



**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGROPECUARIA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 54
ACCESIONES DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)
Y 60 DE MANGO (*Mangifera indica* L.) A TRAVÉS DE
MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES DE
LAS COLECCIONES DEL BANCO DE
GERMOPLASMA DEL INIAP”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

ARMAS MORENO MÓNICA ISABEL

LA LIBERTAD – ECUADOR

2013

**UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGROPECUARIA**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 54
ACCESIONES DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)
Y 60 DE MANGO (*Mangifera indica* L.) A TRAVÉS DE
MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES DE
LAS COLECCIONES DEL BANCO DE
GERMOPLASMA DEL INIAP”**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERA AGROPECUARIA

ARMAS MORENO MÓNICA ISABEL

LA LIBERTAD – ECUADOR

2013

TRIBUNAL DE GRADO

Ing. Antonio Mora Alcívar, MSc.
DECANO DE LA FACULTAD

Ing. Andrés Drouet Candell, Msc.
DIRECTOR DE ESCUELA

Blgo. Javier Soto Valenzuela
PROFESOR TUTOR

Ing. Clotilde Andrade V, MSc.
PROFESORA DEL ÁREA

Ab. Milton Zambrano Coronado, MSc.
SECRETARIO GENERAL-PROCURADOR

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado, **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 54 ACCESIONES DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) Y 60 DE MANGO (*Mangifera indica* L.) A TRAVÉS DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES DE LAS COLECCIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIAP”**, realizado por la egresada Mónica Isabel Armas Moreno ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad Estatal Península de Santa Elena como lo indica el Reglamento del Trabajo de Titulación o Graduación de la Universidad.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el PROYECTO 2100527024 “Plan e Investigación para seguridad alimentaria-Biotecnología”, se deja en libertad de la autora y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (PDF). Se autoriza a Mónica Isabel Armas Moreno que lo entregue al Ing. Andrés Drouet Candell, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

La Libertad, 12 de Julio del 2012

Ing. Andrés Drouet Candell
DIRECTOR DE LA CARRERA

Dr. Eduardo Morillo V.
CO-DIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, MÓNICA ISABEL ARMAS MORENO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 54 ACCESIONES DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) Y 60 DE MANGO (*Mangifera indica* L.) A TRAVÉS DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES DE LAS COLECCIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIAP”**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derecho intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

La Libertad, 12 Julio del 2012.

Mónica Isabel Armas Moreno

AUTORIZACIÓN

Yo, MÓNICA ISABEL ARMAS MORENO

Autorizo a la Universidad Estatal Península de Santa Elena la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 54 ACCESIONES DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) Y 60 DE MANGO (*Mangifera indica* L.) A TRAVÉS DE MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES DE LAS COLECCIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIAP”**, cuya contenido, ideas y criterios son de exclusiva responsabilidad y autoría.

La Libertad, 12 de Julio del 2012.

Mónica Isabel Armas Moreno

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, quien con su inmenso amor me brindó la fortaleza necesaria para seguir adelante y no ceder en el camino.

A mi familia, especialmente a mis padres César y Graciela, quienes incansablemente estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional, consejos y amor; por verme alcanzar una de mis metas propuestas. Fueron ellos el pilar fundamental para que yo pudiera alcanzar con éxito este propósito.

A mi hijo Franco, quien durante el tiempo de elaboración de este trabajo supo esperar pacientemente y me motivó siempre.

A Roberto Bracamonte F., quien me impulsó a tomar la decisión de avanzar en mi lucha constante de superación.

MÓNICA

AGRADECIMIENTOS

Al equipo profesional de trabajo del Proyecto Fortalecimiento Biotecnología, mediante el Departamento de Biotecnología de la Estaciones Experimentales Litoral Sur y Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, por permitirme participar en la formulación y desarrollo de la Tesis de grado.

Al Dr. Walter Reyes Borja; por su confianza, por acceder a desarrollarme dentro de su selecto equipo de trabajo al cual en su conjunto, también ofrezco mi sincero agradecimiento.

Al Dr. Eduardo Morillo V. por ofrecerme su apoyo incondicional en el desarrollo de la parte experimental, además de darme la oportunidad de incrementar mi conocimiento en el exigente campo del desarrollo de la agricultura; estaré siempre agradecida por sus sabios consejos que son parte de esta tesis.

A la Ing. Gabriela Miño por sus conocimientos, tiempo y pericia técnica aportados al desarrollo de mi trabajo en su fase experimental.

A mis compañeros de laboratorio de la Estación Experimental Litoral Sur y la Estación Experimental Santa Catalina, quienes compartieron conmigo su amistad, conocimientos y espíritu de colaboración, gracias Ing. Ma.Eugenia Romero, Ing. Elena Corozo, Ing. Wladimir Jiménez, Ing. Diego Portalanza, Ing. Nelson Moreano, Ing. Pablo Zambrano Biol. Carmen Valladares, Ing. Lenín Arana, Alex Valarezo, José Acosta y Víctor Pincay.

A mi incondicional amiga Ing. Bárbara Ordoñez S, quien siempre estuvo a mi lado brindándome apoyo y sincera amistad; gracias por todos estos años de afecto.

Gracias por todo este tiempo compartido con ustedes, por los momentos gratos e imperecederos que estarán como un sello de una especial etapa de nuestras vidas.

Anhelo contar con su amistad por siempre.

Muchas gracias a todos

Mónica

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLPs	Polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados
ARN	Ácido ribonucleico
bp	pares de bases
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
CIA	Cloroformo Alcohol Isoamílico
CIAT	Centro Internacional de Agricultura Tropical
CDB	Convención sobre Diversidad Biológica
dNTPs	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Ácido Etilen diamino Tetra Acético
EtBr	Bromuro de Etidio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
MBD	Matriz binaria de datos
MRSPs	Mapas de sitios de restricción polimórficos
mM	milimolar
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
msnm	metros sobre el nivel del mar
ng	nanogramos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVP	Polivinil pirrolidona
ppm	partes por millón
RAPDs	DNA polimórfico amplificado aleatoriamente
RFLPs	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
SSRs	Secuencias simples repetidas
TAE	Tris Base-Ácido glacial acético-EDTA
Tris-HCl	Hidroximetil amino metano
TM	Tonelada métrica
TE	Tris-EDTA

UPGMA	Método de agrupamiento por media de aritméticas no ponderable
μl	microlitro
μM	micromolar
V	Voltios
VNTRs	Número variable de repeticiones en tándem

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivo Específico	5
1.4 Hipótesis	5
2 REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Guanábana (<i>Annona muricata</i> L.)	6
2.1.1 Origen y clasificación taxonómica	6
2.1.2 Aspectos botánicos de la guanábana	7
2.1.3 Importancia del cultivo	8
2.1.4 Producción en el Ecuador	9
2.2 Mango (<i>Mangifera indica</i>)	10
2.2.1 Origen y clasificación taxonómica	10
2.2.2 Aspectos botánicos del mango	11
2.2.3 Aspectos genéticos	12
2.2.4 Importancia del cultivo	12
2.2.5 Producción en el Ecuador	13
2.3 Recursos genéticos	14
2.3.1 Conservación de los recursos genéticos	14
• Conservación <i>in situ</i>	14
• Conservación <i>ex situ</i>	15
2.3.2 Bancos de germoplasma	16
2.4 Caracterización de germoplasma	17
2.4.1 Marcadores	18
2.4.1.1 Marcadores morfológicos	18
2.4.1.2 Marcadores moleculares	18
• RAPDs	20
• Microsatélites	21

3	MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1	Ubicación geográfica del sitio experimental	23
3.2	Fases experimentales	23
3.2.1	Fase de campo	23
3.2.1.1	Características climáticas y edafológicas	23
3.2.2	Fase de laboratorio	24
3.3	Análisis estadístico	25
3.4	Materiales, reactivos y equipos de laboratorio	26
3.5	Manejo específico del experimento	26
3.5.1	Colecta del material vegetal	26
3.5.2	Extracción de ADN genómico	27
3.5.3	Cuantificación de ADN	29
3.5.4	Prueba de amplificación de ADN	30
3.5.4.1	Amplificación ADN guanábana	30
3.5.4.2	Amplificación ADN mango	31
3.5.5	Caracterización de genotipos	31
3.5.5.1	Caracterización guanábana	31
	a.)Transferibilidad de SSRs de <i>A. cherimola</i> a <i>A. muricata</i>	32
	b.)Amplificación de ADN de guanábana con SSRs seleccionados	33
	c.)Pre-screening de marcadores RAPDs	33
	d.)Caracterización de genotipos de guanábana con marcadores RAPDs	35
3.5.5.2	Caracterización mango	35
	a.)Amplificación de ADN de mango con <i>primers</i> SSRs	36
	b.)Genotipaje en geles de acrilamida	37
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Resultados	38
4.1.2	Extracción y cuantificación de ADN	38
4.1.3	Amplificación de ADN	40
4.1.4	Transferibilidad de <i>primers</i> SSRs	41
4.1.5	Pre-screening y selección de <i>primers</i> RAPDs y genotipaje de la colección de guanábana.	44
4.1.6	Índices de diversidad genética	46
4.1.6.1	Definición de grupos genéticos (<i>clusters</i>)	48

4.2	Discusión	58
4.2.1	Método de extracción	58
4.2.2	Amplificación ADN guanábana y mango	59
4.2.3	Transferibilidad de SSRs de chirimoya a Guanábana	60
4.2.4	Caracterización molecular de las colecciones	62
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		65
BIBLIOGRAFÍA		68
ANEXOS		

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro1.	Secuencias de <i>primers</i> utilizados en pruebas de transferibilidad.	32
Cuadro2.	Lista de Series de 90 <i>primers</i> RAPDs utilizados en el pre-screening.	34
Cuadro 3.	<i>Primers</i> RAPDs seleccionados y utilizados en la caracterización.	35
Cuadro 4.	Serie, secuencia y temperatura de hibridación para los diez marcadores microsátélites analizados en accesiones de mango.	36
Cuadro 5.	Detalle del porcentaje de polimorfismos generados por los marcadores RAPDs utilizados en la caracterización.	45
Cuadro 6.	Detalle del porcentaje de polimorfismos generados por los marcadores SSR utilizados en la caracterización.	45
Cuadro 7.	Índice de diversidad genética (I.D.G) de <i>A. muricata</i> .	47
Cuadro 8.	Índice de diversidad genética de <i>M. indica</i> por zona.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Precipitación de ADN de guanábana en Isopropanol.	39
Figura 2.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de ADN genómico de <i>A. muricata</i> .	39
Figura 3.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de ADN genómico de <i>M. indica</i> .	39
Figura 4.	Gel de agarosa al 1.5 % con producto amplificado en la validación de ADN de guanábana.	40
Figura 5.	Gel de agarosa al 1.5 % con producto amplificado en la validación de ADN de mango.	41
Figura 6.	Resultados de transferibilidad de primers de <i>A. cherimola</i> a <i>A. muricata</i> .	42
Figura 7.	Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-39 (monomórfico).	43
Figura 8.	Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-48 (monomórfico).	43
Figura 9.	Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-69. Las flechas indican los polimorfismos generados; se observa a este marcador como el más polimórfico.	43
Figura 10.	Gel de poliacrilamida al 6 %, con primer SSR-87 (monomórfico).	43
Figura 11.	Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-106 (monomórfico).	43
Figura 12.	Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-144 (monomórfico).	44
Figura 13.	Dendrograma de las accesiones de guanábana por individuos mediante el coeficiente de similaridad NEI-UPGMA.	49
Figura 14.	Dendrograma de las accesiones de guanábana por población mediante el coeficiente de similaridad	

