, A; Arahana, V y Torres, M.L. 2008. Preliminary Assessment of Genetic Diversity and Phenetic Relations for Section *Lasiocarpa* by Means of Heterologous SSR Markers. *Crop Science* Vol. 48 No. 6 p. 2289-2297

Xu; Yunbi y Crouch, Jonathan. 2008. Marker – Assisted Selection in Plant Breeding: From publications to practice. *Crop Science*. Vol 48 pp 391-407

Yap, V.I. and Nelson, R.J. 1996. WINBOOT: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms. IRRI Discussion paper series No. 14, Manila, Philippines; International Rice Research Institute

### 13. Tablas

**Tabla 1.** Primers microsatélites seleccionados para la determinación de variabilidad genética en una colección de capulí de 5 provincias de la sierra ecuatoriana. (Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo y Carchi)

Primer	Secuencias (5'-3')	Rango de amplificación reportado en especie de origen	Rango de amplificación encontrado en especie de origen	Numero de alelos encontrados	Temperatura de Annealing (°C)	Especie de origen	Referencia
A*	F: GAACATGTGGTGTGCTGGTT R: TCCACTAGGAGGTGAAATG	140-174	136-168	10	60	Sour Cherry	(Downey e Iezzoni,2000)
B*	F: GCCACCAATGGTTCTTC R: AGCACCAGATGCACCTGA	150-178	150-163	4	62	Sweet cherry	(Downey e Iezzoni,2000)
C*	F: ACGCTATGTCCGTACCATCTCCATG R: CAACCTGTGATTGCTCCTATTA AAC	170-230	169-219	8	60	Durazno	(Downey e Iezzoni,2000)
D*	F: GTCAATGAGTTCAGTGTCTACTC R: AATCATAACATCATTAGCCACTGC	130-152	132-153	5	52	Durazno	(Downey e Iezzoni,2000)
E	F: CCTTGACCTATTTGTTTCGTCA R: ACTAGTCAAACAATCCCCCG	174	NA	NA	NA	Durazno	(Downey e Iezzoni,2000)
F*	F: AATTTACCTATCAGCTCAAA R: TTTATGCAGTTTACAGACCG	146	115-121	3	49	Durazno	(Downey e Iezzoni,2000)
G*	F: AGTTTGATTTTCTGATGCATCC R: TGCCATAAGGACCGGGATGT	120 (102-116)	102-116	7	56.3	Durazno	(Downey e Iezzoni,2000)
H	F: TTGCTCAAAAGTGTCTGTTGC R: ACACGTAGTGCAACTGGC	143	NA	NA	NA	Durazno	(Downey e Iezzoni,2000)
I*	F: TTA AGA GTT TGT GAT GGG AAC C R: AAG CAT AAT TTA GCA TAA CCA AGC	316-364	302-328	4	53.2	Durazno	(Pairon y Jacquemart ,2005)
J	F: GAG GAA TGT GCC TCT TCT GG R: CTC CCG TAC GCG TTT ACC	92-96	NA	NA	NA	Durazno	(Pairon y Jacquemart ,2005)
K	F: CAG GGA AAT AGA TAA GAT G R: TCT AAT GGT GGT GTT CAT T	66-92	NA	NA	NA	Durazno	(Pairon y Jacquemart ,2005)
L*	F: TTT TCT CAG CAG CCA AAC AA R: ATG TTT CGT GCT TCT GCT CC	102-106	98-111	7	56	Durazno	(Pairon y Jacquemart ,2005)

\*Primers utilizados en este estudio

**Tabla 2.** Resumen de las muestras de capulí colectadas e información obtenida en los análisis moleculares para cada una de las provincias analizadas en el estudio

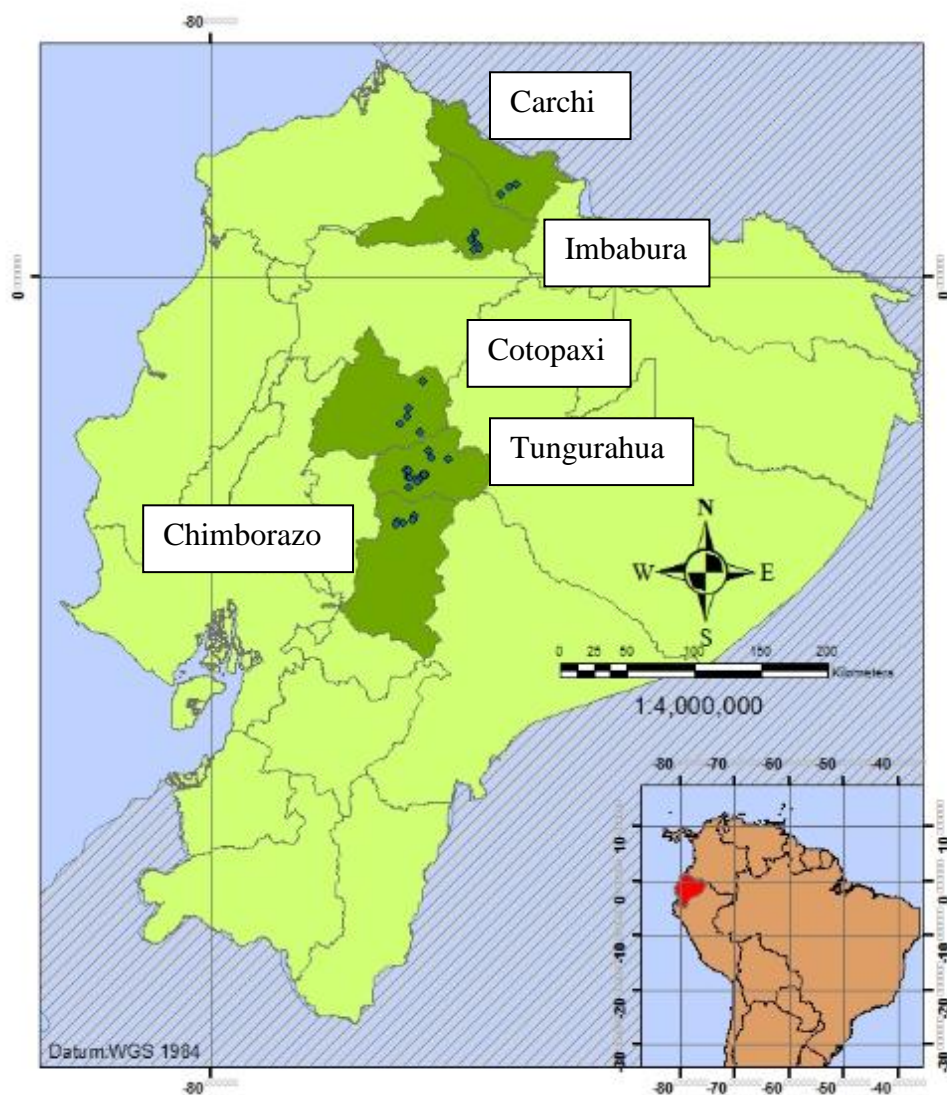
<b>Provincia</b>	<b>Número de Muestras colectadas</b>	<b>Cuantificación ADN (ng/ul)</b>	<b>Numero de alelos identificados para los 8 loci microsatelites analizados</b>	<b>Numero de alelos únicos por provincia</b>	<b>Coefficiente de similitud UPGMA</b>
<i>Tungurahua</i>	38	202-5531	48	0	0.3
<i>Imbabura</i>	23	195-1732	47	0	0.32
<i>Cotopaxi</i>	20	278-5504	46	0	0.26
<i>Carchi</i>	12	992-1160	44	0	0.19
<i>Chimborazo</i>	36	33.49-4782	48	0	0.3
<i>Total</i>	129				

