

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
USFQ**

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

“Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus Serotina*), en la región andina del Ecuador, utilizando marcadores moleculares AFLP”

Proyecto de investigación

Omar Rodrigo Moncayo Contreras

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 15 de mayo de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

“ Análisis de la diversidad genética del capulí (*Prunus Serotina*), en la región andina del Ecuador, utilizando marcadores moleculares AFLP ”

Omar Rodrigo Moncayo Contreras

Calificación:

Andres Torres, Ph.D, Director de Trabajo de
titulación

Firma del profesor

Quito, 15 de mayo de 2017

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 quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

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

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Omar Rodrigo Moncayo Contreras

Código: 00101845

Cédula de Identidad: 0920860251

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2017

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios, a mis Padres, mis hermanos y familia.
También va dedicado para todos aquellos que confiaron en mí. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer primero a mi familia porque gracias a ellos, soy lo que soy. También quiero agradecer a mis amigos y compañeros que estuvieron en cada etapa de este proceso.

Agradezco también a mis profesores que me ayudaron en este trabajo.

Estoy eternamente agradecido de todos ustedes.

RESUMEN

El capulí (*Prunus serotina*) es una especie tetraploide de la familia Rosaceae, originaria de Norteamérica, presente también en Centroamérica y el callejón interandino suramericano. La especie está distribuida ampliamente en la sierra ecuatoriana. El capulí tiene una gran importancia etnobotánica en la región, ya que su fruto es muy apetecido por los habitantes de la sierra, así también por su madera.

Un primer análisis de diversidad genética y estructura poblacional en capulí fue realizado por Guadalupe y colaboradores (2015). Los principales resultados fueron el hallazgo de un moderado nivel de diversidad genética ($H_e=0.71$), y una sutil diferenciación genética entre las provincias sureñas (Cañar y Azuay) y aquellas del centro-norte.

La presente investigación contribuyó con información adicional respecto al nivel de diversidad genética del capulí (*Prunus Serotina*) y su estructura poblacional. Mediante el uso de marcadores moleculares tipo AFLP, se caracterizó molecularmente 80 accesiones de capulí de 8 provincias de la Sierra ecuatoriana: Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Cañar y Azuay. Se probó 5 combinaciones de primers AFLP, de los cuales 3 fueron polimórficos y presentaron señales claras y reproducibles en geles de acrilamida. Los resultados de este estudio develan un bajo nivel de diversidad genética ($uH_e=0.284$) para el capulí, hallazgo característico de especies emparentadas no endémicas sujetas a eventos parciales de domesticación (Xu et al, 2006). Los análisis de estructura poblacional no muestran una diferenciación por provincias (valores de N_{ei} : 0.018 a 0.069), por lo que no hay evidencia clara de estructura en la población. Sin embargo, se evidenció que la provincia de Cañar muestra una mayor diferenciación genética con respecto al resto de provincias analizadas.

La utilización de los marcadores moleculares SSR y AFLP, dan un primer panorama del estado actual de la diversidad genética de *Prunus serotina* en el Ecuador. Se requiere información antropológica, económica y evolutiva de la especie, para sustentar las hipótesis planteadas en ambos estudios.

Palabras clave: *Prunus serótina*, Capulí, marcadores moleculares AFLP, Diversidad genética, Estructura poblacional

ABSTRACT

The Capulí (*Prunus serotina*) is a tetraploid species of the family Rosaceae, native from North America, but also present in Central America and throughout the Andean alley of South American. The species is widely distributed in the Ecuadorian highlands. Capulí has great ethnobotanic importance in the region, mainly for its fruit, much appreciated by very fond of the inhabitants of the ecuadorian highlands, but also for its timber.

A first analysis of genetic diversity and population structure in capulí was carried out by Guadalupe et al. (2015). The main results were the finding of a moderate level of genetic diversity ($He = 0.71$), and a slight genetic differentiation between subpopulations from the southern provinces (Cañar and Azuay) and those of the center and north of the country.

The present research contributed with additional information regarding the level of genetic diversity of the ecuadorian capulí (*Prunus serotina*) and its population structure. Through the use of AFLP molecular markers, 80 capuli accessions from 8 provinces of the Ecuadorian highlands were characterized molecularly: Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Cañar and Azuay. Five combinations of AFLP primers were tested, of which three were polymorphic and showed clear and reproducible signals on acrylamide gels. The results of this study reveal a low level of genetic diversity ($uHe = 0.284$) for capuli, a characteristic finding of non-endemic related species subject to partial domestication events (Xu et al, 2006). Furthermore, population structure analyzes do not show a genetic differentiation by provinces (Nei values: 0.018 to 0.069), so there is no clear evidence of population structure. However, it was shown that the province of Cañar (located furthest south) exhibits a greater genetic differentiation with respect to other provinces analyzed.

The use of SSR and AFLP molecular markers, give a first overview of the current state of genetic diversity of *P. serotina* in Ecuador. Further anthropological, economic and evolutionary information of the species is required, to support the hypotheses develop in both studies.

Key words: *Prunus serotina*, molecular markers AFLP, Genetic diversity, Population structure

INDICE

DERECHOS DE AUTOR	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTO	5
INDICE	8
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. Introducción	11
1.1 El Capulí (<i>Prunus serotina</i>).	11
1.1.1 Historia, origen y distribución.....	11
1.1.2 Características morfológicas y agronómicas del capulí	12
1.1.3 Usos del cultivo.....	13
1.2 Diversidad Genética del Capulí.	14
1.2.1 Diversidad genética: definición, importancia y aplicación	14
1.2.2 Estado actual de la diversidad genética del capulí en el Ecuador.	16
1.3 Marcadores AFLP: una herramienta versátil para el análisis de la diversidad genética del capulí	18
2. Objetivo General	19
3. Objetivos Específicos	19
4. Área de Estudio	20
5. Justificación	20
6. Materiales	22
6.1 Material Vegetal.	22
6.2 Cuantificación de ADN.....	22
6.3 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	22
6.4 Técnica de AFLP.	23
6.4.1 Digestión doble y ligación de adaptadores	23
6.4.2 Pre Amplificación.	23
6.4.3 Amplificación Selectiva.....	23
6.5 Electroforesis en Gel de Acrilamida.	24
6.6 Tinción de Plata.	24

6.7 Materiales Adicionales.....	25
7. Metodología	25
7.1 Muestras de ADN.	25
7.2 Cuantificación y Dilución de Muestras.	25
7.3 Técnica AFLP.	26
7.3.1 Digestión doble y ligación de adaptadores.....	26
7.3.2 Pre amplificación.....	27
7.3.3 Selección de primers y amplificación selectiva	27
7.4 Electroforesis en Gel de Agarosa.....	28
7.5 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.....	29
7.6 Tinción con Plata.	30
7.7 Análisis de Datos.	31
8. Resultados	32
8.1 Genotipado y patrones de Amplificación.	32
8.2 Diversidad Genética.....	33
8.3 Índices de distancia genética.....	33
8.3 Estructura poblacional.	34
9. Discusión	35
9.1 Genotipado y patrones de amplificación.....	35
9.2 Diversidad Genética.....	36
9.3 Estructura poblacional.	38
10. Conclusiones	41
11. Recomendaciones	42
12. Bibliografía	44
13. Tablas	50
Tabla 1. Patrones de bandas por población (Abreviaciones: Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay). Valores de Porcentaje de polimorfismos, numero de bandas con frecuencia mayor o igual al 5% (Bandas polimórficas) y bandas únicas por provincia.....	50
Tabla 2. Valor calculado del índice de diversidad genética: Unbiased Expected Heterozygosity (uHe). Población (Abreviaciones: Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay).	50
Tabla 3. Valores del índice de distancia genética (Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance) provenientes de las provincias analizadas (Abreviaciones:	

Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay).....	51
Tabla 4. Valores calculados para el análisis de la varianza molecular (AMOVA).	52
14. Figuras	53
Figura 1. Esquema molecular del funcionamiento de la Técnica AFLP obtenida el manual de ALFPs de Invitrogen.....	53
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN genómico de 10 muestras de las provincia de Azuay. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Azu) luego del proceso de restricción por enzimas. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Azu) luego del proceso de ligación de adaptadores.....	54
Figura 3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% de ADN genómico de 10 muestras de las provincia de Pichincha y Tunguragua. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Azu) luego del proceso de amplificación pre-selectiva. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Tun) luego del proceso de amplificación pre-selectiva.....	55
Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de amplificación selectiva con el primer (A) M-CTC/E-ACT en 20 muestras de ADN de capulí de 8 provincias del Ecuador (Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay).....	56
Figura 5. PCoA obtenido de la matriz binaria con los datos de las 80 muestras utilizando las 3 combinaciones de primer AFLP. Se usó el programa DARwin 5.0.158 Referencia: Carchi-naranja, Imbabura-verde, Pichincha-amarillo, Cotopaximenta, Tungurahua-lila, Chimborazo-azul, Cañar-café, Azuay-plomo.	57

1. Introducción

1.1 El Capulí (*Prunus serotina*).

1.1.1 Historia, origen y distribución

La especie, *Prunus serotina*, es un árbol perteneciente a la familia Rosaceae que se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano (Fresnedo-Ramirez, Segura, & Lua, 2011; Downey e Iezzoni, 2000; Popenoe & Pachano, 1922). Se entiende que *P. serotina* tiene sus orígenes en Norteamérica donde crece extensamente en los bosques deciduos orientales de los Estados Unidos y en las zonas áridas del este de México. Es muy posible que la especie haya sido esparcida desde México hacia Centro y Suramérica tras la conquista española (Mille, 1942).

En el Ecuador, *P. serotina* se conoce comúnmente como “capulí” (Popenoe & Pachano, 1922). De hecho, al ser una especie introducida y debido a sus características deseadas por los agricultores (principalmente su jugoso fruto), el capulí ecuatoriano se considera hoy una subespecie cultivable de *P. serotina*; razón por la cual McVaugh (1951) la denominó *Prunus serotina* subsp. capulí (Cav.).

El capulí habita exclusivamente a lo largo del callejón interandino, desde la provincia de Carchi en el norte, hasta la provincia de Loja ubicada en el extremo sur del país. La especie tiene un crecimiento óptimo en suelos arcillosos y arenosos cerca de laderas rocosas de zonas templadas, en altitudes entre 1800 y 3300 m.s.n.m (CESA, 1992). Además, suele prosperar en climas secos con amplia luminosidad, ya que es una especie intolerante a la sombra (Palacios, 2011).