	NEI-UPGMA.	51
Figura 15.	Dendrograma de las accesiones de guanábana por provincias mediante el coeficiente de similaridad de NEI-UPGMA.	52
Figura 16.	Resultado del análisis de co-ancestrías con Enfoque Bayesiano para las accesiones de guanábana.	53
Figura 17.	Dendrograma de las accesiones de mango, agrupados por tipo, utilizándose el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de similaridad de JACCARD	54
Figura 18.	Dendrograma de las accesiones de mango, agrupados por zona, utilizándose el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de similaridad de JACCARD	55
Figura 19.	Dendrograma de las accesiones de mango, agrupados por individuos, utilizándose el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de similaridad de JACCARD	57
Figura 20.	Resultado del análisis de co-ancestrías con Enfoque Bayesiano para las accesiones de mango.	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Cuadro 1A. Listado de reactivos, materiales y equipos.

Cuadro 2A. Listado de las accesiones de guanábana, códigos y procedencia geográfica.

Cuadro 3A. Listado de las accesiones de mango, códigos y procedencia geográfica.

Cuadro 4A. Cuantificación de ADN de guanábana y dilución

Cuadro 5A. Cuantificación de ADN de mango y dilución

Protocolo 1A. Electroforesis vertical en gel denaturante de acrilamida

Figuras 1A-6A. Geles de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata*.

Figuras 7A-15A. Geles de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Los frutales forman parte de la diversidad de plantas comestibles, muchas de ellas todavía silvestres y localizadas principalmente en las regiones tropicales. La investigación y el desarrollo de la agricultura en el mundo se han limitado a unas 150 especies, dejando a un lado otras con potencial económico (IPGRI. 2000).

Uno de éstos grupos es la familia *Annonaceae*, autóctona del continente americano y con gran capacidad de crecer en diferentes condiciones tropicales y subtropicales (BENAVIDES A. 2001); representada en su gran mayoría por el género *Annona*, el cual es comestible y conformado por las especies *A. reticulata* (anona corazón), *A. squamosa* (anona), *A. purpurea* (sincoya), *A. muricata* (guanábana), entre otras.

Annona muricata L. comúnmente conocida como guanábana es originaria de la región tropical de Sudamérica. Actualmente se cultiva desde el sur de la Florida hasta el sur de Brasil (FAO, 2006).

CHICAIZA G. *et al*, (2003) expresan que es una fruta conocida en el mercado ecuatoriano, pero no se registra información detallada sobre la misma de acuerdo al III Censo Nacional Agropecuario, ya que se presenta una reducida información estadística censal, puesto que la producción de guanábana es esporádica, y adicionalmente porque es un producto nuevo que forma parte del grupo de los productos no tradicionales.

MOREIRA R. (2011, com. pers) acota que el Ecuador en los últimos años ha incrementado la superficie de este cultivo debido a la demanda de mercados internacionales, principalmente el colombiano, el mercado local y el de Estados Unidos; el primero absorbía sobre el 90 % de la producción de este frutal, pero en

los últimos años las exportaciones han tenido un repunte hacia el mercado norteamericano. Actualmente, el mercado local constituye un eslabón importante en el consumo de guanábana, debido al cambio de cultura en el consumo de frutas.

En el país el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) con su Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) a través del Programa de Fruticultura posee una colección con 54 accesiones de guanábana, provenientes de diferentes provincias de la costa como Esmeraldas, Manabí, Guayas, Los Ríos y El Oro y de la sierra ecuatoriana como Santo Domingo, Azuay y Loja e incluso algunas introducidas de Brasil, encontrándose al momento esta colección en la etapa de caracterización agromorfológica.

Así mismo, tenemos al mango (*Mangifera indica* L.), el cual es indudablemente la especie de mayor importancia de las familias de las Anacardiáceas, tanto por su distribución mundial como por su importancia económica (GALÁN V. 2009).

De acuerdo con las estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), desde los años sesenta cuentan niveles de producción significativos en países como Brasil, Venezuela, Perú, Ecuador, Paraguay y Colombia.

ARIAS M. *et al.*, (2004) señalan que en el Ecuador existen alrededor de 9 500 ha. de mango distribuidas en 180 productores, de las cuales 6 000 a 7 000 están en producción, concentradas en un 95 % en la provincia del Guayas y el 5 % en Los Ríos, El Oro y Manabí.

FUNDACIÓN MANGO ECUADOR (2010, en línea) indica que nuestro país es un importante proveedor de mango entre los meses de Octubre y Febrero con las siguientes variedades exportables: Tommy Atkins 65 %, Haden, Kent y Keitt 35 %. Los principales exportadores en el 2008, según su participación en las ventas mundiales, fueron: India 18.9 %, Perú 11.3 % y Brasil 10.5 %.

El nivel de importancia económica que tiene este cultivo en el país conlleva a garantizar su conservación, por lo cual, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias con su Estación Experimental Portoviejo, mantiene un Banco de Germoplasma con trece variedades tradicionales, de las cuales cinco son de Ecuador, tres de Israel y tres de Estados Unidos (KNUDSEN, 2000); todas ellas conservadas en campo, lo que representa la variabilidad genética existente en el país.

Entre la conservación de recursos genéticos la técnica de caracterización molecular es una valiosa herramienta para la selección de especies que presenten características genotípicas de interés, por su independencia del medio ambiente y el alto nivel de polimorfismo que se puede encontrar distribuido por todo el genoma (RALLO *et al.*, 2005, citado por FENDRI M. 2008).

En la actualidad la detección de polimorfismos genéticos se ha llevado a cabo mediante diversos métodos, entre ellos la utilización de marcadores moleculares, que brindan una excelente vía para obtener una gran cantidad de datos sobre los procesos de conservación que pueden dar origen a patrones de variación, proporcionando información que resulta de gran utilidad para un eficiente manejo y explotación de la variabilidad presente en las colecciones o bancos de germoplasmas.

Teniendo en cuenta el alto grado de polimorfismo que presentan estos tipos de marcadores, se podrá obtener una adecuada información sobre la variabilidad genética de las accesiones de las dos especies a analizar, lo que conlleva a la selección de genotipos deseados, para posterior uso en programas de fitomejoramiento.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Para identificar diferencias genéticas entre cultivares mediante criterios agronómicos, se requiere un número elevado de repeticiones en espacio y en tiempo, ya que se trata de caracteres muy influenciados por las condiciones

ambientales. Los marcadores morfológicos y/o agronómicos siguen siendo utilizados ampliamente ya que no requieren medios o tecnologías complicadas y también son los únicos marcadores basados en la observación directa de la planta.

No obstante, el empleo de descriptores fenotípicos, presenta dificultad en la evaluación de muchos de los caracteres como por ejemplo los relativos a las inflorescencias.

En consecuencia, se demanda de personal con experiencia que sea capaz, sobre todo, de diferenciar entre variabilidad debida a la genética y aquella debida a la fluctuación ambiental. Dicha experiencia requiere tiempo, y la identificación con este tipo de marcadores ha llevado en algunos casos a caracterizaciones erróneas.

Asumiendo la importancia agronómica de las dos especies a evaluar y teniendo en cuenta la variación que presenta la caracterización fenotípica, la presente investigación busca caracterizar a nivel molecular las colecciones del Banco de Germoplasma de guanábana y mango *ex-situ* de las Estaciones Experimentales del INIAP del Litoral Sur y Portoviejo, mediante el uso de marcadores moleculares RAPD'S y Microsatélites (SSR's) respectivamente.

La caracterización a través de marcadores moleculares, es una valiosa herramienta que tiene varias ventajas, como su independencia del medio ambiente y el alto nivel de polimorfismo que se puede encontrar distribuido por el genoma. El procedimiento es además fiable, rápido y económicamente rentable.

Considerando la relevancia de estos marcadores, se puede determinar que son los idóneos para obtener información de polimorfismos, discriminar entre genotipos e identificar materiales originales y representativos de la variabilidad genética de una colección, con perspectivas de su uso en programas de mejoramiento genético, manejo de germoplasma y potencializar al máximo la conservación de la diversidad genética. Los marcadores moleculares seleccionados para este estudio

con criterios que aseguren discriminación e indiferencia a factores medio ambientales al tener una naturaleza co-dominante, permitirá eficientemente establecer el nivel de heterocigosidad en las colecciones evaluadas, establecer duplicados y asociar eventualmente la variabilidad genética con caracteres fenotípicos de interés para los mejoradores.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad genética de accesiones de guanábana (*Annona muricata* L.) y mango (*Mangifera indica* L.) del Banco de Germoplasma del INIAP a través de marcadores moleculares.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de diversidad genética de 54 accesiones de guanábana y 60 de mango del Banco de Germoplasma del INIAP por medio de marcadores moleculares RAPD'S y Microsatélites (SSRs).
- Identificar la presencia de duplicados en las colecciones de guanábana y mango en estudio.
- Determinar la distancia genética entre las accesiones a ser analizadas.

1.4 HIPÓTESIS

- El uso de marcadores moleculares revela que existe diversidad genética dentro de las colecciones analizadas.
- Los marcadores moleculares RAPDs y SSRs permiten separar individuos en grupos acordes a características similares.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)

2.1.1 ORIGEN y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La familia de Anonáceas es autóctona del continente americano y con gran capacidad de crecer en diferentes condiciones tropicales y subtropicales; una de las más primitivas por la disposición en espiral de los estambres y carpelos y por las semillas con endospermo ruminado (LEÓN J. 1987 citado por TACAN M. 2007).

Según MAHDEN (2001) citado por TACAN M. (2007), esta familia está compuesta por 28 géneros y se estima que hay 2 200 especies en el mundo. Entre ellas hay numerosos frutales, especialmente en los géneros *Annona spp.* y *Rollinia spp.*; de estas, la mayoría son originarias del Nuevo Mundo.

Según LEÓN J. (1987) citado por TACAN M. (2007) el centro de origen de la guanábana se ubica en América del Sur; siendo Colombia y Brasil los países de los cuales procede esta especie (LEÓN J. 1968 citado por el CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL CIAT. 2002); cabe suponer entonces que a partir de estas tierras latinas se difundió hacia China, España, Italia y otros países.