**Tabla 3.** Valores de bootstrap representativos (> a 65) por provincia

<b>Provincia</b>	<b>Agrupaciones representativas</b>	<b>Localidad</b>	<b>Valor de Bootstrap encontrado</b>
Tungurahua	0	NA	NA
Chimborazo	1 (H12-H13)	Huayco-Pungo	65.1
Imbabura	1 (Imb4-Imb5 )	Calpi	76.7
Cotopaxi	0	NA	NA
Carchi	0	NA	NA

## 14. Figuras

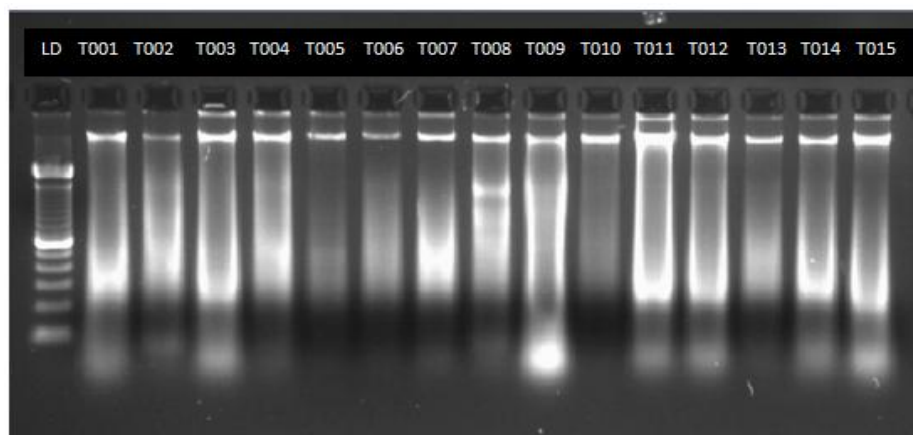
**Figura 1.** Mapa georeferenciado que muestra los lugares en donde fueron colectadas las muestras de Carchi, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi y Chimborazo. El programa utilizado fue ARCGIS v.10 \*



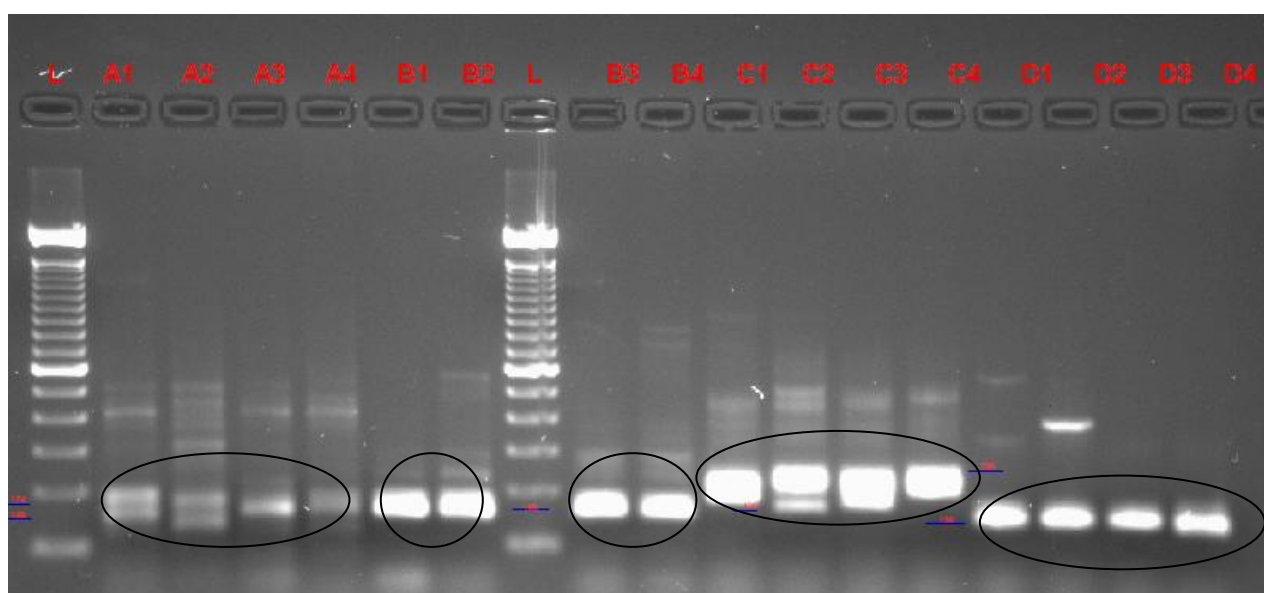
(Mapa realizado por Gabriel Muñoz)

\*Los puntos señalan las localidades de donde se tomaron las accesiones

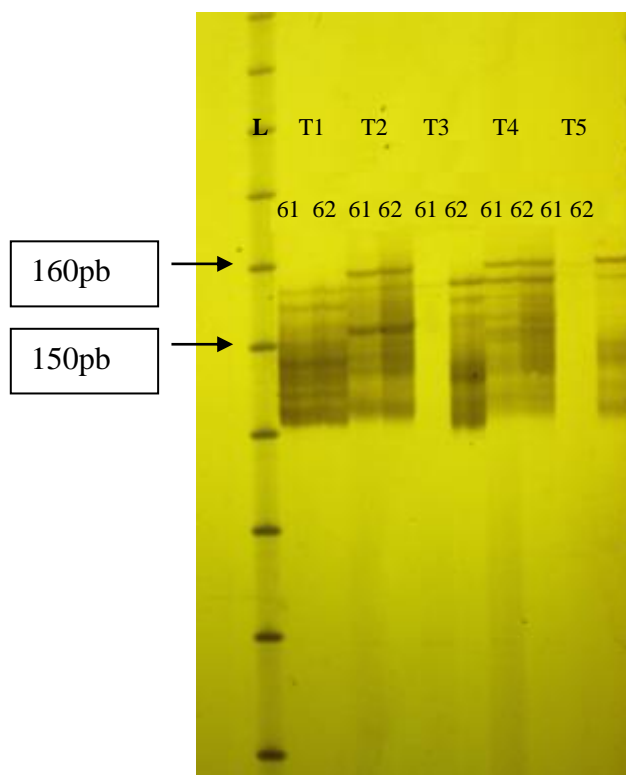
**Figura 2.** Electroforesis en gel de Agarosa 1,5% de ADN genómico de 15 muestras de capulí de la provincia de Tungurahua. Se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen) o marcador de peso molecular, seguido de las muestras T1 al T15.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación en una PCR de estandarización, usando los pares de primers de códigos A, B, C y D (Tabla 1). Orden del gel: Ladder (L = 100bp (Invitrogen)); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el primer A (A1-A4); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el primer B (B1-B4); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el primer C (C1-C4); cuatro muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua amplificadas con el (D1-D4). Se observan bandas de 150 a 170 pb.



**Figura 4.** Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de amplificación con el Primer B en 5 muestras de ADN de capulí de la provincia de Tungurahua. Se probó temperaturas de annealing de 61 y 62°C. No hay diferencias aparentes en la eficiencia de amplificación al comparar las dos temperaturas.