1.1.2 Características morfológicas y agronómicas del capulí

Prunus serotina es un árbol con crecimiento monopodial y caducifolio con una altura que varía entre 10 y 16 metros. El diámetro de la copa aumenta con respecto al crecimiento, formando una pirámide que alcanza hasta 1.2 metros de ancho. Posee un tronco irregular y grueso con una tonalidad que va de gris a café oscuro. Además, presenta ramas alternas y escabrosas; con hojas estipuladas, alternas y lanceoladas de entre 6 a 12 centímetros de largo las cuales se distinguen por su color verde brillante (CONABIO, 2012). Los árboles presentan numerosas flores blancas agrupadas en racimos con peciolo largos de los cuales se desprende una fragancia peculiar. La flor posee un ovario unilocular y sésil, con dos óvulos y un estilo simple, el cual presenta un estigma peltado. (Spier & Biederbick, 1980).

En el Ecuador, el capulí tiene su época de floración en enero y los frutos maduran cerca de julio. El fruto es una drupa en forma de globo, carnosa y con cáscara delgada de color negro rojizo. El tamaño del fruto varía entre 12 y 20 milímetros de diámetro. La drupa posee un sabor jugoso agridulce hasta un poco amargo, contiene una única semilla redonda que puede ser dispersada por aves y pequeños mamíferos. (CESA, 1992; Diario El Comercio, 2012).

Los escasos registros agrícolas de la especie sugieren que el capulí no ha sido completamente domesticado en el país (Mille, 1942). No se conoce un procedimiento estandarizado para su cultivo, se piensa que su propagación se da especialmente mediante esquejes o estacas ubicadas por los agricultores en los alrededores de sus cultivos (leguminosas, cereales y tubérculos), o mediante la dispersión de semillas luego de consumir el fruto (Ulloa & Moller, 1995). Se conoce que durante el periodo de

maduración del fruto, las familias indígenas que habitan en zonas rurales, colectan los frutos de la especie a partir de árboles dispersos en áreas cercanas a sus terrenos o parcelas (Popenoe & Pachano, 1922). Luego, los frutos son transportados a los principales mercados para su comercialización. (CESA, 1992; Diario El Comercio, 2012).

1.1.3 Usos del cultivo

Se conoce que el fruto de la mayoría de la subespecie de *Prunus serotina* en Norteamérica no tienen mayor valor comercial debido a su menor tamaño (10 mm), en comparación con sus parientes del sur del continente (3.5 cm) (Hlatky, 1990; Jiménez, Castillo, Azuara, & Beristain, 2011; Ríos, Kozoil, Borgtoft & Granda, 2008). Se cree que esta diferencia de tamaño en el fruto está relacionada a un proceso de selección y domesticación por nativos de México, América Central y Sur América para diferentes usos relacionados con la alimentación y al uso medicinal tradicional (Palacios, 2011).

El capulí tiene un impacto económico destacado en las poblaciones indígenas de la sierra ecuatoriana debido a que su fruto forma parte de la dieta regular de la población; el capulí puede ser consumido como fruta fresca, pero su pulpa también puede ser utilizada en la preparación de mermeladas, preserves, bebidas y helados (Auclair & Cottam, 1971; CESA, 1992). Se conoce además que el capulí ha tenido diferentes usos medicinales en distintas comunas de la sierra ecuatoriana. La infusión de sus hojas se emplea como diurético y expectorante y, se usa también para aliviar inflamaciones respiratorias (CONABIO, 2012). La infusión de sus flores, en conjuntos con otras plantas, es utilizada para acelerar las contracciones del parto (CESA, 1992). Además, diferentes ungüentos son elaborados con el polvo de la corteza, la cual también es utilizada como tónico y sedante (Popenoe & Pachano, 1922). Se cree que estas

propiedades medicinales están relacionadas a los altos valores en las concentraciones de antocianinas y polifenoles encontrados en diferentes extractos de la planta; estos compuestos tienen características antioxidantes y antimicrobianas los cuales pueden ser utilizados en la medicina y la industria alimentaria. (Jiménez, Castillo, Azuara, & Beristain, 2011; Pairon et. al., 2010).

A pesar de que no se conoce un cultivo formal de la especie, su buena adaptación a zonas templadas hace que sean usados como cercos vivos o cortinas rompe vientos; así, estos protegen a otros cultivos de heladas y la erosión de los suelos (Hlatky, 1990; Moose & Mumm, 2008). Además, El frutal también puede proveer una madera de alta calidad y durabilidad para la elaboración de herramientas, fabricación de muebles y decoraciones, o también puede ser utilizada como combustible en forma de carbón de leña. (Mille, 1942). Finalmente, debido a sus destacadas características morfológicas (tamaño del árbol, grosor de ramas y raíz, número de hojas), el árbol suele ser utilizado para la reforestación debido a la gran cantidad de biomasa que genera durante su desarrollo, lo que permite regenerar los suelos (CONABIO, 2012).

1.2 Diversidad Genética del Capulí.

1.2.1 Diversidad genética: definición, importancia y aplicación

La biodiversidad, o diversidad biológica, está definida como la variación entre las características presentes de los seres vivos (Gepts, 2006). La diversidad biológica se considera en tres distintos niveles: la diversidad de ecosistemas, la cual comprende diferencias entre comunidades biológicas y su interacción con el hábitat; la diversidad de especies, la cual hace referencia a las diferencias entre las características de distintas especies; y la diversidad genética, la cual abarca variaciones a nivel de los genes y genotipos heredables entre distintas especies e individuos de una misma especie

(Echenique, Rubistein, & Mroginski, 2004). La variabilidad genética permite que los organismos se adapten de forma efectiva a un medio ambiente cambiante y por tanto aumenta las probabilidades de supervivencia de las especies (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002). Los niveles de diversidad genética en una población están relacionados con el número de genes polimórficos presentes en el acervo genético y el número de alelos o formas alternativas de estos genes. (Primack, 2006; Hou & Lou, 2011).

Los principales procesos genéticos que favorece la aparición de nuevos alelos y genotipos son las mutaciones y recombinaciones, es decir, cambios en las secuencias del genoma, lo que estaría vinculado con la generación de nueva variabilidad genética (Cubero, 2002). Por otro lado, los procesos evolutivos como la selección natural o artificial, deriva genética, migración y flujo génico, pueden modificar o alterar las frecuencias de los alelos presentes en una especie o población. (Frankel, Brown, & Burdon, 1998).

En la agricultura, la prevalencia de monocultivos, los procesos de domesticación y eventos de migración (introducción de especies) de variedades, han incidido significativamente en la reducción de los niveles de variación genética de especies cultivables y de potencial agrícola (Gepts, 2006). Por tanto, el conocimiento y comprensión del estado de los recursos genéticos, es de vital importancia para evaluar la capacidad de adaptación y respuesta de las especies a presiones bióticas y abióticas (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002). De esta forma, se pueden utilizar dichos recursos en plantas cultivables, con la finalidad de asegurar el sustento alimenticio de la población humana (equidad y soberanía alimentaria) (Frankel, Brown, & Burdon, 1998). Otra utilidad importante al conocer la riqueza alélica de las poblaciones, es la aplicación de dichos recursos en programas de mejoramiento genético, para potenciar el uso de variedades subutilizadas, o generar variedades que favorezcan a la industria

agrícola (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002).

En la actualidad, los avances de la biotecnología y biología molecular han permitido el desarrollo de herramientas y técnicas, como los marcadores genéticos, que nos permiten evaluar el nivel de variabilidad genética de las especies (Downey & Iezzoni, 2000). Un marcador molecular genético es cualquier fragmento de ADN que cumpla con las siguientes características: revele una posición determinada en el genoma, sea heredable y tenga una expresión que sea identificable (De Vienne, 2003). Los marcadores moleculares pueden ser utilizados para evaluar la variabilidad alélica entre organismos y poblaciones así como para construir mapas genéticos y evolutivos. La información proveniente de los marcadores moleculares, permite comprender cuál es el estado de la diversidad de las especies y tomar medidas, ya sea para su conservación (bancos de germoplasma) o su manipulación (mejoramiento genético) (De Vienne, 2003).

1.2.2 Estado actual de la diversidad genética del capulí en el Ecuador.

En el caso del capulí, se han desarrollado pocas investigaciones referentes a su diversidad genética. En un estudio desarrollado por Downey e Iezzoni (2000), se utilizaron marcadores moleculares tipo microsatélite provenientes de especies relacionadas al género *Prunus*, para evaluar la variabilidad genética y la transferibilidad de primers heterólogos en accesiones originarios de los Estados Unidos, México y Ecuador. Los autores observaron que las accesiones de Ecuador tenían un mayor parentesco genético con accesiones de México que con accesiones de Estados Unidos. Pairon y colaboradores (2010) también emplearon marcadores microsatélites heterólogos para evaluar la variabilidad genética en poblaciones de *Prunus serotina* provenientes de Norteamérica (Nativos) y Europa (Introducidos) con el objetivo de comprender el origen de la especie en América del Norte y la historia evolutiva de la

introducción de la especie en el continente europeo. Se encontraron algunos hallazgos importantes, entre los principales están la transferencia de primers microsatélites heterólogos entre especies relacionadas al género *Prunus*; la existencia de varios procesos migratorios de introducción de *P. serotina* en Europa y las poblaciones introducidas fueron diversas pero su diferenciación fue baja.

Recientemente, Guadalupe y colaboradores (2015) realizaron una investigación donde se utilizaron marcadores microsatélites heterólogos en 8 provincias de la sierra ecuatoriana con el objetivo de evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional de *P. serotina* subsp. *Capulí*. Los autores encontraron una diversidad genética moderada en las accesiones de capulí y, las estimaciones de distancia génica señalan una mínima diferenciación poblacional en el capulí. No obstante, análisis Bayesianos de estructura poblacional, sugieren un sutil contraste genético entre los individuos de la zona centro-norte con los individuos de la zona sur de la sierra del Ecuador.