Por otro lado CAN PECH (1981) citado por BENAVIDES A. (2002) señala que la guanábana es originaria de América tropical, y se encuentra dispersa en Mesoamérica, Antillas y Brasil. Mientras que en los Estados Unidos únicamente crece en el sur de la Florida; además señala que cuando los españoles llegaron al nuevo mundo esta fruta ya se encontraba creciendo en la zona.

CRONQUIST A. (1981) clasifica taxonómicamente a la guanábana en el siguiente orden:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Annonaceae

Género: *Annona*

Especie: *muricata* L.

2.1.2 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA GUANÁBANA

RAINER *et al.* (1997) citado por CIAT (2002) señalan que los árboles de esta especie, como los de otras especies de anonáceas, tienen un rápido crecimiento alcanzando alturas de cuatro a cinco metros en tres años, generan un área foliar importante, y desarrollan una zona radicular extensa con alta capacidad de intercambio hídrico.

FUNDACIÓN DE DESARROLLO AGROPECUARIO. (1992) refiere que las flores son axilares, solitarias o en fascículos de prefloración valar. La mayoría de los carpelos contienen una semilla, si el óvulo no es fertilizado el carpelo correspondiente tiende a no desarrollarse, con lo que el fruto se deforma. Todos los carpelos fecundados contienen una semilla, generalmente de color negro, que al secarse pasa a marrón. La superficie de cada carpelo muestra una placa o areola al exterior, diferente de un cultivar a otro; sirve esta característica para la identificación y descripción del fruto. El color del fruto varía entre verde claro y oscuro, teniendo un viraje de color a un tono amarillento, que sirve como índice de madurez. El fruto maduro tiene un pH de pulpa alrededor de 4, dependiendo

esto de la variedad. La pulpa es carnososa, blanca, muy aromática, azucarada y de sabor subácido.

Estas características hacen que el árbol de guanábano sea interesante para crear cultivos económicamente viables y que no afecten las condiciones naturales del suelo y aguas. Además contribuyen a mantener un hábitat adecuado para el establecimiento de organismos como aves e insectos (RAINER *et al.*, 1997 citado por CIAT. 2002).

2.1.3 IMPORTANCIA DEL CULTIVO

SANCHEZ (1997); MURILLO y RESTREPO (2000) citados por MURILLO J. (2001) afirman que la familia de las *Annonaceas* es importante desde el punto de vista alimenticio, pues *Annona cherimola* (chirimoya), *Annona muricata* (guanábana), *Raimondia cherimolioides*, *Raimondia quinduensis* y *Rollinia mucosa*, se cultivan por sus frutos deliciosos. En la región amazónica las anonáceas se conocen como cargueros, debido a que la corteza externa se emplea como amarre. Algunas especies como *Bocageopsis spp.*, *Fusaea longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *Guatteria stipitata* y *Oxandra polyantha* son de importancia maderera, otras se utilizan como medicinales y en ocasiones también se emplean por las comunidades indígenas en ritos ceremoniales.

La ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. FAO. (2006, en línea), informa que el fruto de este cultivo ha adquirido importancia en el mercado agroindustrial, despertando el interés para desarrollar el cultivo comercialmente. El guanábano produce un fruto con características de utilidad alimenticia e industrial, por lo cual, es consumido en forma de jugos, postres, yogures y helados; como también en usos medicinales. Sus propiedades organolépticas hacen que su jugo sea muy apetecido, además de ser fuente de fibra, calcio, fósforo y vitamina C.

Igualmente McLAUGHLIN. *et al.* (1997) citado por CIAT (2002) revelan la importancia alimenticia e industrial de sus frutos, afirmando que tienen también interés, debido a que contiene sustancias con diferente actividad biológica: las acetogeninas (ACG).

GUZMAN S. *et al.* (2009) mencionan que estos metabolitos tienen la capacidad de inducir apoptosis (muerte celular programada que permite la homeostasis, eliminando las células redundantes o potencialmente peligrosas. Este proceso se caracteriza por la pérdida de asimetría de la membrana citoplasmática; la fragmentación del ADN en porciones más o menos constantes y con condensación nuclear). Así mismo indican que la actividad de las ACG relacionada con la reducción de los niveles de ATP y la inducción de la apoptosis serían difíciles de superar por las células malignas, aunado a que hasta el momento no se han descrito mecanismos de resistencia a ellas, las convierte en compuestos interesantes para el desarrollo de medicamentos oncológicos, incluyendo aquellos casos en que se presente resistencia a los fármacos, o bien podrían utilizarse como sensibilizadores durante la administración de otros quimioterapéuticos.

2.1.4 PRODUCCIÓN EN EL ECUADOR

CHICAÍZA *et al.* (2003) manifiestan que en el año 1996 la superficie sembrada fue de 148 hectáreas, obteniendo una producción de 842 toneladas métricas con un rendimiento de 5.69 TM/Ha; al año siguiente la producción aumentó a 593 con un rendimiento de 7.41 TM/Ha. De la misma forma en 1998 se incrementó a 817 toneladas métricas, pero su rendimiento disminuyó a 687 toneladas métricas, con un rendimiento de 7.99 TM/Ha. En el año 2000 la producción decreció a 490 toneladas métricas con un rendimiento de 7.40 TM/Ha.

Según en III CENSO NACIONAL AGROPECUARIO citado por CHICAÍZA *et al.* (2003), hasta el año 2000 existieron 860 hectáreas sembradas con esta *Annona*, encontrándose la mayor producción en la provincia de Esmeraldas. De acuerdo al

Censo en ese año, nuestro país produjo 490.04 TM de guanábana de las cuales se exportaron 263.43 TM, originando un ingreso de US\$ 213 600 y se determinó que 226.64 TM que representa aproximadamente un 46.24 % se asignó para el consumo interno.

2.2 MANGO (*Mangifera indica* L.)

2.2.1 ORIGEN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según KOSTERMAN Y BOMPARD (1993), citado por GALÁN V. (2009), en concordancia con lo descrito por AVILAN L. y RENGIFO G. (1990) afirman que posiblemente este árbol frutal es originario del noreste de la India, Sri Lanka y Birmania. A este respecto señalan, que de acuerdo con la distribución fitogeográfica de las especies de *Mangifera*, la mayor concentración de ellas se encuentra en la Península Malaya. Le siguen, en cuanto al número de especies, las áreas del Archipiélago Sunda y la Península Indochina; en esta última, destacan las regiones de Birmania y Tailandia.

MORA J. *et al.* (2002) estiman que la mayoría de los cultivares comerciales distribuidos a nivel mundial, provienen de materiales importados de la India donde hoy día se tienen reportados 998 cultivares avanzados procedentes de la India y Sri Lanka y 102 cruces en estudio.

BAILEY L. (*s.f*) citado por PARROTTA J. (1993) concluye que el mango se introdujo en México y Brasil antes del fin del siglo diecisiete, y de Brasil a las Indias Occidentales durante el siglo dieciocho; desde entonces, el mango ha sido cultivado y naturalizado tan extensamente que su distribución se puede considerar como pantropical. Ha sido cultivado con éxito en varias regiones subtropicales, incluyendo las costas del Golfo Pérsico y el Mediterráneo, las Islas Canarias, Sudáfrica, el sur de Brasil, el sur de California y la Florida.

GALÁN V. (2009) acota que el género *Mangifera* comprende 69 especies, las cuales se encuentran distribuidas en una amplia zona geográfica con distintas condiciones ambientales y exhiben una considerable diversidad genética, particularmente en caracteres del fruto.

CRONQUIST. A. (1981) clasifica mango de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Mangifera*

Especie: *indica* L.

2.2.2 ASPECTOS BOTÁNICOS DEL MANGO

Según OCHSE J. *et al.* (1965) y SCHNEE L. (1960), citado por AVILAN L. y RENGIFO C. (1990), el mango es un árbol de tamaño mediano de 10 a 30 m de altura, tronco más o menos recto, cuya corteza es de color gris-café, con grietas longitudinales o surcos reticulados poco profundos que a veces contienen gotitas de resina.

Técnicamente el mango es un monopodio, manteniéndose su tronco bien individualizado a lo largo de la vida del árbol por medio de un crecimiento regular apical siguiendo un eje (GALÁN V. 2009).

Su copa es compacta y su sistema radical es denso y vigoroso. En condiciones naturales posee una raíz principal pivotante y un sistema de raíces alimenticias superficiales, cuya concentración es máxima en los primeros 250 cm de suelo (MOSTERT y ABERCROMBIE. 1998, citado por GALAN V. 2009).

PARROTTA J. (1993, en línea) describe que las flores son fragantes y con un cabillo corto, tienen vellos finos en su superficie y son en parte masculinas y en parte bisexuales (polígamas) y forman racimos terminales de buen tamaño (panículas) de 15 a 20 cm de largo con ramificaciones vellosas y rojizas conteniendo hasta 6 000 flores.

2.2.3 ASPECTOS GENÉTICOS

BAILEY L. (1941) citado por PARROTTA J. (1993, en línea) señala que la mayoría de los cientos de variedades cultivadas del mango caen dentro de dos razas: una raza monoembriónica que incluye varios tipos o grupos bien definidos de la India, y una raza poliembriónica procedente de las Filipinas e Indochina.

Los estudios realizados tanto en mango como en otras especies del género *Mangifera* señalan idéntico número de cromosomas $2n = 40$ para el mango (MUKHERJEE. 1950; MAJUNDER y SHARMA. 1985, citado por GALÁN V. 2009).

Se han reportado al menos dos casos de tetraploidía en mangos. El primero fue citado por Roy y Viswewariya en 1951 señalando que la variedad Vella i Collumban en la India tenía $2n=80$. El segundo caso en Islas Canarias en plantas procedentes del patrón poliembriónico Gomera-1 (GALÁN V. *et al.*, 2001).

2.2.4 IMPORTANCIA DEL CULTIVO

FUNDACIÓN MANGO ECUADOR (2011, en línea) afirma que la importancia económica real del mango estriba en el tremendo consumo local que se realiza en las tierras bajas de los trópicos, ya que se trata de una de las plantas más fructíferas de los países tropicales, cultivándose en todos los países de Latinoamérica, siendo México el principal país exportador del mundo

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL CCI (1998) en relación por lo descrito por la FAO (2007) señalan que en la actualidad el mango es el tercer producto tropical más popular, antecedido de la piña y el aguacate (excluyendo el banano); y que el volumen total de las exportaciones de mango de los principales proveedores mundiales de América Latina, el Caribe, Asia, África y Europa se incrementó en un 76 % entre 1991 y 1996.