L= Ladder 10 bp (Invitrogen)

T1= Tungurahua 1

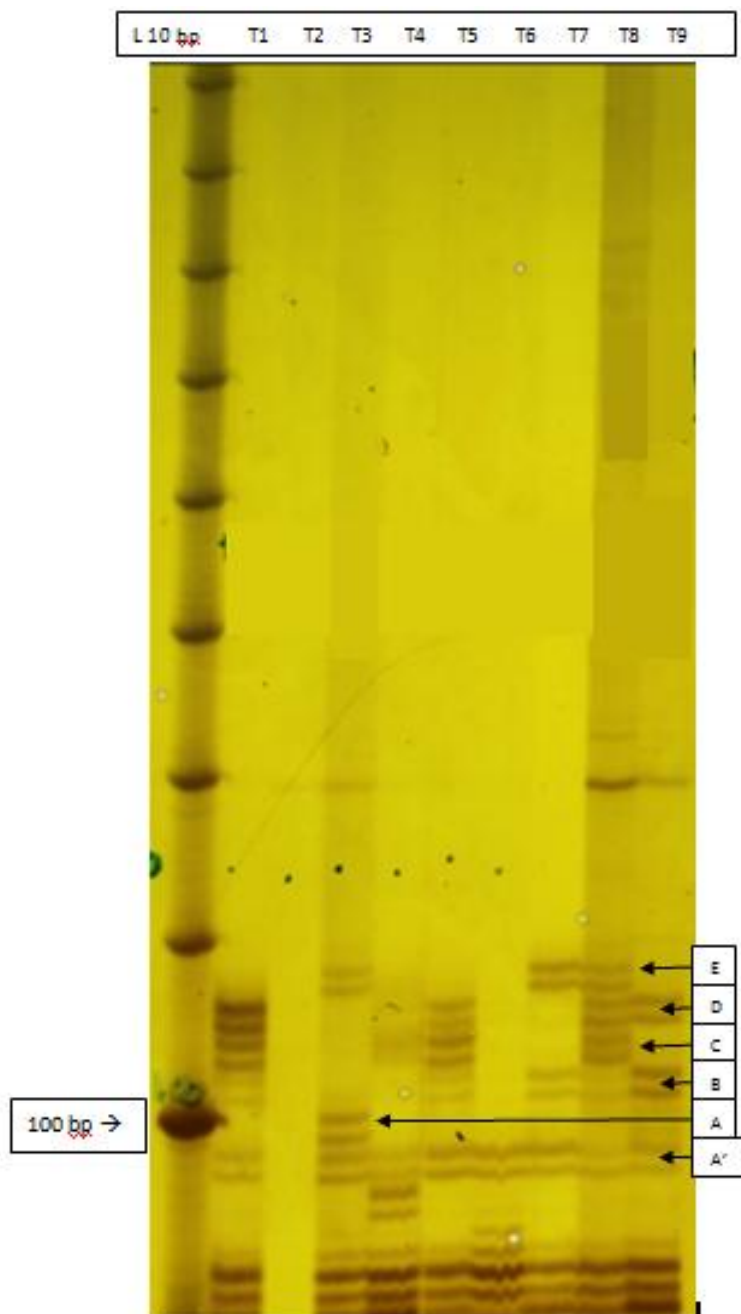
T2= Tungurahua 2

T3= Tungurahua 3

T4= Tungurahua 4

T5= Tungurahua 5

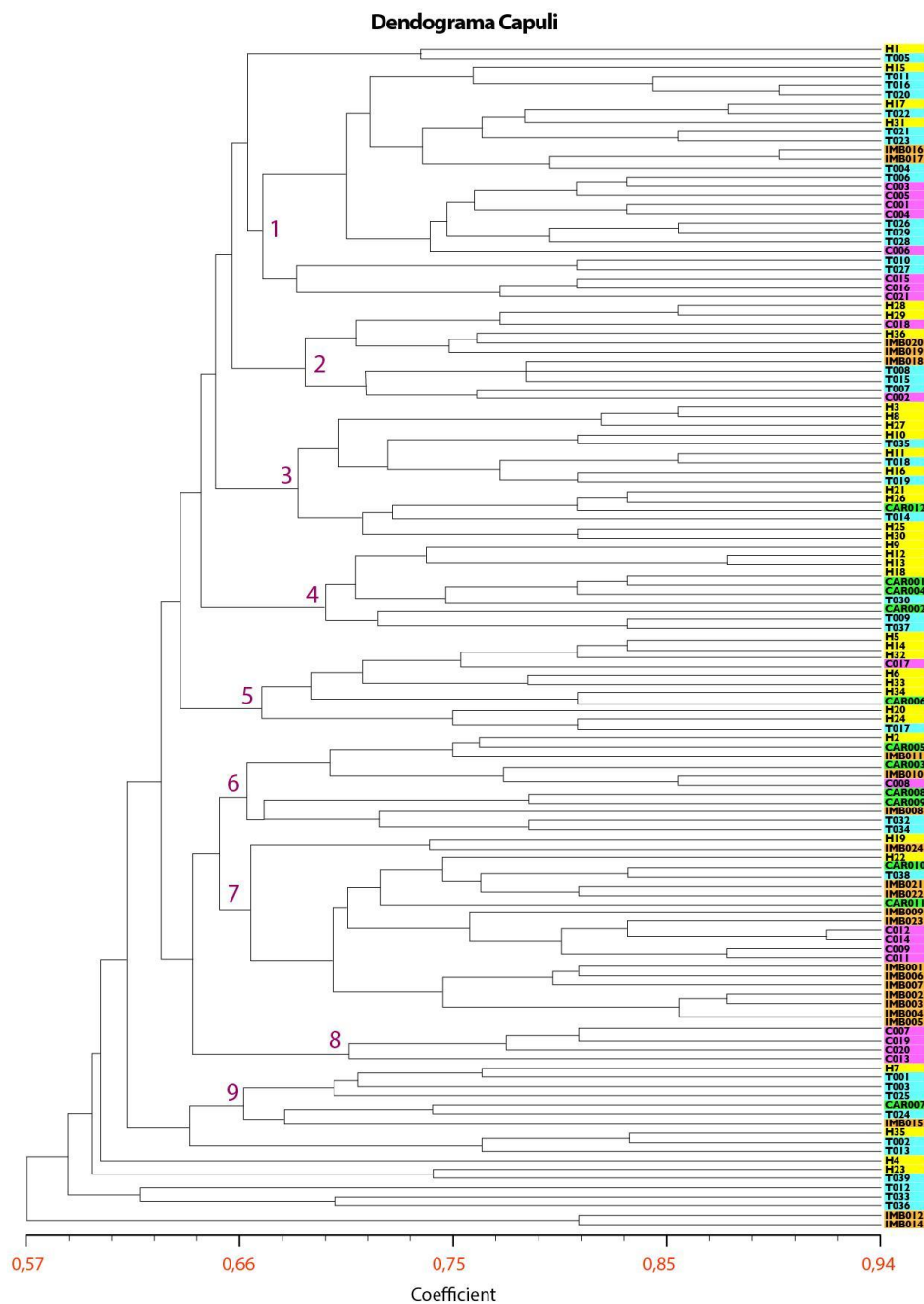
**Figura 5.** Amplificación de primer L para muestras de Tungurahua. En el primer carril se observa el Ladder de 10 bp. Seguido de muestras de Tungurahua (T1-T9). Se muestran también los 6 alelos encontrados: A', A, B, C, D, E. El tamaño de banda esperado fue de 98-111 pb