Con el objetivo de complementar esta evidencia, se puede utilizar marcadores moleculares tipo AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) para esclarecer, validar o debatir los resultados obtenidos en el estudio de Guadalupe y colaboradores (2015). Una posible desventaja de los marcadores SSR heterólogos es que puedan pertenecer a regiones genómicas altamente conservadas, lo que disminuiría la obtención de polimorfismos (Powell et. al., 1996). Conocemos además, que los marcadores microsatélites heterólogos cubren lugares específicos del genoma por lo que, el estudio de una mayor cantidad de regiones en el genoma del capulí (mediante AFLP), nos podrían brindar más información acerca del estado actual de diversidad de la planta en el Ecuador (Struss, Ahmad, & Southwick, 2003).

1.3 Marcadores AFLP: una herramienta versátil para el análisis de la diversidad genética del capulí

Los marcadores moleculares AFLP (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) permiten el análisis simultáneo de múltiples y distintas regiones del genoma de la especie a estudiarse sin conocimiento previo de la secuencia del mismo (Nuez & Carrillo, 2000). Los AFLP combinan dos técnicas moleculares ampliamente estudiadas: la digestión completa del ADN por enzimas de restricción y la amplificación por PCR de los fragmentos obtenidos (Figura 1) (Henry, 2013). Para el desarrollo de esta técnica y la obtención de la población de fragmentos requeridos, se digiere el ADN genómico total con dos endonucleasas: una de corte raro (generalmente la enzima EcoRI, y una de corte frecuente (generalmente la enzima MseI. Luego, se unen secuencias específicas (adaptadores) a los extremos pegajosos de los fragmentos generados, utilizando una enzima ligasa. Al conocer las secuencias de los adaptadores, se realiza una primera amplificación preselección por PCR con primers que reconocen la secuencia del adaptador más la inclusión de una base extra (A, C, G, T) en el extremo 3', que permite discriminar algunos de los fragmentos obtenidos en la digestión. Finalmente, se realiza una segunda amplificación selectiva por PCR pero esta vez, se utilizan primers con la misma secuencia que los usados en la anterior amplificación más dos o tres nucleótidos adicionales (combinaciones de primers) por lo que, se vuelve a discriminar un gran número de fragmentos obtenidos en la amplificación preselección. Las regiones del genoma que conservan dichas secuencias podrán ser visualizadas, y al ser un marcador dominante, las bandas observadas son clasificadas como presencia o ausencia en cada individuo. Los fragmentos obtenidos pueden separarse y visualizarse mediante técnicas de electroforesis en geles de acrilamida o electroforesis capilar usando fluoróforos o radioactividad. (Archak, Gaikmad, Gautam & Rao, 2003; Invitrogen Life Technologies, 2003; Vos, Hogers, Bleeker, Rijans, & Van de Lee,

1995).

Al tener un gran potencial de cubrir casi todo el genoma y utilizar diferentes combinaciones de iniciadores, los AFLP constituyen una gran herramienta para detectar múltiples loci polimórficos a lo largo del genoma. Generalmente, se utiliza esta técnica para generar huellas genéticas, mapeo y caracterización de especies, así como el estudio filogenético de poblaciones. Entre las ventajas que tiene esta técnica sobre otros marcadores moleculares está que no se necesita ninguna información previa de secuencias, rastrea casi todo el genoma, se generan una gran cantidad de polimorfismos; y es altamente reproducible (Comai, 2000; Cubero, 2002; Simpson, 1997).

De esta forma, se puede generar mayor información del estado genético de las poblaciones de *Prunus serotina* en el Ecuador, con el objetivo de entender la diversidad genética y la estructura poblacional de las poblaciones de capulí en la sierra ecuatoriana.

2. Objetivo General.

El objetivo principal de este trabajo de investigación implicó la utilización de marcadores moleculares tipo AFLP, para estudiar la diversidad genética y la estructura poblacional del capulí (*Prunus serotina*) en 8 provincias de la Sierra ecuatoriana: Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Cañar y Azuay.

3. Objetivos Específicos

- Establecer la aplicabilidad de la técnica de marcadores AFLP para la caracterización genética del capulí.
- Determinar el nivel de la variación genética del capulí usando marcadores AFLP.
- Analizar la estructura poblacional del capulí, con el fin de establecer una posible diferenciación genética entre sub-poblaciones de *P. serotonina* a nivel provincial o

regional.

- Comparar los resultados del presente estudio (en relación a la diversidad genética y la estructura poblacional del capulí), con los hallazgos de Guadalupe y colaboradores (2015), donde se utilizó marcadores moleculares SSRs para estudiar el mismo germoplasma de *P. serotina* empleado en este estudio.

4. Área de Estudio

El material vegetal utilizado y analizado en el presente proyecto fue colectado por Guadalupe y colaboradores (2015) en 8 provincias de la sierra ecuatoriana: Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Azuay y Cañar. En su mayoría, los sitios de recolección estaban ubicados en las cercanías de las tierras dedicadas a la agricultura, casas de campo y en los costados de la carretera de las provincias ya mencionadas.

Las pruebas moleculares (restricción, ligación, preamplificación y amplificación selectiva) y respectivos análisis de datos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Quito, Ecuador).

5. Justificación

El capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) es una especie de árbol que crece en el callejón interandino de la sierra ecuatoriana. Se ha podido observar que tiene un enorme potencial económico, ya que puede ser aprovechado en distintos ámbitos como la industria alimenticia, medicinal y maderera.

Se conoce que el capulí ha sido una especie de consumo tradicional de los habitantes de la sierra ecuatoriana; el fruto o baya es comúnmente utilizado para jarabes

o pulpas saborizantes. Un estudio realizado por Jiménez y colaboradores (2011), comprobó la existencia de altos contenidos de antocianinas y otros factores alimenticios del extracto del fruto. Además, las infusiones de las hojas y la corteza del árbol suelen emplearse de forma medicinal para tratar y aliviar algunas dolencias como diarreas, malestar estomacal, fiebre, debilidad, tisis pulmonar, congestión nasal, etc. (CONABIO, 2012; Popenoe & Pachano, 1922). La madera de esta especie posee características de interés como la dureza, resistencia y la calidad para trabajar en molduras. Estas cualidades pueden ser empleadas en la elaboración de muebles y anaqueles, o en ebanistería (Palacios, 2011).

Son mínimas las investigaciones referentes a diversidad genética que se han llevado a cabo en el capulí. Se conocen pocas publicaciones científicas a nivel mundial (Downey & Iezzoni, 2000; Pairon, et. al., 2010) y un reciente estudio sobre la diversidad genética *P. serotoninina* en el Ecuador (Guadalupe et. al., 2015).

Esta investigación es un trabajo complementario al ya realizado por Guadalupe y colaboradores (2015). Existen algunas investigaciones en las que se combinan las técnicas de marcadores moleculares AFLP y SSR para estimar diversidad genética y estructura poblacional. García y colaboradores (2004) realizaron un estudio de diversidad en líneas puras de maíz, y Giancola y colaboradores (2001) también combinaron ambas técnicas moleculares para caracterizar y diferenciar variedades de soya. De esta forma, y con el objetivo esclarecer, validar o debatir los resultados obtenidos en estudios anteriores sobre la diversidad y la estructura poblacional de *P. serotoninina* en Ecuador, se utilizó la técnica de marcadores AFLP, la cual cubre ampliamente el genoma y puede generar una gran cantidad de polimorfismos, lo que generaría información complementaria para conocer el nivel de diversidad genética del capulí (Mondini, 2009).

Las consecuencias negativas del cambio climático y el efecto del ser humano en el ecosistema ha fomentado el estudio de la diversidad genética, ya sea para preservarla mediante bancos de germoplasma o para la identificación de alelos de interés que fomenten programas de mejoramiento genético en *P. serotina* (Moose & Mumm, 2008). La información proveniente de estas investigaciones también puede ser útil para la promoción del cultivo del capulí en la sierra del Ecuador, lo que podría generar nuevas economías agrícolas en las zonas rurales, mejorando la calidad de vida del agricultor.

6. Materiales

6.1 Material Vegetal.

- Muestras de ADN de capulí obtenidas de accesiones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ (Guadalupe et. al., 2015).

6.2 Cuantificación de ADN.

- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- NANODROP 2000 (Thermo Scientific)
- Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)

6.3 Electroforesis en Gel de Agarosa.

- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell®)
- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- SeaKem® LE Agarose

- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris – Ácido Borico – EDTA)

6.4 Técnica de AFLP.

6.4.1 Digestión doble y ligación de adaptadores

- Kit AFLP de Invitrogen
 - 5X reaction buffer
 - Enzimas de restricción *EcoR I* / *Mse I* (1.5U/μL)
 - Agua destilada
 - Adapter ligation solution
 - T4 DNA ligase

6.4.2 Pre Amplificación.

- Kit AFLP de Invitrogen
 - 10X PCR buffer con Mg
 - Pre-Amp Primer Mix
 - Taq Polimerasa (5U/μL)

6.4.3 Amplificación Selectiva.

- Kit AFLP de Invitrogen
 - *Mse I* primer (contiene dNTPs)
 - *EcoR I* primer
 - Agua destilada
 - 10X PCR buffer con Mg
 - Tap polimerasa (5U/μL)

6.5 Electroforesis en Gel de Acrilamida.

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

6.6 Tinción de Plata.

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

6.7 Materiales Adicionales.

- Cámara de fotos Canon XPOSZ
- Transiluminador de luz blanca

7. Metodología

7.1 Muestras de ADN.

Las muestras de ADN fueron obtenidas del germoplasma de capulí del Laboratorio de Biotecnología vegetal de la USFQ. La extracción y almacenamiento de ADN de las muestras fueron realizadas en estudios previos en el laboratorio (Guadalupe et. al., 2015).

Se tomaron diez (10) muestras de cada una de las 8 provincias seleccionadas: Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay. En total se trabajó con 80 muestras de ADN de capulí de provincias de la sierra ecuatoriana.

7.2 Cuantificación y Dilución de Muestras.

Las muestras se encontraban en altas concentraciones (>800 ng/μl). Se determinó la concentración, cuantificación y calidad del ADN por medio de espectrofotómetro NANODROP 2000 y geles de agarosa al 1% donde se pudo visualizar el ADN haciendo uso del SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y del Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD).

Finalmente, durante los procesos de PCR con primers AFLP, se realizaron diluciones a 100 ng/ μ l a partir de la muestra stock de ADN.

7.3 Técnica AFLP.

Para realizar el análisis de ADN mediante la técnica AFLP se utilizó el protocolo de Invitrogen que se divide en 3 fases: digestión y ligación de adaptadores, pre amplificación y amplificación selectiva. Las mismas son explicadas a continuación.