De la misma manera GALAN V. (2004), refiriéndose a lo reportado por la FAO (2006) acota que mientras el número de países productores de mango se mantiene prácticamente similar en el año 2000, en torno a 87 países, la producción mundial se ha incrementado notablemente, con cifras que progresan constantemente 15 700 t en 1990 (GALÁN V. 1993); 19 002 t en 1995 (GALÁN V. 1998); 25 040 t en 2000 (GALÁN V. 2004a), alcanzando las 30 880 t en 2006. El aumento de los últimos años ha sido en torno al 10 %, siendo México, Brasil, Indonesia y Pakistán los países que más han aumentado su producción. Asimismo, las importaciones de mango de Europa se incrementaron en un 67% y las de Estados Unidos en un 88 % durante el mismo periodo, al alcanzar las 65.908 y 173.817 toneladas, respectivamente.

2.2.5 PRODUCCIÓN EN EL ECUADOR

En lo referido por la CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL CCI (1998), los principales productores de mango a nivel mundial son los países asiáticos y México, pero cabe advertir que, en el periodo comprendido entre 1992 y 1997, la producción de mango de Filipinas, Perú, Ecuador, Israel, China, Mali, Costa Rica e Indonesia se incrementó en más de un 100 %, siendo Mali y Ecuador los más dinámicos.

FUNDACIÓN MANGO ECUADOR (2011, en línea) informa que el Ecuador cuenta con aproximadamente 6 500 has destinadas al cultivo de mango de

exportación, concentradas principalmente en la Provincias de Guayas con un 90 %, y el 10 % lo constituyen las provincias de Los Ríos, Manabí y el Oro.

FUNDACIÓN MANGO ECUADOR (2011, en línea) también refiere que las variedades de exportación que se cultiva son: Tommy Atkins (56.5 %), Haden (21 %), Kent (14.1 %), Edward (2.2 %), Keitt (1.9 %) y Ataulfo (0.5 %).

Según informes de la FAO (2007, en línea), en la Campaña 2002 - 2003, Ecuador produjo 35 175 t. y exportó 6.7 millones de cajas, que significaron 27 058 t. siendo las variedades de mayor demanda Tommy Atkins (70.35 %), Haden (21.47 %) y Kent (21.47 %); componiendo el principal mercado de destino Estados Unidos (79 %), y otros como la Unión Europea (15.7 %) y Canadá (6 %). El país ostenta la más alta tasa de crecimiento anual de los países exportadores en el periodo 1980 - 2000, con el 61.60 %.

2.3 RECURSOS GENÉTICOS

2.3.1 CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS

Según TACAN M. (2007), la conservación es el proceso que mantiene activamente la diversidad de las diferentes categorías de germoplasma y su posibilidad para el intercambio de genes (Pool genético), en vista de su uso actual o potencial. En este contexto, se definen dos estrategias, cada una compuesta de varias técnicas que los conservacionistas pueden adoptar para la preservación de la diversidad genética una vez que esta ha sido localizada. Las estrategias son: conservación *ex situ* e *in situ*, según el *Artículo 2* de la Convención sobre Diversidad Biológica (CDB 2000).

- **Conservación *in situ***

De acuerdo a la CDB (2000), la conservación *in situ* es la conservación de ecosistemas y sus hábitats naturales, así como el mantenimiento y recuperación

de poblaciones de especies en sus medios naturales. En el caso de especies cultivadas o domesticadas, la conservación *in situ* se realiza en los hábitats donde esas especies cultivadas han desarrollado sus propiedades distintivas.

De acuerdo a HUAMÁN y SCHMIEDICHE (1991), existen diferentes técnicas *in situ* que involucran el mantenimiento de la variación genética en el lugar donde ésta se encuentra, ya sea en la naturaleza o en un sistema tradicional de cultivo. Algunos autores no distinguen la conservación genética de una reserva genética de la conservación en campo (en finca o chacra) refiriéndose a ambas como *in situ*, cuando ambas tienen diferentes objetivos.

- **Conservación *ex situ***

CONSEJO NACIONAL DEL AMBIENTE. (2006) define la conservación *ex situ*, como el mantenimiento de los componentes de la diversidad biológica fuera de sus hábitats naturales: constituye un proceso que implica tanto el almacenamiento de los recursos genéticos en bancos de germoplasma, como el establecimiento de colecciones de campo y manejo de especies en cautiverio.

En referencia a lo descrito anteriormente, HIDALGO. (1991) citado por TACAN M. (2007) indica que este tipo de conservación abarca un amplio espectro taxonómico, sirve para proteger desde especies silvestres, y formas regresivas hasta especies cultivadas. Aplicada a especies domesticadas, la conservación *ex situ* busca conservar fuera de su centro de origen o diversidad tanto las especies como la variabilidad producida durante el proceso evolutivo de domesticación; este tipo de conservación se ha utilizado ampliamente durante las últimas décadas.

Sin embargo ZAMUDIO T. (2005) refiere que los distintos métodos de conservación presentan problemas diferentes en cuanto a manejo de la colección y a costos. Sin duda el método operativamente más fácil y más barato es el de los bancos de semillas o bancos de germoplasma, donde las semillas pueden

conservarse en condiciones adecuadas durante décadas o incluso siglos sin que pierdan de forma significativa capacidad germinativa.

2.3.2 BANCOS DE GERMOPLASMA

DEMEY J. (2008) define a un banco de germoplasma como una unidad dinámica, donde se concentra por tiempo indefinido la mayor diversidad genética posible, expresada por un alto número de biotipos representativos de la especie y de especies afines; entendiéndose así que los bancos de plasma germinal no son simples almacenes de variación genética de uso potencial, donde se guarda la semilla en condiciones controladas para conservar su longevidad; a la vez, los bancos de germoplasma prestan servicio a los programas de mejoramiento y a los investigadores, aportando materiales y datos útiles para la producción de cultivos superiores, resistentes a plagas y enfermedades y/o a otra clase de problemas.

Esto concuerda con lo descrito por PAREDES W. (2002) el cual indica que la función principal de los bancos de germoplasma consiste en tener disponible para los fitomejoradores, en cualquier momento, muestras de la diversidad que involucren un factor genético en particular, o grupos de factores que se deseen estudiar con un propósito definido.

Del mismo modo CORDEIRO G. *et al.* (2003) citado por DEMEY J. (2008) indica que la importancia del mantenimiento de estos recursos está en la medición y caracterización de dicha diversidad, y la efectividad en la exploración de ésta varía con el tipo de carácter evaluado, así como por rasgos de naturaleza biométrica, los cuales están codificados por un gran número de genes distribuidos en el genoma, permitiendo explorar mejor la variabilidad que en aquellos de herencia mendeliana.

Así mismo GRAUR y WEN-HSIUNG (2000) confirman que además de las funciones de conservación y mantenimiento, los bancos de germoplasma tienen un papel importante en la gerencia de los recursos fitogenéticos ya que su

propósito no solo se limita a la conservación de especies sino que además incluye funciones como la documentación, caracterización, evaluación de la variabilidad genética, estudios filogenéticos y lo más importante como es el mejoramiento de caracteres deseables y la multiplicación y distribución del germoplasma.

2.4 CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA

FAO (2009) expone que la caracterización de las accesiones de las colecciones de los bancos de germoplasma son actividades cotidianas, las mismas que permiten determinar la expresión de los caracteres de muy alta heredabilidad que van desde características morfológicas hasta proteínas de las semillas, incluyendo marcadores moleculares.

Igualmente PAREDES W. (2002) acota que es indispensable que periódicamente se actualice la información acerca de las características específicas de los materiales que se van concentrando en los bancos de germoplasma.

RALLO *et al.* (2005) citado por FENDRI (2008) declara que hoy en día, los marcadores agronómicos, morfológicos y moleculares se utilizan conjuntamente para conseguir una evaluación completa de los recursos genéticos.

Por otro lado FERREIRA M. y GRATTAPAGLIA D. (1998) exponen que dentro de lo que es fitomejoramiento, la caracterización molecular de la diversidad genética proporciona datos útiles para seleccionar progenitores de las poblaciones básicas, estas poblaciones se establecen gracias al cruzamiento de materiales superiores, con el fin de maximizar la distancia génica y de recombinar genes de nuevas maneras para que presenten características interesantes.

2.4.1 MARCADORES

2.4.1.1 Marcadores morfológicos

CUBERO J. (2003) describe que los marcadores morfológicos son inmediatos, ya que son visibles, o al menos, fácilmente detectables y aunque normalmente hay que esperar al desarrollo completo de la planta para su manifestación, pocos de ellos son neutros en relación con dicho desarrollo, y en general, con cualquier tipo de actividad vital, como cabe esperar de genes que suelen intervenir en complejas cadenas metabólicas.

POWELL (1992) señala que estos marcadores tienen muchas limitantes, pues su expresión está sujeta a variaciones del medio ambiente, e incluso algunas de las características tienen efectos indeseables.

En concordancia con lo anterior, FERREIRA M. y GRATTAPLAGIA D. (1998) afirman que estos marcadores casi nunca muestran codominancia y con cierta frecuencia son pleiotrópicos, esto afecta a más de una función al mismo tiempo.

2.4.1.2 Marcadores moleculares

JASIENIUK M. y MAXWELL B. (2001) señalan que los avances tecnológicos en la biología molecular han contribuido en gran medida a nuestra comprensión de la diversidad genética de las plantas.

TORRES M. y MORENO S. (2005) refieren que desde la década de los 80, se han desarrollado numerosas técnicas que permiten detectar variaciones en la secuencia de ADN al comparar distintos individuos, colectivamente se han denominado marcadores moleculares basados en ADN, presentando ventajas frente a los marcadores morfológicos.

HAMRICK J. *et al.* (1992) citado por FENDRI M. (2008) manifiestan que el desarrollo y utilización de estos marcadores en las últimas décadas ha contribuido a perfeccionar los estudios de los recursos genéticos reduciendo las incertidumbres debidas a la fluctuación en los caracteres morfológicos y agronómicos, e incluso KARP A. y EDWARDS K. (1997), concluyen que los marcadores de ADN han demostrado su gran aptitud en el estudio de la diversidad genética a niveles intraespecífico e interespecífico.

JASIENIUK M. y MAXWELL B. (2001) exponen que los primeros estudios de variación alozímico empleando electroforesis de proteínas reveló que las poblaciones de plantas tienen altos niveles de diversidad genética, la mayor parte de la variación en loci polimórficos se encuentra dentro de las poblaciones, y el sistema de distribución geográfica y la manera de explicar la mayor proporción de la variación en la diversidad genética. Con el descubrimiento de endonucleasas de restricción, los primeros marcadores basados en el ADN permiten la detección de la variación en las secuencias de ADN en los estudios de población de plantas.

RALLO *et al.* (2005) citado por FENDRI M. (2008) expresan que estos marcadores tienen la capacidad de identificar con certeza una variedad sin recurrir al estudio de muchos caracteres, y requieren solamente una pequeña cantidad de material vegetal de partida independientemente de la edad, del estado de la planta o del medio ambiente.