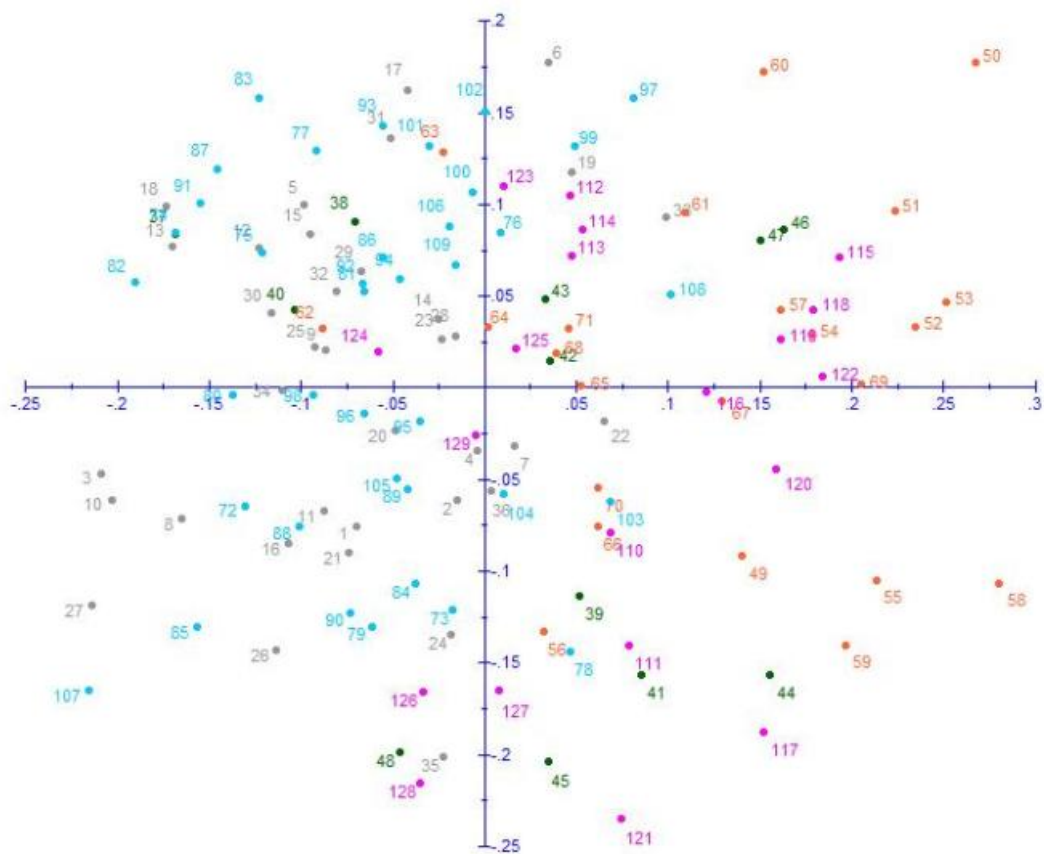
**Figura 6.** Dendograma realizado a partir de la matriz binaria, con las 129 muestras, usando el programa NT-SYS 2.21. Se observa la formación de 9 grupos de los cuáles 2(6 y 7) contienen muestras de las cinco provincias estudiadas, 3 (1, 2 y 5) de cuatro provincias, 3 (3, 4 y 9) de 3 provincias y únicamente 1 (8) contiene muestras solo de una provincia.

Carchi: Verde; Imbabura: Naranja; Tungurahua: Azul; Chimborazo: Amarillo; Cotopaxi: Rosa.



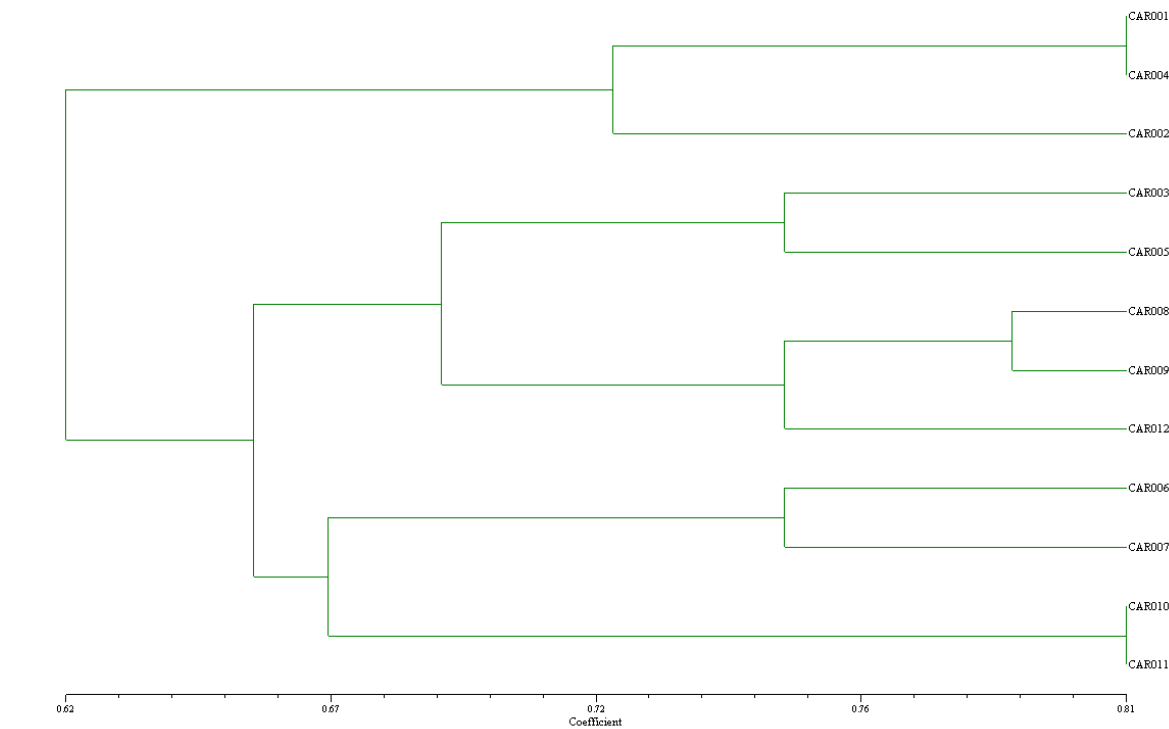
**Figura 7.** PCoA obtenido de la matriz binaria con datos de las 129 muestras, usando el programa DARwin 5.0.158

Carchi: Verde; Imbabura: Naranja; Tungurahua: Azul; Chimborazo: Gris; Cotopaxi: Rosa.