7.3.1 Digestión doble y ligación de adaptadores

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo con la mitad del volumen que se sugiere en el protocolo de Invitrogen, se realizó de esta manera para así optimizar el uso de los reactivos del kit de AFLP. Las mismas se realizaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, utilizando 2.5 μ l de 5X Reaction Buffer, 1.2 μ l de solución *EcoR I/ MseI*, 3.8 μ l de agua destilada, y 5 μ l de muestra de ADN (100 ng/ μ l). El volumen final de la reacción de restricción fue de 12.5 μ l. Posteriormente, se aplicó un “short spin” (centrifugación corta) de 3 a 5 segundos, y se procedió a incubar las muestras a 37°C durante un período de 4 horas. Tras este proceso, las muestras fueron puestas en baño de arena a 70°C por 15 minutos, y finalmente congeladas a -20°C.

Para las reacciones de ligación de adaptadores se utilizaron los 12.5 μ l de volumen final de la reacción de restricción. Este proceso se realizó añadiendo 12 μ l de Adapter Ligation Solution, y 0.65 μ l de T4 DNA Ligase, junto con el producto de restricción ya mencionado. Los tubos fueron agitados y mezclados, para posteriormente ser centrifugados brevemente de 3 a 5 segundos con la opción “short spin”; segundo, fueron incubados a 22°C (+/- 2°C) durante un período de 4 horas; y finalmente, se almacenaron a -20°C en la congeladora.

7.3.2 Pre amplificación

En este proceso, de igual manera que en el proceso anterior, se siguió el protocolo especificado en el manual del kit de AFLP Invitrogen. Para optimizar el kit, se dividió el volumen de cada reacción a la mitad sin alterar la concentración que intervienen en la misma. Para llevar a cabo esta fase se colocó en un tubo de 0,2 ml de capacidad, 20 μ l de Pre-Amp Primer Mix, 2,5 μ l de 10X PCR Buffer con Mg y 0,6 μ l de Taq Polimerasa. Esta mezcla (23.1 μ l) se reparte en los tubos de reacción, y a cada uno se le añade finalmente 2,5 μ l de ADN ligado. El programa de la PCR utilizado se describe en el manual del AFLP Analysis System I (Invitrogen), éste consta de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C de 60 segundos, y 72°C por 60 segundos.

Es importante resaltar que uno de los cambios que se realizó en el protocolo del Manual de Invitrogen fue utilizar la concentración final del proceso de pre amplificación sin ser diluida a 1:50.

7.3.3 Selección de primers y amplificación selectiva

Se probaron 5 combinaciones de primers *EcoR* I/ *Mse* I provenientes del AFLP Starter Primer Kit: (1) M-CTC/E-ACA, (2) M-CTC/E-ACC, (3) M-CTA/E-ACA, (4) M-CTA/E-ACT, (5) M-CAA/E-AGC. Se eligió de esta manera dichas combinaciones con la intención de buscar aquellos pares de primers que se observan con mayor universalidad entre las especies vegetales expuestas en el Manual de usuario del Kit de Invitrogen.

Con el objetivo de identificar los primers que generen amplificación, se realizaron pruebas de amplificación selectiva con 10 muestras de ADN de capulí, escogidas al azar. Para cada una de las muestra la reacción contenía 5 μ L de ADN preamplificado,

0,5 μL de solución de primer *EcoR* I, 4.5 μL de solución del primer *Mse* I, el cual contiene dNTPs, 7.8 μL de agua destilada, 2 μL de 10X PCR buffer, y 0.2 μL de Taq Polimerasa. Se utilizó el programa de la PCR descrito en el manual del AFLP Analysis System I (Invitrogen); éste consta de un ciclo de 94°C por 30 segundo, 65°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos. Posteriormente, se redujo la temperatura de annealing 0.7°C durante 12 ciclos. Finalmente, 23 ciclos a de 94°C por 30 segundo, 56°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos. Los resultados de estos ensayos se observaron en geles desnaturalizantes de acrilamida al 6% y fueron visualizados mediante tinción de plata.

7.4 Electroforesis en Gel de Agarosa.

Con el fin de corroborar que el proceso había sido exitoso, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% después de cada una de las fases que forman parte del análisis por AFLP. Esta técnica nos permitió observar la presencia y cantidad de ADN genómico extraído, además de los productos de restricción, ligación, preamplificación y amplificación selectiva. Se prepararon geles de agarosa de 100 o 500 ml, la cantidad dependía del número de muestras que fueron procesadas en el momento. Para realizar el gel de agarosa se mezcló TBE a una concentración de 1X, y agarosa a una concentración de 1%; dicha mezcla fue sometida a ebullición en un horno microondas. Luego de ser homogenizada, se dejó enfriar la solución hasta que la temperatura de la superficie de Erlenmeyer se normalice para poder ser tocada. Inmediatamente, se agregó 3 μL de SyBr Safe por cada 100ml de gel ya preparado, y fue agitada para ser mezclada nuevamente.

Consecutivamente, se procedió a verter el gel líquido sobre la cámara de electroforesis (C.B.S Scientific Co MGU-502T), y se colocaron peinas plásticos para

poder formar los pocillos de carga. Durante 30 minutos, se dejó solidificar el gel antes de cargar las muestras. Para el proceso de visualización de ADN genómico extraído, se colocó en cada pocillo 10 μL de la muestra, resultado de la mezcla de 2 μL de Blue Juice 10X (invitrogen), 3 μL de agua destilada, y 5 μL de ADN genómico. Las muestras se corrieron por 30 minutos a 80V.

Por otro lado, para la visualización de los productos de restricción, ligación y preamplificación, se colocó en cada pocillo 10 μL de muestra compuesta de 5 μL de ADN, 3 μL de agua destilada y 2 μL de Blue Juice 10X (invitrogen). Las muestras se corrieron por 50 minutos a 80V.

7.5 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Utilizando una cámara vertical de electroforesis BIORAD, se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida de los ADNs del capulí. Se utilizó un protocolo ya estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, basado en la publicación de Benbouza, et al. (2006), con algunas modificaciones.

En este procedimiento, primero, se lavaron los dos vidrios de la cámara de electroforesis con el detergente ALCONOX (2 cucharadas pequeñas) disuelto en agua (150 ml). Luego de enjuagar y de que los vidrios estén secos, se los trató con alcohol al 70%. Posteriormente, se esparció sobre uno de los dos vidrios, 2 ml de una solución compuesta por 96% de alcohol absoluto, 0.5% de ácido acético glacial y 6 μl de Bind-Silane (3-Trimethoxysily-propyl-methacrylate 98%). El segundo vidrio (el vidrio posterior de la cámara) fue tratado con etanol al 70%, 3 ml de Rain.X™ (marca) y 800 μl de Sigmacote® (SIGMA).

El gel que se requería era a un volumen de 100 ml de acrilamida al 6%, para

prepararlo se le añadió 545 μL de persulfato de amonio al 10%, 5 M Urea y acrilamida/bisacrilamida 19:1, y 109 μL de UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethilenediamine) (Invitrogen). Se homogeneizó la mezcla de forma rápida mediante agitación, y se inyectó la acrilamida a velocidad constante entre los dos vidrios mencionados previamente (vidrios de la cámara vertical de electroforesis BIORAD). Como segundo paso, se procedió a colocar el peine para formar el frente de la corrida, y se dejó polimerizar el gel por 50 minutos. Una vez finalizada la polimerización del gel, se armó la cámara completamente, con la ayuda del peine se crearon los pocillos, se retiró la urea del frente de corrida, y se realizó la pre-corrida con el buffer de carga compuesto por glicerol/azul de bromofenol a 80V.

Para correr el gel se preparó el ladder con 27.5 μL de agua ultra pura estéril, 2.5 μL de Blue Juice 10X (Invitrogen) y 5 μL de ladder 10bp (Invitrogen). A cada uno de los productos de PCR se aplicó Blue Juice 10X (Invitrogen), para obtener una concentración final de 1X. Se desnaturalizaron los productos de PCR y el ladder de 10 bp a 96°C por 6 minutos en un T100 Thermal Cycler (BIORAD). Así mismo, se cargó 5 μL de ladder de 10 bp y 5 μL del producto de PCR por dos horas y media a 80V respectivamente.

7.6 Tinción con Plata.

Para teñir los geles de poliacrilamida, se empleó el protocolo de Benbouza y colaboradores (2006) sujeto a ciertas modificaciones especificadas a continuación: se sometió el gel a una solución fijadora fría que constaba de 1790 ml de agua destilada, 10 ml de ácido acético glacial y 200 ml de alcohol absoluto, este procedimiento se realizó durante 5 minutos sin movimiento. Además se sometió a una solución de tinción compuesta por 4 gr de nitrato de plata, 2 litros de agua destilada y 3 ml de formaldehído

al 37%, por siete minutos con movimientos constantes y oscuridad; luego a una fase de lavado rápido por 8 minutos con oscuridad y agua destilada; a una solución de revelado con 30 gr de hidróxido de sodio, 2 litros de agua destilada y 4 ml de formaldehído al 37%, por 3 minutos con leve movimiento y oscuridad; una segunda fase con solución fijadora por tres minutos sin movimiento; y un segundo lavado rápido durante 20 segundos con agua destilada.

Finalmente, antes de ser analizado el gel, se lo dejó secar a temperatura ambiente. Los geles de poliacrilamida nos permitieron visualizar el ladder de ADN de 10 bp (rango de 10-30 pb-Invitrogen) y los productos de amplificación de cada una de las distintas muestras.

7.7 Análisis de Datos.

A partir de la observación de los productos de amplificación y el perfil de bandas por cada combinación de primers AFLP, se elaboró una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0), haciendo referencia a la observación o no de las bandas por cada muestra. Por medio del software estadístico GenAlEx 6.5 se calcularon los valores para de uHe (unbiased expected heterozygosity), se determinaron las distancias genéticas (Pairwise Nei genetic distance (Ds)) y se realizó un AMOVA (Analysis of molecular variance).

Por otro lado, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) usando el software estadístico Dissimilarity Analysis and Representation for Windows (DARwin 5.0.158) utilizando una matriz de disimilitud a partir de los datos obtenidos, se empleó el coeficiente de Jaccard.