TORRES M. y MORENO S. (2005) indican que en la actualidad existen numerosos marcadores basados en ADN; pero solo algunos han sido aplicados eficazmente a la conservación y gestión de los recursos fitogenéticos, entre los más comunes están: la hibridación de ADN, fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), mapas génicos, polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPDs), huella digital del ADN (VNTRs o "fingerprinting"), microsatélites (SSRs), conformación polimórfica de cadena sencilla (SSCP), mapas de sitios de restricción polimórficos en productos de PCR (MRSPs), amplificación selectiva

de fragmentos de restricción (AFLPs), electroforesis de ADN en geles en gradientes desnaturalizantes (DGGE) y la secuencia de ADN; gran parte de ellos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en locis únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (SIMPSON, 1997).

- **RAPD'S**

WILLIAMS *et al.* (1990) citado por RENTERÍA M. (2007) indican que los RAPDs (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies. Se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases (pb) a lo largo del genoma y que el polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido y por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios.

WHITKUS *et al.* (1994) en concordancia con lo descrito por BACKELJAU *et al.* (1995), afirman que estos marcadores son dominantes, es decir, no pueden discernir los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular; por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg (AAGAARD *et al.*, 1998).

OTERO *et al.* (1997) y PARKER *et al.* (1998) señalan que los RAPDs son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada.

OTERO *et al.* (1997), mencionan que estos marcadores dado el gran polimorfismo que detectan, una de sus mejores aplicaciones es la identificación genética de individuos, que incluye casos de clones, híbridos somáticos y mutantes. Otra aplicación paralela es la detección de uniformidad genética con un marcador eficiente y rápido, lo cual puede ser útil en la determinación de estabilidad en programas de reforestación.

- **MICROSATÉLITES**

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (TT)_n, dinucleótidos (AT)_n, o tetranucleótidos (AAGG)_n. Estos locis se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90 % (ARMOUR *et al.*, 1994; COLTMAN *et al.*, 1996; GUPTA *et al.*, 1996).

Las repeticiones más comunes en plantas son de dos nucleótidos, especialmente las secuencias (AT/TA)_n; las regiones se caracterizan también por ser hipervariables, de manera que su análisis resulta muy adecuado para distinguir individuos muy emparentados, como por ejemplo los pertenecientes a una misma población (TORRES M. y MORENO S. 2005).

Los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica (EDUARS *et al.*, 1991; ARMOUR *et al.*, 1993; DERVEY *et al.*, 1996; QUELLER *et al.*, 1993; WEIGHT y BENTZEN, 1994 citados por RENTERÍA M. 2007), análisis de linajes (QUELLER *et al.*, 1993) y de sistemas reproductivos (AWADALLA y RITLAND, 1997 citados por RENTERÍA M. 2007).

Recientemente se han encontrado microsátélites en algunos organelos citoplasmáticos, como el cloroplasto (SSRc; POWELL *et al.*, 1995) y la mitocondria (SSRm; SORANZO *et al.*, 1998) lo que ha enriquecido la fuente de estudios evolutivos, ya que estos organelos son heredados uniparentalmente y no están sujetos a recombinación, por lo que los cambios acumulados que observamos en las poblaciones se deben sólo a los procesos de mutación y demográficos (ECHT *et al.*, 1998 citado por RENTERÍA M. 2007).

Esto permite contestar preguntas evolutivas muy puntuales relacionadas con el monitoreo del flujo genético, introgresión, análisis de paternidad, para hacer inferencias de parámetros demográficos y determinar patrones evolutivos de los procesos históricos del origen de especies, formas o razas (GOLSTEIN *et al.*, 1996 citado por AZOFEIFA A. 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL SITIO EXPERIMENTAL

La presente investigación fue realizada en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) “Dr. Enrique Ampuero Pareja”, ubicado entre las coordenadas geográficas 02° 15' 15" de latitud Sur y 79° 49' de longitud Occidental a 17 msnm., en el km. 26 al Este de Guayaquil en la vía Durán-Tambo, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi, provincia del Guayas. La investigación tuvo una duración de 16 meses.

3.2 FASES EXPERIMENTALES

3.2.1 FASE DE CAMPO

La colecta del material vegetal de las 54 accesiones de guanábana se realizó en el lote 1, 6 y vivero de la colección de árboles frutales nativos del Ecuador del Programa de Fruticultura de la EELS, mientras que las muestras foliares de las 60 accesiones de mango fueron tomadas de la colección de frutas tropicales, establecida en el lote Teodomira de la Estación Experimental Portoviejo (EEP) situada a 01° 12' de latitud Sur y 80° 23' de longitud Occidental ubicada en la parroquia Lodana, cantón Santa Ana, provincia de Manabí. Ambas colecciones conservan germoplasmas procedentes de varias provincias del país.

3.2.1.1 Características climáticas y edafológicas de los bancos de germoplasma

Las características climáticas y edafológicas del área donde se mantienen las colecciones del germoplasma de guanábana y mango son las siguientes:

- **Guanábana¹:**

Temperatura promedio	24,6 ° C
Humedad relativa promedio	83 %
Precipitación anual	1398 mm
Tipo de suelo	Vertic-Eutropepts
Textura	Franco a Franco-arenosa
pH	5,5 a 6,5
Altitud	17 msnm

- **Mango²:**

Clima	Tropical seco
Temperatura media anual	26 ° C
Humedad relativa promedio	77 %
Precipitación medio anual	686,5 mm
Topografía	Plana
Tipo de suelo	Aluvial
Textura	Franco-arcillosa
pH	7,3
Altitud	47 msnm

3.2.2 FASE DE LABORATORIO

El proceso de extracción de ADN de ambas especies se llevó a cabo en la EELS, mientras que la fase de caracterización molecular de ambas colecciones se llevó a

¹ Fuente: Anuario Meteorológico del Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología INAMHI-2006.

² Fuente: Departamento de Suelos de la EEP-INIAP.

cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP, ubicado entre las coordenadas geográficas 0° 22' 15" de latitud Sur y 78° 33' 14" de longitud Oeste en la parroquia Cutuglahua, cantón Mejía, provincia de Pichincha a 3050 msnm.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De los datos resultantes de los productos de amplificación mediante PCR tanto para los marcadores RAPDs (geles de agarosa) y SSRs (geles denaturantes de poliacrilamida) se generó una matriz binaria de datos (MBD), con el peso molecular de cada alelo, en donde la presencia de la banda es representada por la unidad (1) y cero (0) para la ausencia; con las cuales se realizó los siguientes análisis:

- Determinación de marcadores polimórficos
- Distancias genéticas
- Análisis de conglomerados
- Análisis de coancestrías

Con la información que se generó de la MBD se realizó el análisis de datos moleculares con el software FIGTREE v 1.3.1 (RAMBAUT A. 2007), en donde se calculó una matriz de similitud mediante el coeficiente de asociación de Nei (1978) para guanábana y Jaccard (SOKAL Y SNEATH, 1963 citados por PEÑA *et al.*, 2010) en mango. Los árboles fueron construidos utilizando el algoritmo UPGMA (Método de agrupamiento por media aritméticas no ponderables) (SOKAL y MICHENER, 1958 citado por PEÑA A. *et al.*, 2010); la validez de los nodos de los árboles obtenidos fue estimada realizando un análisis Bootstrap con 100 replicas para cada uno de estos algoritmos utilizando el programa FIGTREE v 1.3.1 (RAMBAUT A. 2007). Para representar gráficamente los datos resultantes se realizó un dendrograma utilizando el software TREEVIEW 1.6.6 (PAGE, 2001) y posteriormente se visualizó el árbol generado con el programa.

Se estimó la distribución a posteriori de coeficientes asociados a cada individuo que se corresponden a los distintos subgrupos en los que este puede clasificarse, mediante el método de conglomeración bayesiano, basado en Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC) (PRITCHARD *et al.*, 2000 citados por PEÑA *et al.*, 2010). Este análisis permitió realizar 300 000 permutaciones de la información, en donde el valor esperado de la distribución a posteriori provee una estimación de la proporción que el genoma de un individuo tiene o comparte con los distintos subgrupos. El algoritmo se encuentra implementado en el software STRUCTURE 2.2.3.

3.4 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

La lista de materiales reactivos y equipos de laboratorio utilizados en el desarrollo de este trabajo de investigación se detallan en el Cuadro 1.A.

3.5 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

3.5.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La toma de muestras de las accesiones de guanábana se realizó seleccionando de dos a tres hojas jóvenes, las cuales fueron las más adecuadas para poder realizar la maceración debido a la textura, asimismo en esta etapa la actividad de división celular es más activa, por lo tanto se obtuvo mayores concentraciones de ADN.

Las hojas se colocaron en bolsas plásticas debidamente identificadas con el número de accesión y repetición, se las almacenó en una caja térmica la cual contenía hielo seco para evitar la degradación, pero a la vez evitando el contacto con el mismo para prevenir que se quemaran; luego se las trasladó al laboratorio.

La colecta de las accesiones de mango se realizó de la siguiente manera: se tomó de dos a tres hojas jóvenes las cuales fueron colocadas en bolsas que contenían sílica gel para reducir el contenido de humedad (deshidratar) de las muestras, las cuales luego de este proceso fueron trituradas en un macerador eléctrico hasta obtener un polvo muy fino, se las almacenó en microtubos de 2 ml a temperatura ambiente hasta el momento de la extracción de ADN.

La lista de las accesiones según el Banco de germoplasma de ambas estaciones se detalla en los Cuadros 2.A y 3.A.

3.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se procedió a la extracción de ADN de las 54 accesiones de guanábana y 60 de mango; inicialmente se propuso realizar la extracción de ADN de guanábana mediante el protocolo descrito por VIRUEL M. y HORMAZA I. (2004) utilizado en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), debido a la relación taxonómica existente entre estas dos especies; pero no se obtuvo excelentes resultados en cuanto a calidad y concentración. Debido a esto, se probó el protocolo de extracción provisto por la Dra. LIZANDRA CATELLI en el año 2010 y desarrollado en la EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA-EMBRAPA (2010), mejorando notoriamente las condiciones del ADN.

El protocolo de extracción de ADN de EMBRAPA (2010), fue utilizado tanto para guanábana como para mango. El proceso se realizó de la siguiente manera:

1. Se preparó 150 ml de buffer de extracción según las concentraciones finales indicadas (CTAB 1 %, NaCl 1,4 M, Tris-HCl pH8 100 mM, EDTA 20 mM, mercaptoetanol 4 %, PVP 1 % y agua destilada). El mercaptoetanol fue añadido solamente en el momento que se utilizó el buffer.