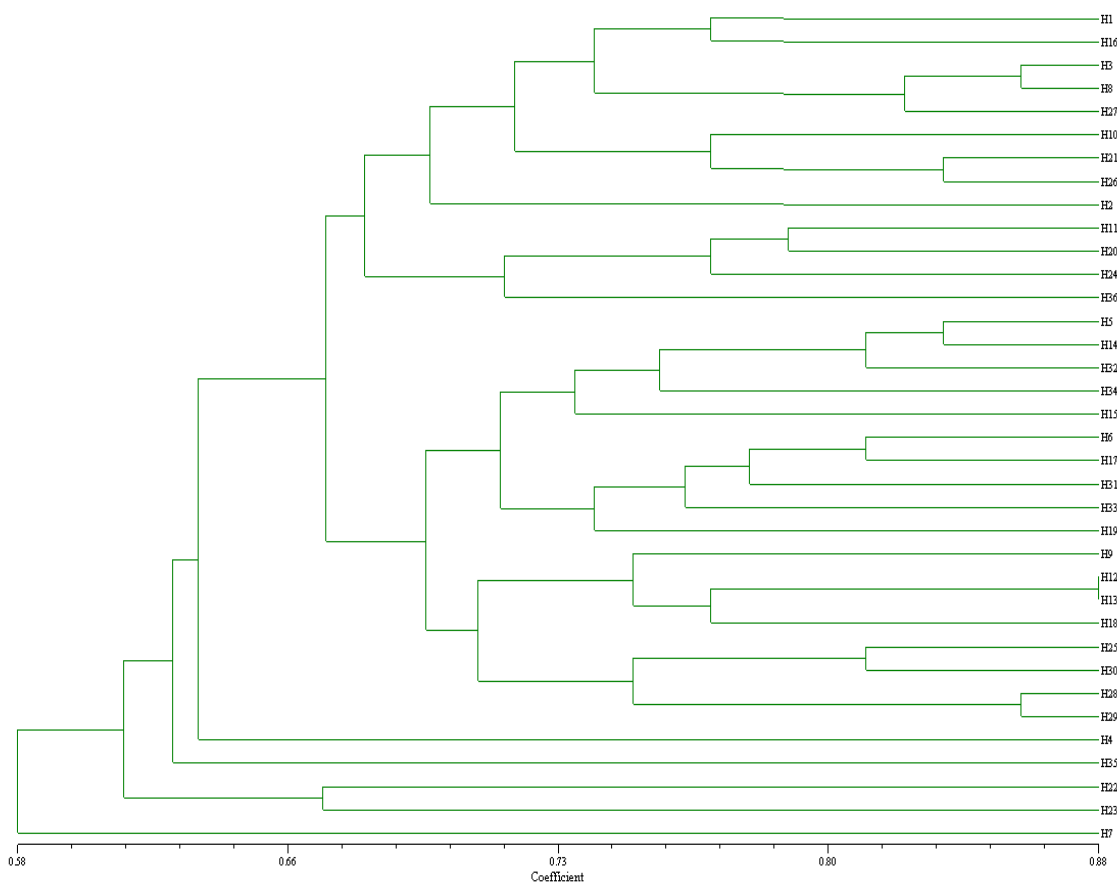


**Figura 8.** Dendogramas para cada provincia realizados usando el programa NT-SYS 2.21 mediante el método de agrupación UPGMA

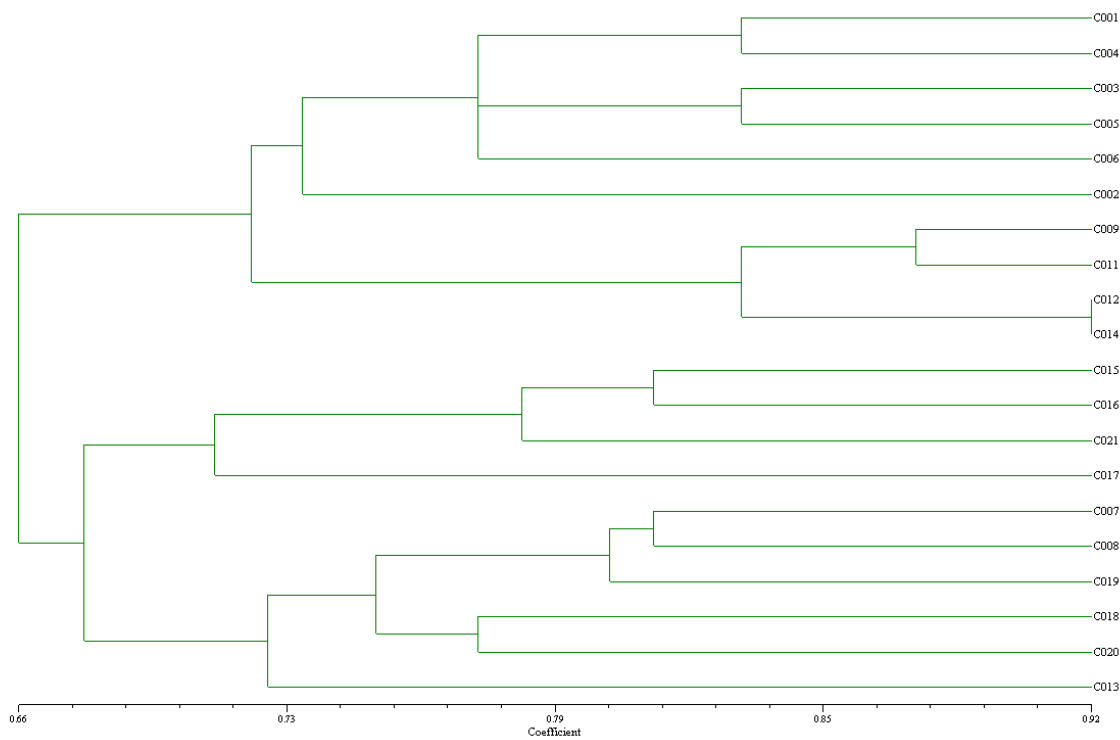
**Figura 8. 1.** Carchi: Los clados que se observan no necesariamente muestran agrupamiento por localidad, con ciertas excepciones, como Carchi 6, 7, 8 y 9 que pertenecen a El Ángel y Carchi 10 y 11 a Bolívar.



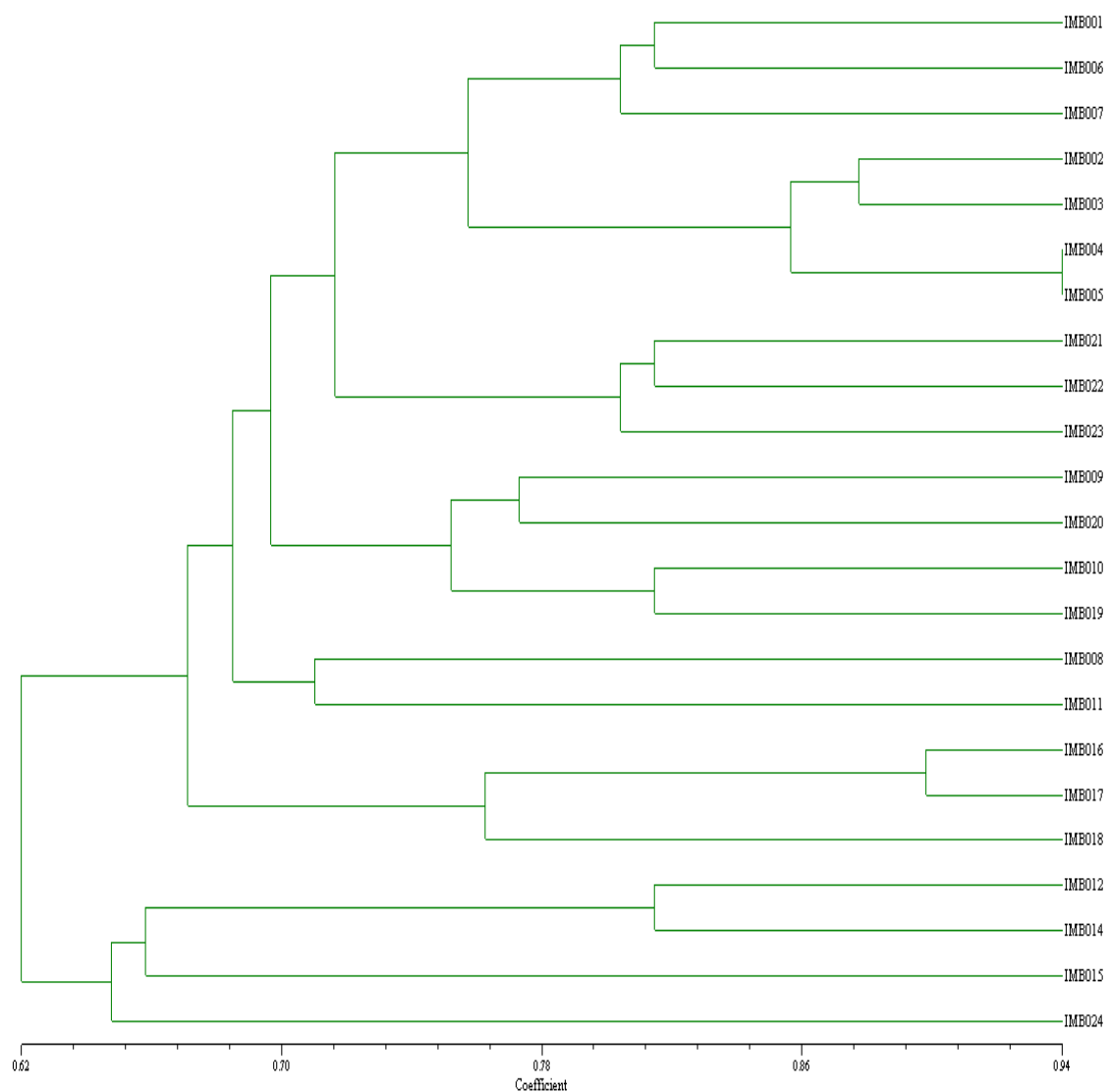
**Figura 8. 2.** Chimborazo: Los clados que se observan no necesariamente muestran agrupamiento por localidad, con ciertas excepciones como: H12-H13 pertenecientes a Calpi y H28 y H29 a Guano