8. Resultados

8.1 Genotipado y patrones de Amplificación.

En los procesos moleculares, las reacciones de restricción (endonucleasas *EcoR I* y *Mse I*) y ligación (T4 ligasa) fueron realizados siguiendo el manual del Kit AFLP de Invitrogen. Para observar el estado del ADN en los procesos tanto de restricción como de ligación, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%; aquí se pudo verificar el éxito de la reacción observando un barrido en cada muestra como se aprecia en la Figura 2. Todas las muestras sometidas a los procesos de digestión y ligación tuvieron una primera reacción de amplificación. Para observar el éxito de la amplificación preselectiva, se realizó una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% para comprobar la presencia de fragmentos amplificados en un barrido distribuido uniformemente como se puede ver en la Figura 3. Es importante destacar que en este proceso se utilizó el volumen del proceso anterior sin diluir, ya que de esa forma se obtuvieron los mejores resultados.

Se probaron cinco combinaciones de primers *EcoR I* / *Mse I*, seleccionados del AFLP Starter Primer Kit: (A) M-CTC/E-ACT, (B) M-CTC/E-ACC, (C) M-CTC/E-AAG, (D) M-CTA/E-ACC, (E) M-CTG/E-AAG. La selección fue evaluada por la universalidad de los primers y su relación con especies emparentadas al género *Prunus* (Struss et al, 2003). De los cinco primers probados, únicamente tres fueron usados en el análisis total del germoplasma, ya que presentaron señales claras y reproducibles de amplificación, las que fueron visualizadas en los geles de poliacrilamida al 6% como se puede ver en la (Figura 4). Las otras dos combinaciones de primers no fueron analizadas, ya que presentaron problemas su calidad de amplificación y reproducibilidad.

Las combinaciones analizadas fueron (A) M-CTC/E-ACT, (C) M-CTC/E-AAG, (E) M-CTG/E-AAG. Estas tres combinaciones rindieron un total de 57 fragmentos polimórficos en las 80 muestras de capulí analizadas. Específicamente, se detectaron 22 bandas polimórficas para el primer (A), 16 para (B) y 19 para el (E). Se observó, en promedio, 47 fragmentos polimórficos por cada provincia (Tabla 1). Entre estas, Cotopaxi se destacó como la provincia con mayor número de bandas, bandas únicas y bandas con una frecuencia menor al 5% (Tabla 1).

8.2 Diversidad Genética.

Se estableció el parámetro de Heterocigosidad esperada (uHe) para inferir sobre el nivel de diversidad genética de la población estudiada de *Prunus serotina* se utilizó esta valor estadístico ya que incluye la ploidía de la especie y corrige parentescos entre muestras (Pruett & Winker, 2008). Al analizar los datos obtenidos (Tabla 2), vemos que el valor de uHe promedio de la población fue de 0.284. Los valores de uHe más altos corresponden a las provincias de Carchi (0.311) y Chimborazo (0.303), y los valores de uHe más bajos se vieron en las provincias de Imbabura (0.239) y cañar (0.265).

8.3 Índices de distancia genética.

Se realizaron algunas pruebas estadísticas para estimar sobre la estructura poblacional del capulí en la sierra ecuatoriana. Los índices de distancia genética de Nei entre provincia fueron relativamente bajos (Tabla 3); éstos variaron entre 0.018 a 0.069 lo cual puede ser interpretado como un bajo nivel de diferenciación genética entre individuos de diferentes provincias. A pesar de ser un poco menores, estos valores son equivalentes a los obtenidos con marcadores SSR (0.02 a 0.09), resultados que también demuestran una baja diferenciación genética de *Prunus serotina* a nivel provincial

(Guadalupe et. al., 2015). Los valores más altos corresponden a las comparaciones entre provincias de Cañar y Tungurahua (0.069), Cañar y Carchi (0.062), y Cañar y Cotopaxi (0.056). Es importante recalcar que la provincia de Cañar posee los valores de disimilitud genética más altos con los demás grupos poblacionales, lo que podría sugerir una mayor diferenciación genética en relación al resto de provincias. Por otro lado, las provincias con menores diferencias fueron Carchi y Pichincha (0.018), y Tungurahua y Pichincha (0.018), y Chimborazo y Tungurahua (0.028).

8.3 Estructura poblacional.

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para establecer el nivel de variación dentro de la especie e inferir sobre la estructura de la población. Se pudo evidenciar que no existen diferencias significativas que establezcan una separación por provincias. Se puede mencionar que el 99% de la variación se encuentra dentro de las poblaciones, mientras que el 1% de la variación está dada entre individuos de las diferentes provincias (Tabla 4).

Así mismo, en el análisis de coordenadas principales (PCoA), no se puede observar agrupamientos claros, es decir, no existe un patrón de ordenamiento por provincias o zonas geográficas (Figura 4). Se pueden visualizar dos agrupamientos principales que contienen aleatoriamente muestras de todas las provincias estudiadas.

9. Discusión

9.1 Genotipado y patrones de amplificación.

Los estudios de diversidad genética son una herramienta útil para comprender el estado de conservación y los patrones de distribución geográfica del acervo genético de las especies. Por tanto, éstos proveen sustento empírico para el diseño de programas de protección, fitomejoramiento y uso sostenible de los recursos genéticos (Ferne, Radmor, & Zamir, 2006).

El capulí (*Prunus serotina*) es una especie de gran importancia etnobotánica en el Ecuador, que además presenta un amplio potencial agroindustrial. Su relevancia cultural y económica impulsó el primer análisis de diversidad genética y estructura poblacional de la especie a nivel nacional. Guadalupe y colaboradores (2015) utilizaron marcadores moleculares microsatélites (SSR) para caracterizar 217 individuos de capulí colectados a partir de 8 provincias de la Sierra ecuatoriana. Este estudio, evidenció una moderada diversidad genética para la especie en el Ecuador; establecido en base a que obtuvieron índices de heterocigosidad altos y la existencia de una menor riqueza alélica en el acervo ecuatoriano relativo al acervo norteamericano, similar a observaciones realizadas en otras investigaciones (Downey & Iezzoni, 2000). Los autores también demostraron que, a pesar de existir flujo génico entre provincias, existe una sutil diferenciación genética entre las provincias sureñas (Cañar y Azuay) de las provincias norteñas (Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo). Con estos antecedentes, se sugirió trabajar con otro marcador molecular que permita sustentar y esclarecer los resultados encontrados en el estudio mencionado.

La elección de marcadores AFLP para la realización de este estudio se justificó

principalmente en base a su capacidad para cubrir amplia y aleatoriamente el genoma de las especies (Aradhya, Weeks, & Simon, 2004). Al combinar las técnicas de corte con enzimas de restricción y PCR con varias combinaciones de primers, se puede generar un gran número de fragmentos polimórficos, los cuales son representativos del genoma total de la especie estudiada (Vos, Hogers, Bleeker, Rijans, & Van de Lee, 1995).

A partir de 5 combinaciones de primers EcoR I/ Mse I probadas, únicamente 3 fueron utilizadas (M-CTC/E-ACT, M-CTC/E-AAG, M-CTG/E-AAG), pues estas rindieron patrones de amplificaciones polimórficos, consistentes, claros y reproducibles. Se obtuvo un total de 57 fragmentos polimórficos en las 80 accesiones de capulí estudiadas, lo cual demuestra la efectividad de los marcadores AFLP para generar un gran número de fragmentos. En estudios similares con especies relacionadas (*Prunus avium* y *Prunus domestica*) también se han reportado el hallazgo de un gran número de bandas polimórficas al utilizar marcadores AFLP (Aradhya, Weeks, & Simon, 2004; Panaud, Chaib, & Sarr, 2000; Struss, Ahmad, & Southwick, 2003).

9.2 Diversidad Genética.

Los resultados obtenidos del análisis de 3 combinaciones de primers AFLP en 80 accesiones de capulí, demuestran que el valor promedio de heterocigosidad esperada (uHe) en la población fue de 0.284; valor de diversidad genética que puede estar relacionado con especies emparentadas no endémicas (Xu et al, 2006). Xu y colaboradores (2006), evaluaron el nivel diversidad y parentesco genético entre individuos silvestres y comerciales del durazno japonés (*Prunus pérsica* L.) utilizando marcadores moleculares AFLP. Ellos pudieron establecer que el índice de diversidad genética es menor en las accesiones comerciales ($H= 0.18$) que en las accesiones silvestres ($H= 0.35$). En el caso del capulí, al ser una especie introducida y parcialmente

domesticada, es decir, no ha sido sometida completamente a eventos agrícolas o de mejoramiento genético (CESA, 1992), se podría especular que su nivel de diversidad genética ($uHe = 0.28$), corresponde al de una especie no endémica y que no ha sido sometida a un proceso de selección artificial, lo que podría reducir su acervo genético (Powell et. al., 1996).

Contrariamente, Guadalupe y colaboradores (2015) observaron un mayor valor de heterocigosidad esperada para el capulí ($He = 0.71$) pero los autores especularon que el nivel reducido de riqueza alélica en la especie (en relación a poblaciones de Norte América) podría estar relacionado a la limitada diversidad que se introdujo en el Ecuador durante épocas de colonia. Por tanto, no se puede descartar un efecto fundador que disminuiría la variabilidad genética de la especie; ya sea por la introducción de un acervo reducido o porque solo parte del acervo introducido en el país tuvo la capacidad de adaptación a las condiciones locales (Ramanatha Rao & Hodgkin, 2002).

Pairon y colaboradores (2010), establecieron que las variedades introducidas de *Prunus serotina* en Europa poseen una diversidad genética menor en comparación con sus parientes nativos de Norte América. Al igual que sus parientes Europeos, los individuos de *Prunus serotina* subsp. capulí (Cav.) ecuatorianos muestran una reducida variación con respecto a su centro de origen, por lo que es muy posible que la variabilidad genética presente refleje, de alguna manera, una única introducción de la especie en tiempos de colonia. Sería importante contrastar esta información con estudios de diversidad genética en el centro de origen del capulí, para entender los eventos evolutivos (Deriva genética, efecto fundador, cuello de botella, etc.) involucrados en la adaptación de *P. serotina* en el territorio nacional (Lee, 2002).