2. Se pesó de 1 g de hojas frescas de guanábana y también la misma cantidad para las muestras de mango ya trituradas, colocándose en microtubos de 2 ml con la identificación adecuada.
3. Se agregó buffer en la proporción de cuatro veces más del volumen de la muestra.
4. Se incubó a una temperatura de 65 °C durante 60 min., realizando inversiones de los tubos cada 15 min., con la finalidad de que la incubación sea homogénea.
5. A continuación se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min.
6. Se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo de 2 ml, adicionando CIA (24:1) en igual volumen para eliminar proteínas y otros contaminantes del ADN, luego se mezcló realizando suaves inversiones durante 5 min. y luego centrifugar a 13 000 rpm por 15 min.
7. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se volvió a realizar el lavado con CIA (24:1) como lo indica el paso 6.
8. Para precipitar los ácidos nucleicos se tomó la fase acuosa superior adicionándose isopropanol conservado a -20 °C, el volumen añadido fue de 2/3 en relación a la muestra. Se realizó suaves inversiones a los tubos hasta que los ácidos nucleicos se tornaron visibles, los microtubos se almacenaron a -20 °C durante 2 h.
9. Luego de transcurrido el tiempo indicado se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min., se descartó el sobrenadante observándose el *pellet* en la base del tubo, se realizó el lavado del mismo agregando 500 µL de etanol al 70 %, se centrifugó y se eliminó el etanol.
10. Se procedió a secar los *pellets* en un termobloque (THERMO BATH Modelo ALB 64) a 37 °C durante 30 min.
11. Una vez que se comprobó que los *pellets* estuvieron secos (libres de etanol) se resuspendieron en 100 µL de buffer TE pH8 0.1 M, se incubaron en el termobloque a 65 °C durante 5 min. para ayudar a la resuspensión.

3.5.3 CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se realizó un test de integridad de cada una de las muestras para verificar la calidad del ADN extraído (método cualitativo); este se lo ejecutó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8 %. Se tomó 4 μL de ADN al cual se le adicionó 1 μL de blue juice para darle peso y color a la muestra, se pipeteó varias veces para homogenizar; en el gel ya preparado se cargó 2 μL de esta mezcla dejando libre el primer pozo del gel para cargar el marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Cat. N° 10068-013 INVITROGEN®). Se cargó con mucho cuidado evitando la contaminación entre pozos; para cada muestra se utilizó una punta diferente. Luego se dejó migrar por 30 min. a 100 V en buffer de corrida TAE 1X en cámara de electroforesis horizontal, marca LABNET INTERNATIONAL, INC Serial N° E006493. Posteriormente se tiñó el gel durante 30 min. en una solución de bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 15 ppm en 1 000 ml de agua destilada. Se visualizó el gel en un fotodocumentador UV DOLPHIN VIEW y se imprimieron las imágenes para el análisis visual.

En este paso se pudo observar las muestras aptas para su posterior uso en procesos de amplificación; las que no presentaban las condiciones adecuadas al ser comparadas con el marcador de peso molecular, se les realizó nuevas extracciones.

La cuantificación del ADN de ambas especies fue realizada mediante fluorómetro Qubit™, se utilizó el kit de cuantificación Quant-iT™ ds DNA BR Assay Kit *2-1000 ng (método cuantitativo).

Una vez obtenidos los datos del fluorómetro se prosiguió a ajustar las muestras a una concentración final de 5 ng/ μL en un volumen final de 100 μL con agua de tartrazina y se almacenaron a -20 °C. Los valores del rendimiento del ADN de guanábana y mango se detallan en los Cuadros 4.A y 5.A.

3.5.4 PRUEBA DE AMPLIFICACIÓN DE ADN

Se realizó pruebas de amplificación de ADN tanto para las muestras de guanábana como de mango; con el objetivo de asegurar que el ADN obtenido se encuentre en condiciones óptimas para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los marcadores específicos de la caracterización.

3.5.4.1 Amplificación ADN guanábana

Se realizó la amplificación de los 54 ADN's de guanábana utilizando un *primer* RAPD OPW-O1 (5'-CTCAGTGTCC-3'). Cada reacción de amplificación se efectuó en un volumen final de 7,23 μL el cual consistía de 1,8 μL de ADN (5ng/ μL); 2,2 μL buffer 5X (1X); 0,4 μL dNTP's 10 mM (0,6 mM); 0,4 μL primer 10 μM (0,6 μM); 0,13 μL Taq polimerasa 5U/ μL (0,09 U/ μL) y 2,3 μL agua ultra pura. Se dispensó el coctel de reacción en una placa PCR con el respectivo volumen de ADN por reacción, se centrifugó y se agregó 15 μL de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras. La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (Programable Thermal Controller) M.J Research programado para llevar a cabo el siguiente perfil de temperaturas: un ciclo de predenaturación inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, alineamiento a 36 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 7 min; el protocolo PCR-RAPDs usado en este trabajo es el descrito por MORILLO E. y MIÑO G. (2011).

Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5 %, cargándose 4 μL de muestra, se migraron por 30 min. a 100 V junto con el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat. N° 10488-058). Luego se tiñó en EtBr y se visualizó en el fotodocumentador.

3.5.4.2 Amplificación ADN mango

Para realizar la validación y adecuación de las condiciones de amplificación del ADN de mango se seleccionó un marcador SSR específico para esta especie MISHRS-1 de secuencia 5' 3' (F-TAACAGCTTTGCTTGCCTCC/R-TCCGCCGATAAACATCAGAC). El volumen final de cada reacción se realizó en 7,5 µL de coctel de amplificación que consistió en: 2 µL de ADN (5ng/µL), 1,5 µL buffer Gotaq 5X (1X), 0,6 µL MgCl₂ 25mM (2mM), 0,38 µL dNTPs 5mM (0,25 mM), 0,375 µL primer 10µM MISHRS-1 Forward (0,5 µM), 0,375 µL primer 10 µM MISHRS-1 Reverse (0,5 µM), 0,1 µL Gotaq 5U/µL (0,06 U/µL) y 2,17 µL agua ultra pura. Se dispensó la cantidad adecuada del ADN y coctel de amplificación en la placa PCR, se centrifugó y se agregó 15 µL de aceite mineral. Se programó el termociclador con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 29 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min., alineamiento a 50 °C por 45 s, elongación a 72 °C por 1 min.; y una extensión final a 72 °C por 7 min. MORILLO E. y MIÑO G. (2011).

Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5 %, cargándose 4µL de muestra, se migraron por 30 min. a 100 V junto con el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat. N° 10488-058). Luego se tiñó en EtBr y se visualizó en el fotodocumentador.

3.5.5 CARACTERIZACIÓN DE GENOTIPOS

3.5.5.1 Caracterización Guanábana

Inicialmente se propuso realizar la caracterización de los genotipos de guanábana mediante el uso de marcadores microsatélite (SSR); para lo cual se realizó la transferibilidad de cebadores específicos de *Annona cherimola* Mill (MORILLO E. y MIÑO G. 2010) reportados en trabajos de desarrollo de locus polimórficos

microsatélites entre especies de *Annonaceas* relacionadas como: *Atemoya* cv. Gefner; *Atemoya* cv. Pink's mammoth; *Annona squamosa*; *Annona glabra*; *Annona montana*; *Annona senegalensis*; *Rollinia emarginata*; *Rollinia salicifolia*; *Asimina triloba* (ESCRIBANO P. *et al.*, 2004-2007).

Bajo estas referencias se realizó la transmisibilidad de 17 marcadores microsatélite disponibles en el Laboratorio de Biotecnología de la EESC-INIAP (MORILLO y MIÑO 2010).

a.) Transferibilidad de SSRs de *A. cherimola* a *A. muricata*.

Una vez validado el ADN, se procedió a su amplificación a través de *primers* SSRs. Se utilizó un total de 17 marcadores con 4 ADN's de guanábana, 3 de chirimoya y un control negativo.

Cuadro1. Secuencias de *primers* utilizados en pruebas de transferibilidad.

Primer	Secuencia 5'-3'		Ta °C
	Forward	Reverse	
LMCH39	AATTTGTATGGTGTGACAG	AGTTGTAGGTGGTTAAGTTC	56
LMCH48	TTAGAGTGAAAAGCGGCAAG	TCAAGCTACAGAAAGTCTACCG	56
LMCH69	AGCTTTAGCCATGAATTAGA	GAAAGGCTGACGAGATATAA	56
LMCH106	AACAAATGACAGGAGAGC	ATAATGTATATGACGCTGCT	56
LMCH144	GTTTGGAAGAGTCGCAGGAT	ACTGTAAAACGCAGACCAAGAT	56
LMCH87	AGTTAAGACACGAGATGATAAA	CAAGTAAAGACTGAAAGGTTG	56
LMCH83	CTCTCGTTGACTCGTTTACT	GGTCTCTAGCCTTTACAATC	56
LMCH63	TTCCCCAAAATAATGAAATA	TTCCCCAAAATAATGAAATA	56
LMCH9	TTAAACACGTATAGAAAACC	TATGTGAAAGATCAAAAAGAC	56
LMCH102	GCTAACCATCCATTTACATA	ATAACATTCTTTATCACCATCT	56
LMCH91	CCTTGAGAAAGTGTCATCTAT	ATAATCCTAGACCATAAAAATTC	56
LMCH122	AGCAAAGATAAAGAGAAGATAA	ATCCAAGCCTATTAACAACCT	56
LMCH1	CTCTTCAAAGGTACGACTTC	TTGAGAAAAGGATAAGGATT	56
LMCH4	ATTAGAACAAGGACGAGAAT	CCTGTGTCTTTTCATGGAC	56
LMCH16	TGAAAAATAACAAGAATGTAA	GGATAAACAAAGCAGTAAATC	56

Fuente: Transferibilidad de *Primers* SSRs de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) a guanábana (*Annona muricata* L.) Morillo E. y Miño G. 2010. EESC-INIAP.

El mix utilizado tuvo un volumen final de 7,5 µl de mezcla constituida por 1,5µl de Buffer 5X (1X); 0,6µl de MgCl₂ 25mM; 0,38µl de dNTPS (2 µM); 0,375µl

primer Forward (1 μ M); primer 0,375 μ l primer Reverse (1 μ M); 0,1 μ l Taq Promega 5U/ μ l (0,6 U); 2,17 agua ultra pura y 1,5 μ l de ADN (5 ng/ μ l).

La amplificación fue realizada en un Termociclador BIOMETRA GRADIENT, empleando un ciclo de denaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min., 56 °C por 30 s., y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 7 min.

La separación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa 2 % corridos por 90 min. a 100 V, teñidos en EtBr y visualizados en el fotodocumentador UV Dolphin View.

b.) Amplificación de ADN de guanábana con *primers* SSRs seleccionados

Realizadas las pruebas de transferibilidad de *primers* microsatélite entre las especies mencionadas, se seleccionaron 6 de los 17 marcadores reportados por ESCRIBANO P. *et al.* (2004-2007).