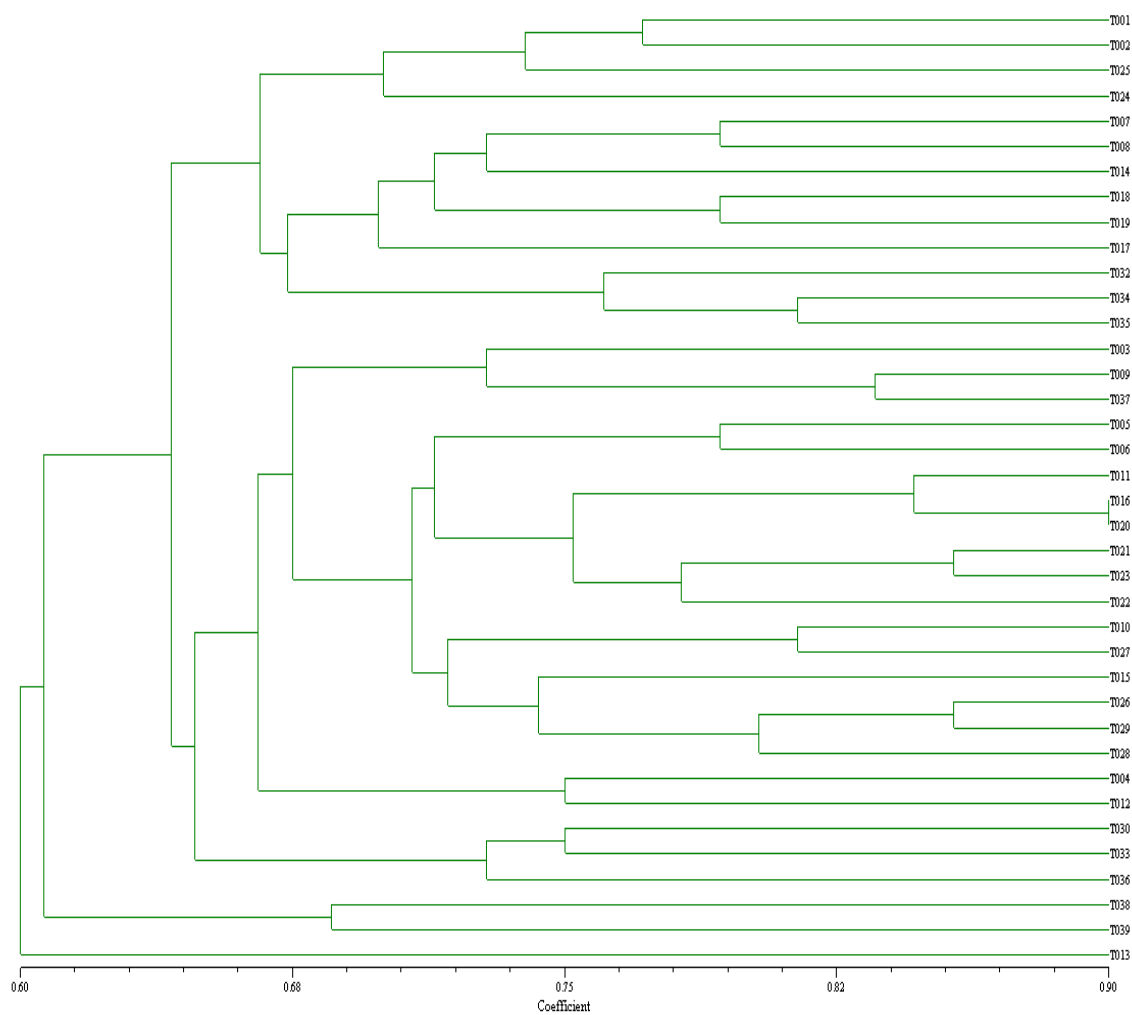
**Figura 8. 3.** Cotopaxi: Los clados que se observan no necesariamente muestran agrupamiento por localidad



**Figura 8. 4.** Imbabura: Los clados que se observan no necesariamente muestran agrupamiento por localidad, con ciertas excepciones como: Imb2, 3, 4, 5 que provienen de Huayco Pungo y finalmente Imb 16 y 17 provenientes de Araque



**Figura 8. 5.** Tungurahua: Los clados que se observan no necesariamente muestran agrupamiento por localidad, con ciertas excepciones como son T1 y T2 de la localidad Pillaron; 34 y 35 de la localidad Juan Benigno Vela



## 15. Anexos

### Anexo 1. Registro de Accesiones

Codigo	Fecha	Provincia	Lugar	Coordenadas	Edad	Estructura de las Ramas	Altura msnm	Brix	Peso
CAR001	25/05/2010	Carchi	Mira	N 00.16212 W 078.14019	Joven	Erecto		14	10.8805
CAR002	25/05/2010	Carchi	Mira	N 00.16212 W 078.14020	Medio	Disperso		17	11.1717
CAR003	25/05/2010	Carchi	San Isidro	N 00.35388 W 077.59280	Medio	Erecto	3006	15.2	6.6754
CAR004	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.36597 W 077.56360	Adulto	Erecto	3020	-	-
CAR005	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37017 W 077.56350	Medio	Disperso	2998	-	-
CAR006	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37017 W 077.56351	Adulto	Disperso	2998	18.6	18.8
CAR007	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37017 W 077.53330	Adulto	Disperso	2998	-	-
CAR008	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.37147 W 077.56401	Joven	Disperso	3004	-	-
CAR009	25/05/2010	Carchi	El Angel	N 00.36343 W 077.56302	Adulto	Disperso	2980	21.9	5.8781
CAR010	25/05/2010	Carchi	Bolivar	N 00.32148 W 077.55143	Medio	Disperso	2840	20.2	15.81
CAR011	25/05/2010	Carchi	Bolivar	N 00.30054 W 077.54125	Medio	Disperso	2621	15.8	15.044
CAR012	25/05/2010	Carchi	Bolivar	N 00.30352 W 077.53471	Joven	Erecto	2621	15.2	13.8718
IMB 001	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18600 W 078.21423	Adulto	Erecto	2698	17	8.8346
IMB 002	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18576 W 078.21394	Adulto	Disperso	2696	24.5	15.7034
IMB 003	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18800 W 078.21243	Adulto	Erecto	2687	19	11.3128
IMB 004	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18721 W 078.21422	Adulto	Disperso	2691	16	18.4318
IMB 005	25/05/2010	Imbabura	Huyco-Pungo	N 00.18811 W 078.21675	Adulto	Erecto	2706	18	15.1885