Finalmente, es importante destacar que la contundente diferencia entre los

valores de heterocigosidad esperada de este estudio y los de Guadalupe y sus colaboradores (2015), es común o recurrente en especies vegetales donde se utilizan marcadores moleculares AFLP y SSR. Un estudio realizado por Wayne Powell y sus colaboradores (1996) compararon el comportamiento de diferentes técnicas moleculares en germoplasma de soya tanto cultivada como silvestre, para estudiar su diversidad. Los resultados obtenidos fueron una mayor heterocigosidad esperada (H_e) en los procedimientos con SSR (0.60) en comparación con los realizados con AFLP (0.32), los demás índices que infieren sobre la diversidad y estructura poblacional fueron menores también en AFLP. Otro ejemplo que concuerda con esta observación, es el estudio comparativo de varios marcadores moleculares (RAPD, RFLP, AFLP y SSR) para inferir sobre la diversidad de cultivares de maíz tropical, aquí también se presenta una subestimación de los valores de diversidad genética en AFLP en comparación con SSR (García et al, 2004). Estas diferencias podrían ser explicadas e interpretadas al entender los principios moleculares de cada técnica, los AFLP tienen la capacidad de detectar varios loci a lo largo del genoma, mientras que los SSR, detectan múltiples alelos en un locus específico (Archak, Gaikmad, Gautam , & Rao, 2003).

9.3 Estructura poblacional.

Continuando con el análisis, se evidenció que los índices de las distancias genéticas de Nei, variaron entre 0.018 y 0.069 lo cual demuestra la inexistencia de una estructura poblacional para el capulí ecuatoriano a nivel provincial. Esta observación es válida por los resultados del AMOVA, los cuales establecen que no existen diferencias significativas que establezcan diferenciación genética entre individuos de diferentes provincias (Wright, 1943). Los valores de distancia de Nei obtenidos con marcadores SSR fueron levemente mayores (0.02 y 0.09; Guadalupe et. al., 2015) que los obtenidos

en esta investigación con marcadores AFLP. Nuevamente este fenómeno donde se subestima los valores de los índices que infieren sobre diversidad y estructura poblacional por parte de los AFLP, es recurrente en especies vegetales (Powell et. al., 1996).

Guadalupe y colaboradores (2015) encontraron una leve diferenciación genética entre las accesiones del sur (Azuay y Cañar) y las del resto de provincias del centro – norte (Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi y Chimborazo). Con el análisis de marcadores AFLP no se visualiza tal sutil estructura poblacional. Sin embargo, si se pudo observar que la provincia sureña de Cañar presenta los valores más altos de distancia génica en relación a las demás provincias, lo que concuerda de cierta manera con la hipótesis propuesta por Guadalupe y colaboradores (2015). Además, también se constató que los valores de índice de Nei son mayores para las provincias de Cotopaxi y Tungurahua, lo que podría aumentar su similitud genética con las demás provincias. Se conoce que tanto Tungurahua como Cotopaxi son dos centros importantes de producción y comercio del capulí; incluso existen festividades tradicionales en las épocas de cosecha del fruto, estas costumbres históricas y ancestrales pueden ser propicio para el intercambio semillas y plantas de diferentes orígenes geográficos (Diario El Comercio, 2012; Palacios, 2011). Esta movilización, producto de la acción humana, podría estar relacionada con la homogeneización del acervo genético de *P. serotina*. Los pocos registros bibliográficos disponibles mencionan que el capulí es una especie valorada principalmente por la población indígena de la sierra ecuatoriana, esta sección de la población tiene como principal actividad económica la agricultura y el comercio, los cuales están involucrados directamente en la movilización de individuos por semillas o estacas, de zonas rurales al perímetro urbano (CONABIO, 2012; Popenoe & Pachano, 1922).

Por otro lado, la escasa diferenciación entre provincias puede estar relacionado al flujo genético entre individuos de *P. serotina*. Se conoce que el capulí es una especie alógama (se reproduce por polinización cruzada), por lo que presenta una mayor tasa de flujo genético; esto podría intervenir en la homogeneización del acervo genético del capulí (Mille, 1942). De esta forma, se puede inferir acerca del flujo génico presente en las accesiones de capulí, está relacionado con la forma de reproducción y a los procesos migratorios del cultivo, lo cual podría influir en la homogeneización de acervo genético de *Prunus serotina* (Klug, Cummings, & Spencer, 2006).

Finalmente, es importante indicar, que esta investigación junto con el proyecto de Guadalupe y sus colaboradores (2015), dan un panorama inicial de la diversidad de la especie y su estructura poblacional, esta información puede ser utilizada para preservar la diversidad y potenciar su uso a través del mejoramiento genético (Mondini, 2009). La información proveniente de estas investigaciones también puede ser útil para la promoción del cultivo del capulí en la sierra del Ecuador, lo que podría generar nuevas economías agrícolas en las zonas rurales, mejorando la calidad de vida del agricultor. Sería importante realizar un estudio en el que se utilicen un mayor número de marcadores moleculares, junto con una muestra mucho más representativa y que abarque un mayor espacio geográfico; con el fin de esclarecer el o comprobar los resultados obtenidos en estas investigaciones (Frankel, Brown, & Burdon, 1998).

10. Conclusiones

- Se pudo realizar el estudio en capulí (*Prunus serotina*) utilizando primers AFLP obtenidos aleatoriamente del Kit 1 de Invitrogen, 3 de estos primers mostraron ser polimórficos y útiles para evaluar la diversidad genética del capulí.
- Una vez realizada la investigación, se pudo observar una diversidad genética menor en AFLP que en SSR en las accesiones de las 8 provincias de la sierra ecuatoriana (Carchi, Tulcán, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Cañar y Azuay) utilizadas en el estudio. Sin embargo, el valor de diversidad genética puede estar relacionado a una especie introducida y parcialmente domesticada (Xu et al, 2006), como es el caso del capulí.
- La investigación identificó una baja diferenciación en las accesiones estudiadas, además de que no se presenta una estructura poblacional referenciada por provincias. Esto podría deberse a la inexistencia de un cultivo establecido del capulí; sino más bien, las comunas andinas dedicadas a la agricultura, han dispersado a la especie de acuerdo a intereses agrarios, sociales y económicos a lo largo del tiempo.
- El flujo genético entre individuos tiene incidencia en la homogeneización del acervo genético, se considera que el tipo de reproducción (especie alógama) y la migración por la acción humana, podrían contribuir en uniformizar los alelos presentes en la población de capulí.
- El estudio de la diversidad genética, resulta de enorme interés para emprender futuros programas de conservación y preservación del germoplasma. El manejo de esta información puede ser empleada para generar programas de agricultura sostenible, donde se beneficie tanto la conservación de la especie como la economía del agricultor.

- Finalmente, se requiere mayor información literaria que tenga referencia del cultivo del capulí en el Ecuador. De esta forma, se entenderían mejor los patrones de migración, cultivo y propagación de la especie lo que permitirá construir su filogenia evolutiva.

11. Recomendaciones

- ✓ Se recomienda ampliar el número de primers AFLPs u otros que sean de interés, de manera que permitan robustecer los resultados obtenidos en este estudio. Fundamentalmente para aumentar la precisión de los valores de diversidad genética y agrupamientos poblacionales obtenidos.
- ✓ Se podrían utilizar técnicas genómicas actuales de secuenciación como la secuenciación de representación reducida (RRL), secuenciación de enzimas de restricción (RAD-seq) y genotipado por secuenciación (GBS) que nos brinden información más precisa sobre la caracterización genotípica, ya que permiten una cobertura del genoma con una gran cantidad de marcadores y acelera los tiempos de evaluación y análisis.
- ✓ Se podría mejorar la confiabilidad en los resultados obtenidos, aumentando el número de accesiones por provincia. De esta forma tendremos un muestreo más amplio y homogéneo. Sería importante incluir muestras del sur del país (Loja) y del sur del continente (Perú), lo que permitiría esclarecer la leve diferenciación de las provincias sureñas (Cañar y Azuay) del resto de provincias.
- ✓ Se pueden emplear estrategias para la recolección de datos antropológicos y agrícolas, con el fin de incrementar los conocimientos existentes de los procesos de domesticación, cultivo, comercio y distribución de *Prunus serotina* en el

callejón interandino del país.

- ✓ Se pueden ejecutar mejores análisis donde intervengan programas estadísticos de mayor complejidad, los cuales permitan establecer comparaciones entre los índices de diversidad y estructura poblacional de los diferentes marcadores moleculares. Así mismo, se podría realizar cálculos los cuales involucren características referenciales específicas de la especie.

12. Bibliografía

- Aradhya, M., Weeks, C., & Simon, C. (2004). Molecular characterization of variability and relationships among seven cultivated and selected wild species of *Prunus* L. Using amplified fragment length polymorphism. *Scientis Horticulturae*, 131-144.
- Archak, S., Gaikmad, A. B., Gautam , D., & Rao, E. V. (2003). Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome*, 46(3), 362-369.
- Auclair, A. &. (1971). Dynamics of black cherry (*Prunus serotina* Erhr.) in Southern Wisconsin oak forests. . *Ecological Monographs*, 41(2), 153-177.
- Benbouza, H. J.-M.-P. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap, and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*(2), 77-81.
- Budak, H. B. (2004). Potential uses of molecular markers in crop improvement. *KSU Journal of Science and Engineering*, 7(1), 75-79.
- CESA. (1992). Usos Tradicionales de las Especies Forestales Nativas en el Ecuador. *Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas*, 16-18.
- Comai, L. (2000). Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology*, 43, 387-399.
- CONABIO. (2012). *Prunus serotina*. Obtenido de Gobierno de la Republica de México: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles

doctos/60rosac6m.pdf

Cubero, J. (2002). Introducción a la Mejora Genética Vegetal. *Mundi Prensa*, 70-80.

De Vienne, D. (2003). *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc.

Diario El Comercio. (2012). El capulí es un fruto andino que se desarrolla y degusta en la serranía. 2(5).

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

Echenique, V., Rubistein, C., & Mroginski, L. (2004). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal*. Buenos Aires,.

Fernie, A., Radmor, Y., & Zamir, D. (2006). *Natural genetic variation for improving crop quality*.

Frankel, O., Brown, A., & Burdon, J. (1998). *The conservation of Plant Biodiversity*. Edinburgh: Cambridge University Press.

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

Garcia, A., Benchimol, L., Barbosa, A., Geraldi, C., & de Souza, A. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology*, 579-588.

Gepts, P. (2006). Plant Genetic Resources Conservation and Utilization. *Crop Science*,

2278-2292.