Seguidamente se efectuó la amplificación del ADN de guanábana con los *primers* transferidos, para luego ser analizados en geles denaturantes de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Las amplificaciones fueron realizadas según el literal **a** del ítem 3.5.5.1. El protocolo de preparación y tinción de geles se detalla en el Protocolo 1.A.

c.) Pre-screening de marcadores RAPDs

Con la información obtenida de la amplificación realizada con los *primers* SSRs, en donde solo uno de seis demostró presencia de polimorfismos, se planteó realizar la caracterización utilizando marcadores RAPDs, realizando así un pre-screening con 90 marcadores (Operon Technologies Inc.), amplificando tres materiales de *A.muricata* y un control negativo, con el fin de evaluar su capacidad para generar patrones complejos de bandas de ADN extraído de los materiales.

Cuadro2. Lista de Series de 90 *Primers* RAPDs utilizados en el pre-screening.

OPA 01	OPC 04	OPG 17	OPS 03	OPW 16
OPA 02	OPC 05	OPG 18	OPS 05	OPW 17
OPA 03	OPC 11	OPG 19	OPS 08	OPW 18
OPA 04	OPC 13	OPG 20	OPS 09	OPW 19
OPA 05	OPC 14	OPM 02	OPS 17	OPW 20
OPA 06	OPC 15	OPM 04	OPW 01	OPAM 01
OPA 07	OPC 16	OPM 05	OPW 02	OPAM 08
OPA 08	OPC 18	OPM 06	OPW 03	OPAM 09
OPA 09	OPC 19	OPM 07	OPW 04	OPAM 12
OPA 10	OPC 20	OPM 08	OPW 05	OPAM 19
OPB 01	OPD 01	OPR 01	OPW 06	
OPB 02	OPD 02	OPR 04	OPW 07	
OPB 03	OPD 03	OPR 05	OPW 08	
OPB 04	OPD 04	OPR 11	OPW 09	
OPB 05	OPG 11	OPR 12	OPW 10	
OPB 06	OPG 12	OPR 13	OPW 11	
OPB 07	OPG 13	OPR 14	OPW 12	
OPB 08	OPG 14	OPR 16	OPW 13	
OPB 09	OPG 15	OPR 18	OPW 14	
OPB 10	OPG 16	OPR 19	OPW 15	

Fuente: Laboratorio de Biotecnología- Estación Experimental Santa Catalina

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 7,23 μL , el cual consistía de 1,8 μL de ADN (5ng/ μL); 2,2 μL buffer 5X (1X); 0,4 μL dNTP's 10 mM (0,6 mM); 0,4 μL *primer* 10 μM (0,6 μM); 0,13 μL Taq polimerasa 5U/ μL (0,09 U/ μL) y 2,3 μL agua ultra pura. Se dispensó en una placa PCR el ADN con el respectivo volumen de coctel por reacción, se centrifugó y se agregó 15 μL de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras. La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (Programable Thermal Controller) M.J Research programado para llevar a cabo el siguiente perfil de temperaturas: un ciclo de predenaturación inicial a 94 °C por 5 min., seguido de 39 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 s, alineamiento a 42 °C por 1 min., elongación a 72 °C por 2 min.,

extensión final a 72 °C por 7 min. y mantenimiento indefinido a 4 °C. (MORILLO E. y MIÑO G. 2011).

Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5 %, cargándose 4µL de muestra, se migraron por 90 min. a 100 V junto con el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat. N° 10488-058). Luego se tiñó en EtBr y se visualizó en el fotodocumentador para su posterior selección de acuerdo al polimorfismo presentado.

d.) Caracterización de genotipos de guanábana con marcadores RAPDs.

De los 90 marcadores RAPDs evaluados se pre-seleccionaron 10, y con base al polimorfismo generado se seleccionaron 6, con los que se realizó finalmente la caracterización. Todos los *primers* utilizados formaron bandas entre 200 y 2072 pb.

Cuadro 3. *Primers* RAPDs seleccionados y utilizados en la caracterización.

Serie y secuencia de los iniciadores	
Primer	Secuencia
OPB 08	5' GTCCACACGG 3'
OPB09	5' TGGGGGACTC 3'
OPC 04	5' CCGCATCTAC 3'
OPG 14	5' GGATGAGACC 3'
OPG 18	5' GGCTCATGTG 3'
OPM 04	5' GGCGGTTGCT 3'

El protocolo de amplificación utilizado en la caracterización fue equivalente al que se usó en el literal b de la sección 3.5.5.1.

3.5.5.2 Caracterización mango

En el presente trabajo se utilizó 10 marcadores SSRs de un total de 31, previamente referidos para *Mangifera indica* L. en estudios de desarrollo y

aislamiento de marcadores microsatélite, y caracterización de esta especie, descritos por SCHENELL R. *et al.*, (2005) y UKOSKIT K. (2007). Los marcadores seleccionados fueron los que presentaron mayor cantidad de polimorfismos en los estudios realizados.

Cuadro 4. Serie, secuencia y temperatura de hibridación para los 10 microsatélites utilizados.

Primer	Secuencia (5' - 3')		Ta ° C
	Forward	Reverse	
MITG 436-2	GGTCAGCTGTGTGTGTGTG	CAATTCAATGCTTTGGATGCT	52
MIAC 326	TGGTATTCAAGCATGGTCCTC	TGGCATCACACACACACAC	52
MiSHRS-1	TAACAGCTTTGCTTGCCTCC	TCCGCCGATAAACATCAGAC	50
MiSHRS-4	CCACGAATATCAACTGCTGCC	TCTGACACTGCTCTTCCACC	57
MiSHRS-18	AAACGAGGAAACAGAGCAC	CAAGTACCTGCTGCAACTAG	50
MiSHRS-32	TTGATGCAACTTTCTGCC	ATGTGATTGTTAGAATGAACTT	53
MiSHRS-36	GTTTTATTCTCAAAATGTGTG	CTTTCATGTTTCATAGATGCAA	50
MiSHRS-37	CTCGCATTTCTCGCAGTC	TCCCTCCATTTAACCCTCC	46
MiSHRS-39	GAACGAGAAATCGGGAAC	GCAGCCATTGAATACAGAG	53
MiSHRS-48	TTTACCAAGCTAGGGTCA	CACTCTTAAACTATTCAACCA	57

Fuente: Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. Schenell R. *et al.*, (2005) y Development of microsatellite markers in mango (*Mangifera indica* L.) using 5' anchored PCR. Ukoskit K. (2005).

a.) Amplificación de ADN de mango con *primers* SSRs

El protocolo PCR-SSR usado en este proceso fue el descrito por MORILLO E. y MIÑO G. (2011), el cual consistía en un volumen final para cada reacción de 7,5 μ L compuesto por 2 μ L de ADN (5ng/ μ L), 1,5 μ L buffer Gotaq 5X (1X), 0,6 μ L MgCl₂ 25mM (2mM), 0,38 μ L dNTPs 5mM (0,25 mM), 0,375 μ L primer 10 μ M SSR Forward (0,5 μ M), 0,375 μ L primer 10 μ M SSR Reverse (0,5 μ M), 0,1 μ L Gotaq 5U/ μ L (0,06 U/ μ L) y 2,17 μ L agua ultra pura. Se dispensó el ADN en la placa PCR, añadiendo el volumen respectivo de coctel por reacción, se dio un punto de vórtex, se centrifugó y se agregó 15 μ L de aceite mineral. Se programó el termociclador con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min.; seguido de 29 ciclos de denaturación

a 94 °C por 1 min.; alineamiento a 46-57 °C por 45 seg. (Varía según la Ta de cada *primer*), elongación a 72 °C por 1 min.; extensión final a 72 °C por 7 min y mantenimiento indefinido a 4 °C. Los productos de reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1X, durante 30 min. a 100 V junto con el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder para su visualización con luz UV, previa tinción con bromuro de etidio.

b.) Genotipaje en geles de acrilamida

El Genotipaje de la colección de *M. indica* L. se realizó mediante geles denaturantes de poliacrilamida debido a que permite detectar las pequeñas diferencias en pares de bases entre alelos.

El proceso de electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida (preparación de placas, carga de amplicones y tinción) se detalla en el Protocolo 1.A.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

En la presente investigación se probaron dos protocolos de extracción de ADN: el método CTAB 2X desarrollado por VIRUEL y HORMAZA (2002) y el protocolo basado en el método CTAB 5X presentado por EMBRAPA (2010) con modificaciones en el uso de antioxidantes; determinándose que el método de extracción CTAB 5X produjo los mejores rendimientos y calidad de ADN (Figura 1). Para la extracción se utilizó una muestra de 1 g de hoja fresca de guanábana y 1 g de hoja macerada de mango por accesión, las cuales produjeron promedios de 79.82 ng/μl de ADN para guanábana y 56,05 ng/μl para mango al ser cuantificados en geles de agarosa y por fluometría (Figura 2 y 3). Los valores de cuantificación se detallan en los Cuadros 4.A y 5.A.

Se obtuvo ADN de buena calidad y pureza, sin embargo, las muestras extraídas presentaban una alta concentración de sustancias fenólicas debido a la oxidación de las hojas colectadas, mostrándose una coloración gris o parda. Estas sustancias fueron eliminadas adicionando al buffer de extracción mercaptoetanol al 4 % y PVP (Polivinil pirrolidona) al 1 %, mejorando de esta manera las muestras de ADN.

Al realizar el test de integridad de las muestras de mango se observó la presencia de ARN, para esto fue necesario realizar la digestión de este ácido nucleico mediante un tratamiento con la enzima ARNasa, adicionando 40 μg/ml para eliminarlo.

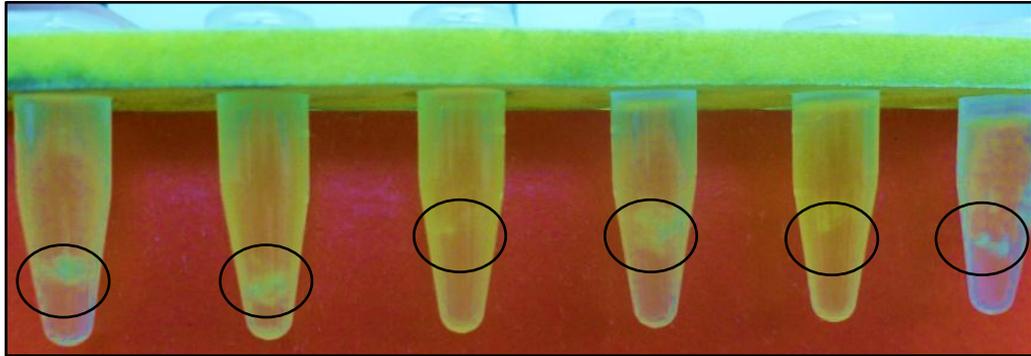


Figura 1. Precipitación de ADN de guanábana en isopropanol.