IMB 006	25/05/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.19099 W 078.22327	Adulto	Disperso	2740	18.5	18.121
IMB 007	09/09/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.18945 W 078.22299	Adulto	Disperso	2751	22.5	9.9773
IMB 008	09/09/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.18981 W 078.22311	Adulto	Disperso	2748	14.5	17.5615
IMB 009	09/09/2010	Imbabura	San Rafael	N 00.18052 W 078.22107	Adulto	Disperso	2813	14.5	11.8481
IMB 010	09/09/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.18277 W 078.22188	Adulto	Erecto	2803	19.5	19.2517
IMB 011	09/09/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.18873 W 078.22543	Adulto	Disperso	2778	17	19.008
IMB 012	09/09/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.20532 W 078.18553	Adulto	Disperso	2792	14	15.4389
IMB 014	07/06/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.20532 W 078.18553	Adulto	Disperso	2792	9.5	12.17
IMB 015	08/06/2010	Imbabura	San Pablo	N 00.20436 W 078.18984	Adulto	Erecto	2759	18	19.3921
IMB 016	09/09/2010	Imbabura	Araque	N 00.20694 W 078.20152	Adulto	Erecto	2704	20	19.4519
IMB 017	09/09/2010	Imbabura	Araque	N 00.21232 W 078.21084	Adulto	Erecto	2702	18	15.2337
IMB 018	09/09/2010	Imbabura	Araque	N 00.22257 W 078.22798	Joven	Erecto	2686	17	13.422
IMB 019	09/09/2010	Imbabura	Calpaqui	N00.1210.311 W 078.1525.7	Medio	Erecto	2755	18	12.868
IMB 020	09/09/2010	Imbabura	Calpaqui	N00.1210.311 W 078.1525.8	Joven	Erecto	2755	19	9.2493
IMB 021	09/09/2010	Imbabura	Calpaqui	N 00.12111 W 078.15257	Adulto	Disperso	2759	19.2	22.302
IMB 022	09/09/2010	Imbabura	Peguche	N 00.15008 W 078.14190	Adulto	Erecto	2630	17.2	10.733
IMB 023	09/09/2010	Imbabura	Agato	N 00.14407 W 078.13527	Joven	Disperso	2715	15.9	15.5785
IMB 024	09/09/2010	Imbabura	Agualongo	N.00.16212 W 078.14019	Joven	Erecto	2624	15.1	12.4487
C001	16/04/2010	Cotopaxi	Lasso	S 00.71344 W 078.59936	Adulto	Erecto	3103	16,8	16,193
C002	16/04/2010	Cotopaxi	Lasso	S 00.71344 W 078.59936	Adulto	Erecto	3103	19,9	9,6422
C003	16/04/2010	Cotopaxi	San Vicente de	S 00.86731 W 078.65846	Medio	Disperso	2927	16,3	13,3398

			Poalo						
C004	16/04/2010	Cotopaxi	San Vicente de Poalo	S 00.86631 W 078.66131	Adulto	Disperso	2934	18,6	15,5003
C005	16/04/2010	Cotopaxi	San Vicente de Poalo	S 00.86631 W 078.66131	Medio	Disperso	2934	18	13,9852
C006	16/04/2010	Cotopaxi	San Vicente de Poalo	S 00.86631 W 078.66131	Joven	Erecto	2934	23,1	16,864
C007	16/04/2010	Cotopaxi	San Vicente de Poalo	S 00.86868 W 078.66487	Adulto	Disperso	2940	18,3	22,6959
C008	16/04/2010	Cotopaxi	San Felipe	S 00.92966 W 078.65781	Adulto	Disperso	2903	23,7	20,0561
C009	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.93454 W 078.67652	Adulto	Disperso	2938	21,4	21,00667
C010	16/04/2010	Cotopaxi	Parroquia Victoria	S 00.93330 W 078.68212	Adulto	Erecto	2945	18,9	25,9085
C011	16/04/2010	Cotopaxi	Parroquia Victoria	S 00.93330 W 078.68212	Adulto	Disperso	2945	18,4	16,1
C012	16/04/2010	Cotopaxi	Parroquia Victoria	S 00.93145 W 078.68665	Adulto	Disperso	2956	17,9	21,8667
C013	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.43512 W 078.67841	Medio	Disperso	2942	17,8	18,8554
C014	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.93626 W 078.68098	Adulto	Disperso	2939	22,1	14,8612
C015	16/04/2010	Cotopaxi	Vía Pujilí	S 00.93653 W 078.68212	Medio	Disperso	2948	19,7	12,6826
C016	16/04/2010	Cotopaxi	Niño de Isinche	S 00.97936 W 078.71863	Adulto	Erecto	3036	14,4	13,6327
C017	16/04/2010	Cotopaxi	Niño de Isinche	S 00.97936 W 078.71863	Adulto	Erecto	3036	20,6	14,2064
C018	16/04/2010	Cotopaxi	San Felipe	S 00.92788 W 078.65615	Joven	Disperso	2914	19,3	17,173
C019	16/04/2010	Cotopaxi	Salcedo	S 01.02785 W 078.58485	Medio	Disperso	2689	14,2	18,3064
C020	16/04/2010	Cotopaxi	Salcedo	S 01.01930 W 078.58170	Joven	Erecto	2706	11,3	9,2004
C021	16/04/2010	Cotopaxi	Salcedo	S 01.01233 W 078.58328	Joven	Erecto	2713	19,4	18,3909
H1	31/03/2011	Chimborazo	Gatazo	S 01.40104 W 078.45273	Joven	Disperso	3057	20,4	10,56

H2	31/03/2011	Chimborazo	Gatazo	S 01.40104 W 078.45274	Adulto	Disperso	3057	19.9	15.71
H3	31/03/2011	Chimborazo	Gatazo	S 01.41152 W 078.45450	Adulto	Erecto	3188	18.9	9.44
H4	31/03/2011	Chimborazo	Gatazo	S 01.41152 W 078.45450	Adulto	Erecto	3188	17.8	14.53
H5	31/03/2011	Chimborazo	Guamoto	S 01.55190 W 078.42178	Joven	Disperso	3112	15.1	16.35
H6	31/03/2011	Chimborazo	Guamoto	S 01.55139 W 078.42165	Joven	Erecto	3107	14.8	20.3
H7	31/03/2011	Chimborazo	Guamoto	S 01.55139 W 078.42165	Joven	Disperso	3107	21.4	8.65
H8	31/03/2011	Chimborazo	Gatazo	S 01.40101 W 078.45258	Joven	Disperso	3157	24	8.18
H9	31/03/2011	Chimborazo	Calpi	S 01.38422 W 078.44478	Adulto	Disperso	3143	20.2	12.41
H10	31/03/2011	Chimborazo	Calpi	S 01.38422 W 078.44478	Adulto	Disperso	3143	13.8	14.18
H11	31/03/2011	Chimborazo	Calpi	S 01.38424 W 078.44296	Joven	Erecto	3115	17.6	9.48
H12	31/03/2011	Chimborazo	Calpi	S 01.38424 W 078.44296	Joven	Disperso	3115	19.2	17.57
H13	31/03/2011	Chimborazo	Calpi	S 01.38424 W 078.44296	Joven	Disperso	3115	14.9	19.39
H14	31/03/2011	Chimborazo	Lincan	S 01.39080 W 078.42147	Joven	Disperso	2944	17.1	7.69
H15	31/03/2011	Chimborazo	Lincan	S 01.39080 W 078.42147	Joven	Disperso	2944	17.2	12.12