Giancola, S., Marcucci, S., Lacaze, P., & Hopp, H. (2002). Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica*, 95-113.

Guadalupe, J., Gutiérrez, B., Intriago, D., Arana, V., Tobar, J., Torres, A., & Torres, M. (2015). Genetic diversity and distribution patterns of Ecuadorian capuli (*Prunus serotina*). *Biochemical Systematics and Ecology*(60), 67-73.

Henry, R. (2013). *Molecular Markers in Plants*. Iowa: Wiley Blackwell.

Hlatky, A. (1990). *El Capulí: Informe preliminar de dos variedades y cuatro sistemas de formación*. Quito: INIAP.

Hou, Y., & Lou, A. (2011). *Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, Rhodiola dumulosa (Crassulaceae)*.

Invitrogen Life Technologies. (2003). *Instruction Manual AFLP Analysis System I and Starter Primer Kit. Catalog nos. 10544-013 version B*.

Jiménez, M. C. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp. capulí) extracts. . *Rev. Mex. Ing. Química*, 10(1), 29-37.

Klug, W., Cummings, M., & Spencer, C. (2006). *Conceptos de genética*. Madrid: Pearson Education S.A.

Lee, C. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 79-85.

- McVaugh, R. (1951). A revision of the North American black cherries (*Prunus serotina* Ehrh. and Relatives) . *Brittonia*, 279-315.
- Mille, L. (1942). El Capuli. *FLORA Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador*, 02, 50-51.
- Mondini, L. N. (2009). Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity*, 1, 19-35.
- Moose, S., & Mumm, R. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, 968-977.
- Morrell, P. L. (2003). Distinct geographic patterns of genetic diversity are maintained in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite. *PNAS*, 100, 10812-10817.
- Moyano, A., Elena, C., & Bernasconi, E. (2008). Efecto de la reforestación con *Prunus Avium* sobre el secuestro de carbono tanto por la biomasa como por el suelo. *II Reunión sobre suelos forestales*, 333-337.
- Nuez, F., & Carrillo, J. (2000). *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Pairon, M., Petitpierre, B., Campbell, M., Guisan, A., Broennimann, O., Baret, P., . . . Besnard, G. (2010). Multiple introductions boosted genetic diversity in the invasive range of black cherry (*Prunus serotina*; Rosaceae). *Annals of Botany*, 133(3), 881-890.
- Palacios, W. (2011). Árboles del Ecuador. En M. d.-G. Ecuador. Quito: Grupo Comunicacional Efigie.

- Panaud, O., Chaib, A., & Sarr, A. (2000). Dynamic conservation of apricot *Prunus armeniaca* in saharian oases: use of AFLP markers to assess genetic diversity in traditional orchards. *Kluwer Academic Publishers*, 301-305.
- Popenoe, W., & Pachano, A. (1922). The capulin cherry. *Journal of Heredity*(13), 50-62.
- Powell, W., Morgante, M., Andres, C., Hanafety, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Kluwer Academic Publishers*, 225-238.
- Primack, R. (2006). *Essentials of conservation biology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Ramanatha Rao, V., & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1-19.
- Ríos, M., Kozoil, M. J., Borgtoft, H., & Granda, G. (2008). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito: Abya-Yala.
- Simpson, J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 119-122.
- Spier, H., & Biederbick, C. (1980). Árboles y leñosas para reforestar las tierras altas de la región interandina del Ecuador. *Consejo Provincial del Ecuador*(02), 21-23.
- Struss, D., Ahmad, R., & Southwick, S. (2003). Analysis of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. *American Society for Horticultural Science*, 904-909.

- Ulloa , C., & Moller, P. (1995). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Quito: Editorial Abya – Yala.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Rijans, M., & Van de Lee, T. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res*, 23, 4407-4414.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, R., & Rafalski, J. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 6531-6535.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 114-138.
- Xu, D., Wahyuni, S., Sato, Y., Yamaguchi, M., Tsunematsu, H., & Ban, T. (2006). Genetic diversity and relationships of japanese Peach (*Prunus persica* L.) cultivars revealed by AFLP and pedigree tracing. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 883-890.

13. Tablas

Tabla 1. Patrones de bandas por población (Abreviaciones: Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay). Valores de Porcentaje de polimorfismos, numero de bandas con frecuencia mayor o igual al 5% (Bandas polimórficas) y bandas únicas por provincia.

<i>Patrones de bandas totales por población (Genotipado)</i>								
Población	Car	Imb	Pic	Cot	Tun	Chi	Can	Azu
No. de Bandas	49	46	46	50	48	49	50	45
No. Bandas con Freq. $\geq 5\%$ (polimórficas)	49	46	46	50	48	49	50	45
No. Bandas únicas	0	0	0	2	0	0	0	0

Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

Tabla 2. Valor calculado del índice de diversidad genética: Unbiased Expected Heterozygosity (uHe). Población (Abreviaciones: Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay).

Provincias	Car	Imb	Pic	Cot	Tun	Chi	Can	Azu
Unbiased Expected Heterozygosity (uHe)	0.31	0.23	0.29	0.28	0.28	0.30	0.26	0.29
Promedio poblacional total								0.284

Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

Tabla 3. Valores del índice de distancia genética (Pairwise Population Matrix of Nei Genetic Distance) provenientes de las provincias analizadas (Abreviaciones: Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay)

Matriz de las distancias genéticas de Nei								
Car	Imb	Pic	Cot	Tun	Chi	Can	Azu	
0,000	-	-	-	-	-	-	-	Car
0,038	0,000	-	-	-	-	-	-	Imb
0,018	0,032	0,000	-	-	-	-	-	Pic
0,037	0,038	0,032	0,000	-	-	-	-	Cot
0,023	0,045	0,018	0,036	0,000	-	-	-	Tun
0,034	0,036	0,028	0,036	0,043	0,000	-	-	Chi
0,062	0,054	0,056	0,056	0,069	0,037	0,000	-	Can
0,028	0,049	0,029	0,045	0,036	0,026	0,036	0,000	Azu

Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

Tabla 4. Valores calculados para el análisis de la varianza molecular (AMOVA).

Resumen de la tabla AMOVA					
Valor	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre poblaciones	7	69.188	9.884	0.095	1%
Dentro de poblaciones	72	642.900	8.929	8.929	99%
Total	79	712.088		9.025	100%
Estadística Stat	Valor	P(rand >= data)			
Valor PhiPT	0.011	0.166			
Valor PhiPT max	0.687				
Valor Phi'PT	0.015				

Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

14. Figuras

Figura 1. Esquema molecular del funcionamiento de la Técnica AFLP obtenida el manual de ALFPs de Invitrogen.

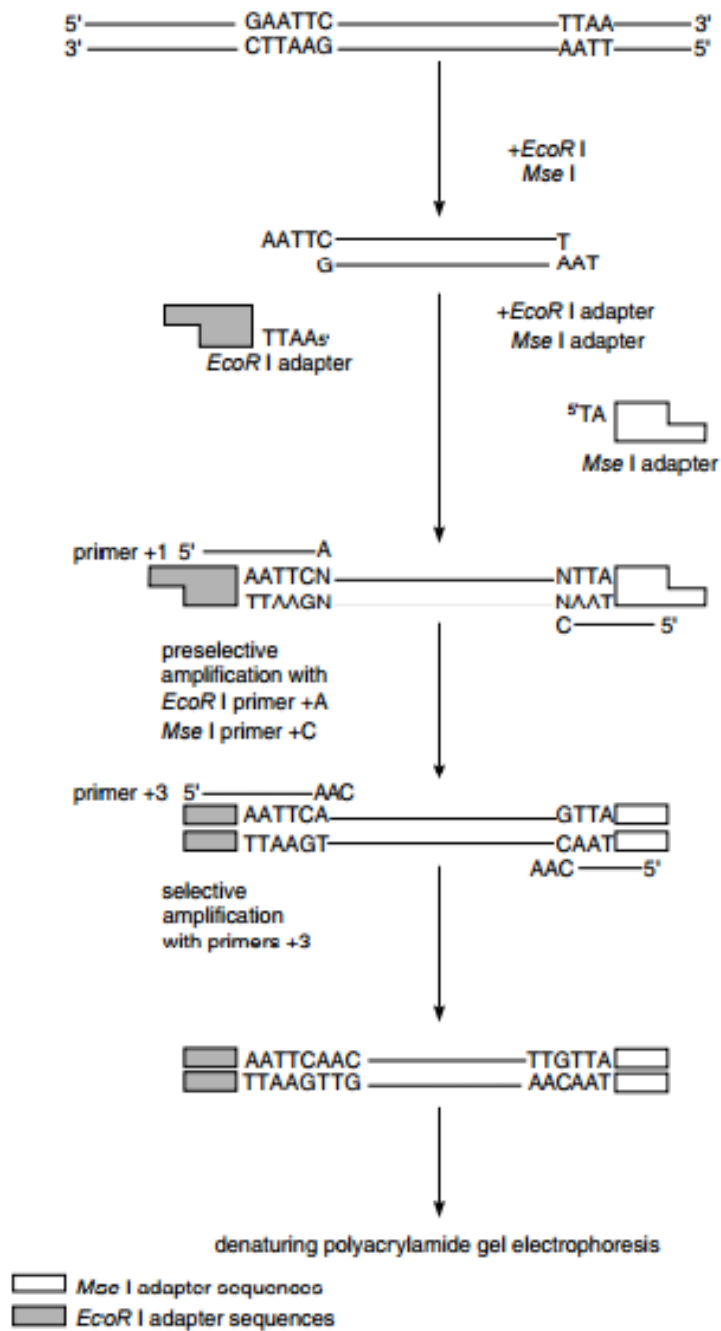
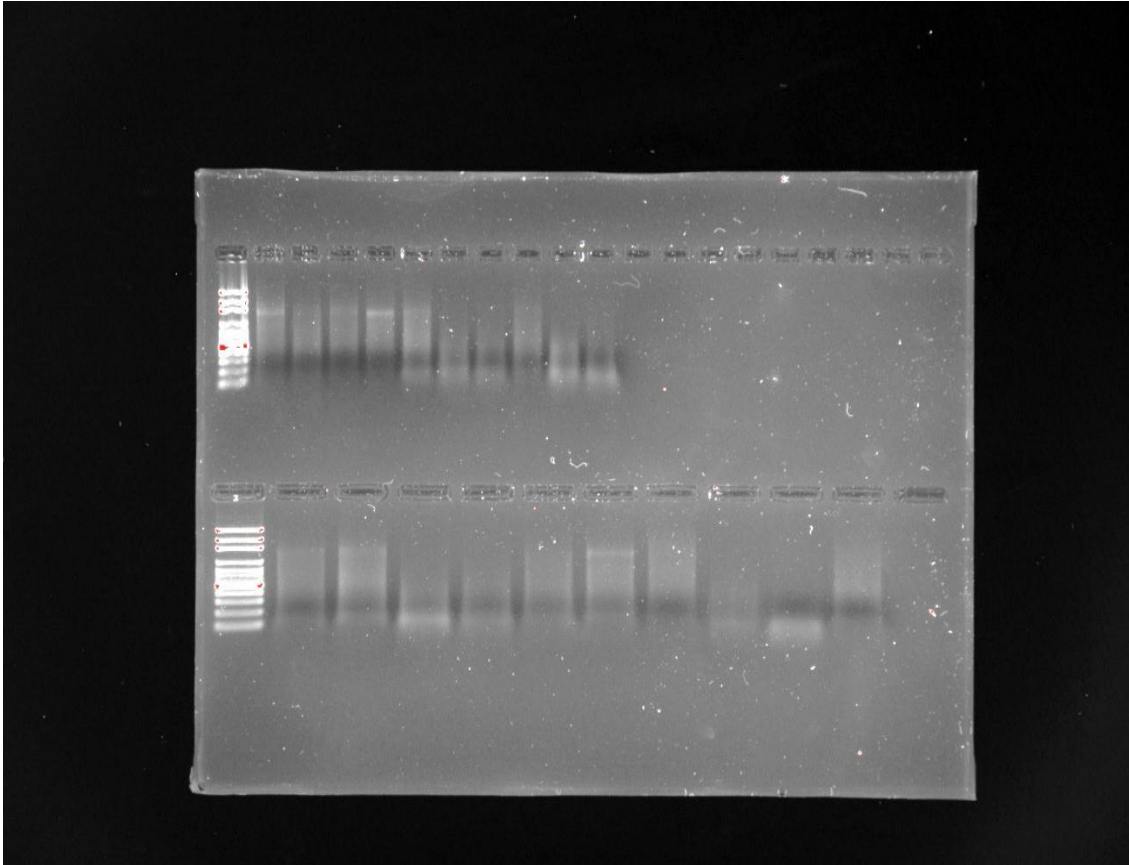
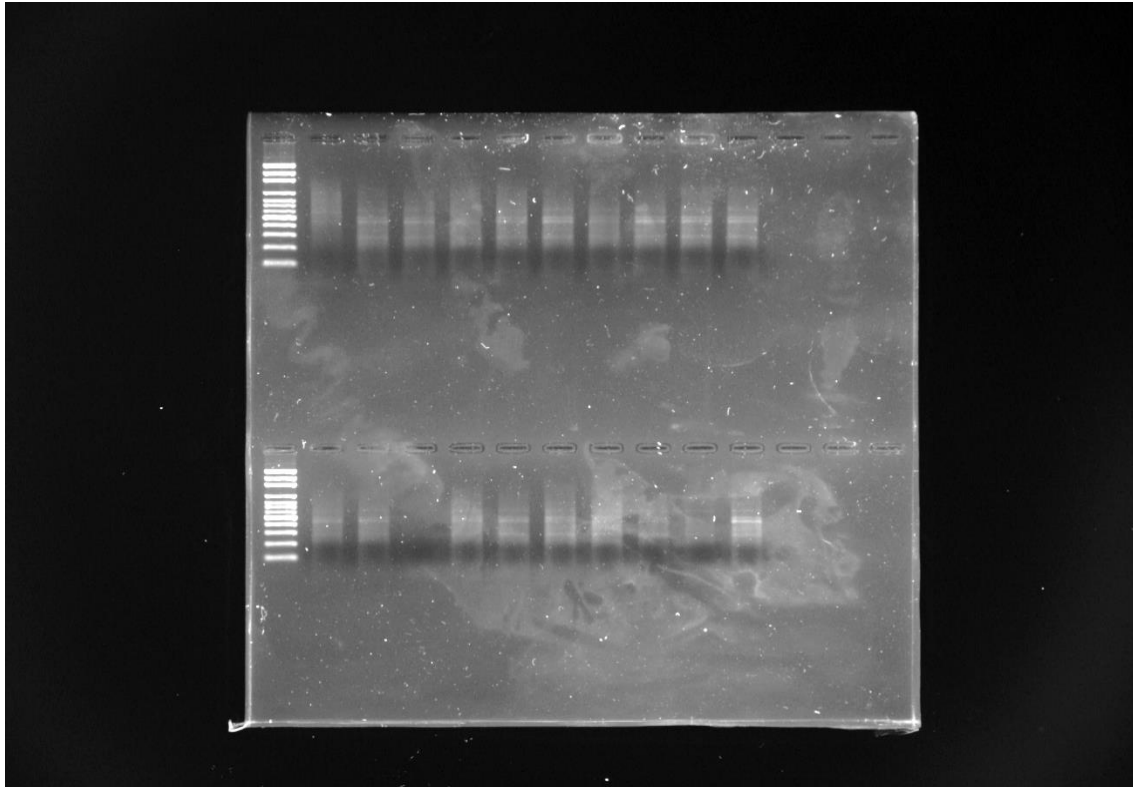


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1% de ADN genómico de 10 muestras de las provincia de Azuay. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Azu) luego del proceso de restricción por enzimas. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Azu) luego del proceso de ligación de adaptadores.



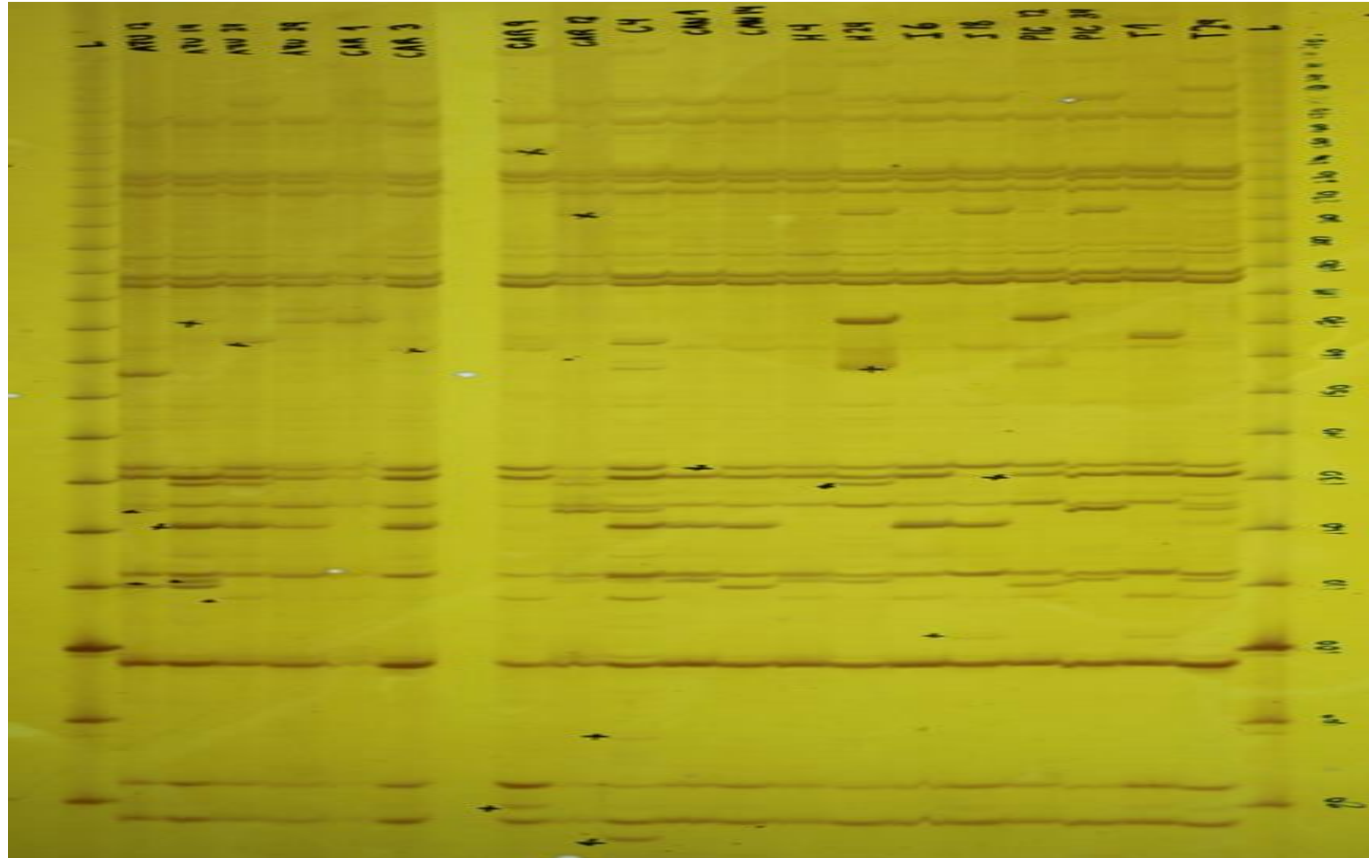
Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

Figura 3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% de ADN genómico de 10 muestras de las provincia de Pichincha y Tunguragua. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Azu) luego del proceso de amplificación pre-selectiva. En la parte superior del gel se observa de izquierda a derecha el Ladder (LD) 100bp (Invitrogen), seguido de las muestras (Tun) luego del proceso de amplificación pre-selectiva



Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida 6% de los productos de amplificación selectiva con el primer (A) M-CTC/E-ACT en 20 muestras de ADN de capulí de 8 provincias del Ecuador (Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar y Azuay).



Elaborado por: Moncayo, Omar (2017)

Figura 5. PCoA obtenido de la matriz binaria con los datos de las 80 muestras utilizando las 3 combinaciones de primer AFLP. Se usó el programa DARwin 5.0.158 Referencia: Carchi-naranja, Imbabura-verde, Pichincha-amarillo, Cotopaxi-menta, Tungurahua-lila, Chimborazo-azul, Cañar-café, Azuay-plomo.