H16	31/03/2011	Chimborazo	Abraspungo	S 01.38301 W 078.38211	Joven	Erecto	2794	20.4	16.75
H17	31/03/2011	Chimborazo	Abraspungo	S 01.38301 W 078.38211	Joven	Erecto	2794	17.9	24.56
H18	31/03/2011	Chimborazo	Abraspungo	S 01.38218 W 078.38173	Adulto	Disperso	2792	18.6	11.39
H19	31/03/2011	Chimborazo	Abraspungo	S 01.38025 W 078.38085	Joven	Disperso	2787	19.4	16.74
H20	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.37445 W 078.38081	Adulto	Disperso	2801	18.2	9.92
H21	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.37339 W 078.38119	Adulto	Disperso	2867	21.9	16.29
H22	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.37065 W 078.39104	Adulto	Disperso	2879	21.8	13.82
H23	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.37067 W 078.39109	Joven	Disperso	2874	---	12.26
H24	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.36570 W 078.39181	Adulto	Erecto	2896	20.1	22.08
H25	31/03/2011	Chimborazo	Lago San Alfonso	S 01.37079 W 078.39370	Adulto	Disperso	2902	19.7	13.38
H26	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.35454 W 078.41289	Adulto	Erecto	2986	19.1	15.5
H27	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.35493 W 078.41241	Adulto	Erecto	2982	21.8	20.09
H28	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.35581 W 078.41147	Adulto	Erecto	3072	17.9	23.8
H29	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.35581 W 078.41147	Adulto	Erecto	3072	16.8	15.53
H30	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36091 W 078.39454	Adulto	Disperso	2817	15.7	20.21
H31	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36188 W 078.38279	Adulto	Disperso	2738	19.4	16.05
H32	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36222 W 078.38279	Adulto	Erecto	2729	22.5	20.69

H33	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36222 W 078.38279	Joven	Disperso	2729	19,2	19,15
H34	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36231 W 078.38142	Joven	Disperso	2713	15,8	14,67
H35	31/03/2011	Chimborazo	Guano	S 01.36223 W 078.38141	Joven	Erecto	2715	20,9	14,14
H36	31/03/2011	Chimborazo	San Andres	S 01.35293 W 078.42187	Joven	Erecto	3046	21,6	8,9
T001	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.17390 W 078.55083	Adulto	Erecto	2809	16,4	11,6451
T002	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.17390 W 078.55083	Medio	Disperso	2809	-	20,7497
T003	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.16042 W 078.54379	Medio	Disperso	2807	22,2	8,7126
T004	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.15435 W 078.54345	Adulto	Disperso	2853	18,9	30,5248
T005	26/03/2010	Tungurahua	Pillaro	S 01.15435 W 078.54345	Medio	Erecto	2853	31,7	9,9653
T006	26/03/2010	Tungurahua	San Andres	S 01.14421 W 078.54135	Adulto	Erecto	2876	18,7	15,3683
T007	26/03/2010	Tungurahua	San Andres	S 01.14496 W 078.53722	Medio	Disperso	2894	18,3	8,9322
T008	26/03/2010	Tungurahua	San Miguelito	S 01.18342 W 078.54105	Adulto	Erecto	2803	22,1	21,819
T009	26/03/2010	Tungurahua	Via Pelileo	S 01.31615 W 078.59766	Medio	Disperso	2688	18,8	14,1224
T010	26/03/2010	Tungurahua	Via Pelileo	S 01.31902 W 078.59394	Adulto	Erecto	2666	17,9	24,874
T011	26/03/2010	Tungurahua	Salasaca	S 01.31910 W 078.58056	Adulto	Disperso	2732	24,6	20,1077
T012	26/03/2010	Tungurahua	Pelileo	S 01.33489 W 078.54800	Medio	Disperso	2663	17,2	13,4732
T013	26/03/2010	Tungurahua	Pelileo	S 01.33512 W 078.54436	Medio	Disperso	2657	22,6	11,9956
T014	26/03/2010	Tungurahua	Pelileo	S 01.32712 W 078.53416	Medio	Erecto	2594	23,2	8,0153
T015	26/03/2010	Tungurahua	García Moreno	S 01.32533 W 078.54499	Medio	Erecto	2607	18,3	19,6228
T016	26/03/2010	Tungurahua	García Moreno	S 01.32533 W 078.54500	Medio	Erecto	2607	22,9	16,1884

T017	26/03/2010	Tungurahua	Benítez	S 01.34181 W 078.57837	Viejo	Disperso	2786	18,2	15,242
T018	26/03/2010	Tungurahua	Benítez	S 01.34912 W 078.58502	Medio	Disperso	2851	24,2	10,4553
T019	26/03/2010	Tungurahua	Benítez	S 01.34912 W 078.58502	Medio	Erecto	2851	25,6	11,9467
T020	26/03/2010	Tungurahua	Llimpe Chico	S 01.36658 W 078.59254	Medio	Disperso	2920	20,6	15,8595
T021	26/03/2010	Tungurahua	Llimpe Chico	S 01.36658 W 078.59254	Medio	Disperso	2920	24,5	8,0039
T022	26/03/2010	Tungurahua	Llimpe Chico	S 01.37428 W 078.59548	Medio	Disperso	2931	26,1	12,2972
T023	26/03/2010	Tungurahua	Llimpe Chico	S 01.37428 W 078.59548	Adulto	Disperso	2931	18,9	16,0305
T024	26/03/2010	Tungurahua	Quero	S 01.37837 W 078.60133	Medio	Disperso	2931	28	4,2963
T025	26/03/2010	Tungurahua	Quero	S 01.37837 W 078.60133	Adulto	Disperso	2931	19,2	16,3458
T026	26/03/2010	Tungurahua	Quero	S 01.36958 W 078.60904	Adulto	Disperso	2911	18,3	18,1986
T027	26/03/2010	Tungurahua	Cevallos	S 01.35736 W 078.61387	Medio	Disperso	2902	12,8	11,94
T028	26/03/2010	Tungurahua	Cevallos	S 01.35570 W 078.61897	Adulto	Disperso	2924	23,2	23,7607
T029	26/03/2010	Tungurahua	Cevallos	S 01.35375 W 078.62119	Adulto	Disperso	2931	21,4	15,2749
T030	26/03/2010	Tungurahua	Cevallos	S 01.35375 W 078.62119	Adulto	Disperso	2931	15	22,8456
T031	26/03/2010	Tungurahua	Via Tisaleo	S 01.33088 W 078.62795	Medio	Erecto	2943	28,2	11,3512
T032	26/03/2010	Tungurahua	Via Tisaleo	S 01.33088 W 078.62795	Medio	Disperso	2943	22	11,1227
T033	26/03/2010	Tungurahua	Tisaleo	S 01.33688 W 078.64812	Medio	Disperso	3072	17,2	28,9804
T034	26/03/2010	Tungurahua	Via Juan Benigno Vela	S 01.34037 W 078.87089	Medio	Disperso	3215	20,4	12,5632
T035	26/03/2010	Tungurahua	Juan Benigno Vela	S 01.32183 W 078.66072	Medio	Disperso	3099	19,3	18,8824
T036	31/03/2011	Tungurahua	Mocha	S 01.25123 W 078.39325	Adulto	Erecto	3260	16,8	26,07

T037	31/03/2011	Tungurahua	Mocha	S 01.24191 W 078.338131	Adulto	Disperso	3121	16.9	16.12
T038	31/03/2011	Tungurahua	Mocha	S 01.23406 W 078.37358	Joven	Disperso	3095	19.1	18.45
T039	31/03/2011	Tungurahua	Mocha	S 01.23432 W 078.37261	Joven	Erecto	3085	20	10.35