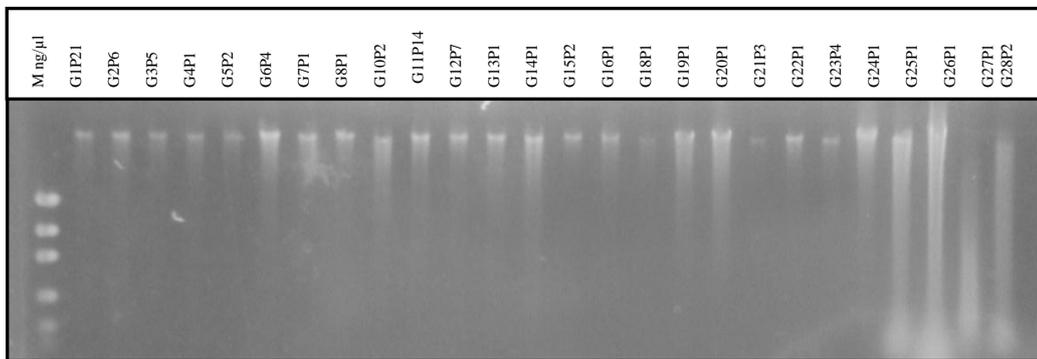


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de ADN genómico de *A. muricata*. Carriles 2-26 ADN. Carril 1 marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder.

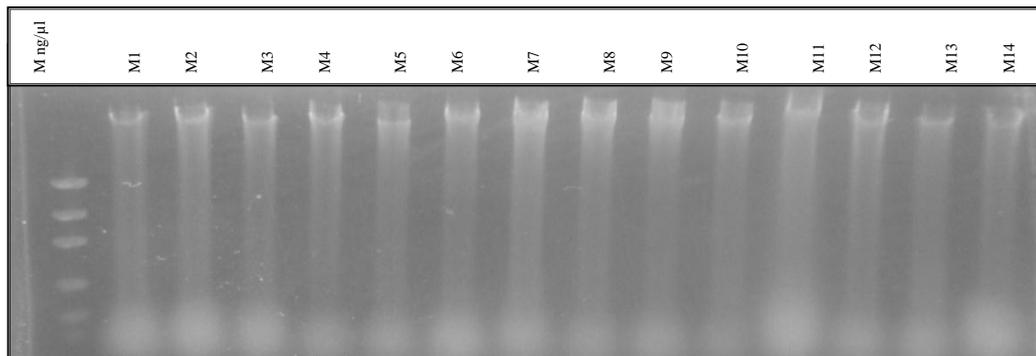


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de ADN genómico de *M. indica*. Carriles 2-14 ADN. Carril 1 marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder.

El ADN obtenido fue de alta calidad y amplificable, apto para su posterior análisis. Las muestras debido a la concentración inicial presentada, tuvieron que

ser diluidas a una concentración final de 5ng para la amplificación con los marcadores RAPDs como para los SSRs.

4.1.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN

Se realizó la validación del ADN tanto en guanábana como en mango, mediante marcadores moleculares RAPDs y SSRs respectivamente, obteniendo amplificación en la mayoría de muestras analizadas; esto demostró que el protocolo utilizado para cada tipo de marcador fue el adecuado tanto en concentraciones de los reactivos como en el programa de amplificación para los posteriores procesos de caracterización.

Se utilizó el primer RAPDs OPW-O1 (5'-CTCAGTGTCC-3') obteniendo buenos patrones de bandeo para las muestras de guanábana a excepción de las accesiones G9P1, G17P1, G34P1, G41P2, G42P1 y G50P1 (Figura 4); para estas accesiones se volvió a realizar pruebas de amplificación, no obteniendo resultados y separándolas de la caracterización.

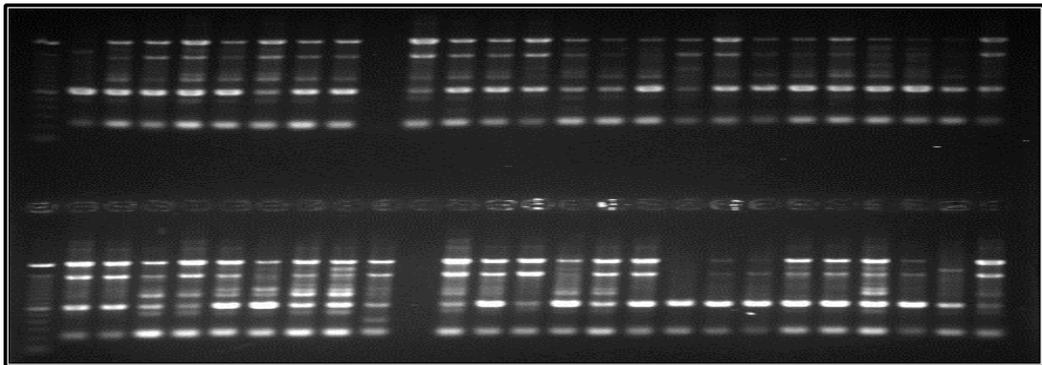


Figura 4. Gel de agarosa al 1.5 % con producto amplificado en la validación de ADN de guanábana.

Las muestras de mango fueron validadas con el primer SSR MiSHRS-1 de secuencia 5' 3' (F-TAACAGCTTTGCTTGCCTCC/R-TCCGCCGATAAACATCAGAC), obteniendo amplificación en todas las accesiones (Figura 5); probando de esta manera que el protocolo reportado por MORILLO E. y MIÑO G. (2010), fue el adecuado para marcadores microsatélites.

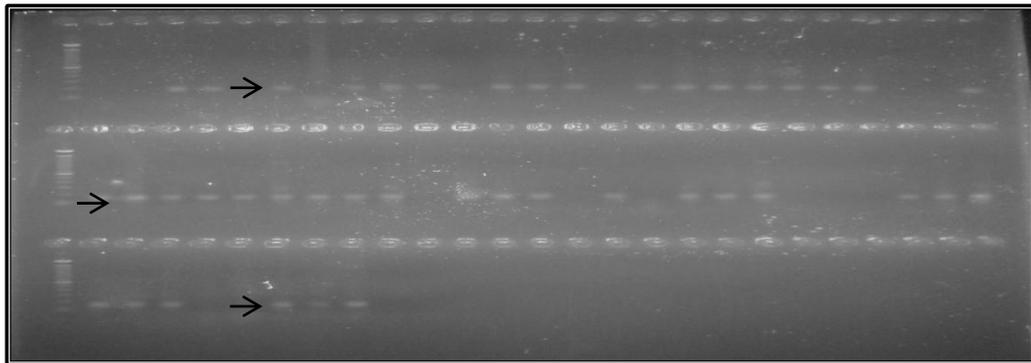


Figura 5. Gel de agarosa al 1.5 % con producto amplificado en la validación de ADN de mango.

4.1.4 TRANSFERIBILIDAD DE *PRIMERS* SSRs

La presente investigación utilizó información generada de marcadores tipo microsatélites, útiles para caracterización genética en *A. cherimola*, (ESCRIBANO P. *et al.*, 2004-2007), proponiendo realizar la transferencia de estos marcadores para *A. muricata*. El screening inicial (Figura 6) se realizó con 17 marcadores SSRs (MORILLO E. y MIÑO G. 2010).

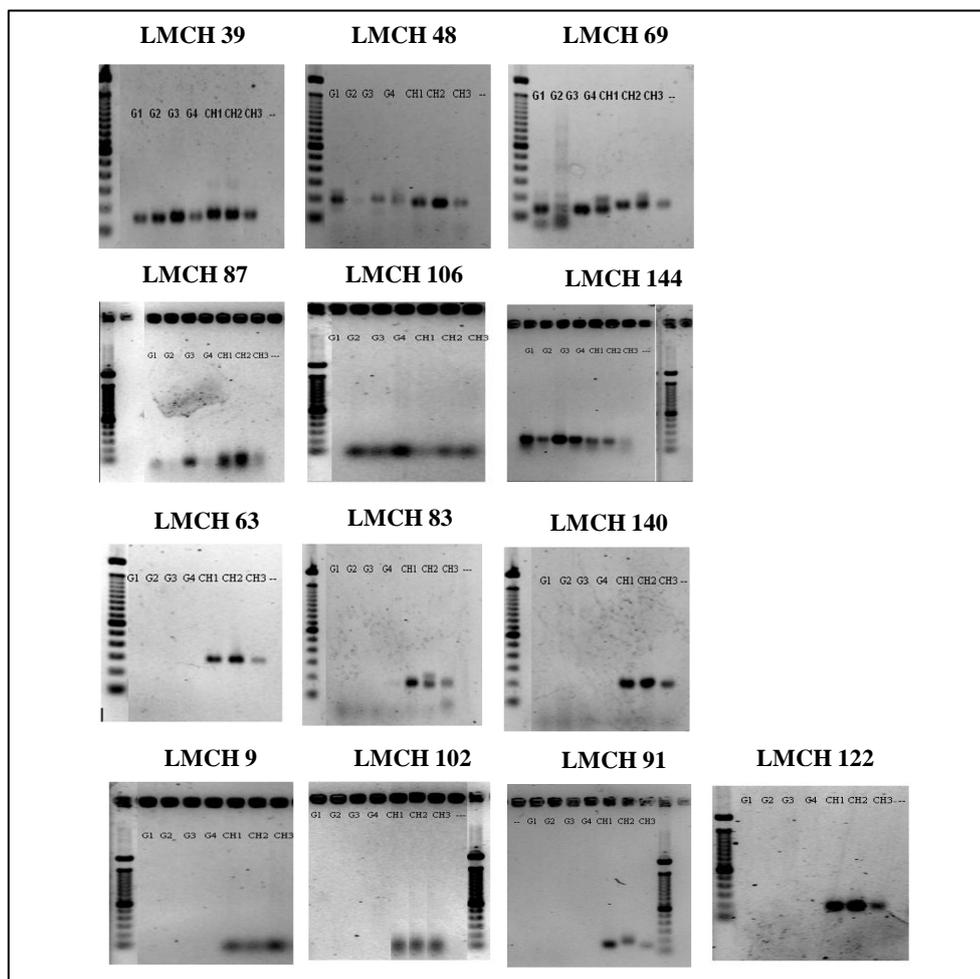


Figura 6. Resultados de transferibilidad de *primers* de *A. cherimola* a *A. muricata*.

En las pruebas de transferibilidad hubieron ADN's que no amplificaron tanto en guanábana como en chirimoya; para verificar esto se realizaron gradientes de temperaturas de annealing, y así poder determinar la temperatura óptima de la amplificación, sin embargo no se obtuvieron resultados con los siguientes *primers*: SSR-1, SSR-4, SSR-16 y SSR-31 (no presentes en la Fig. 6).

Luego de la comprobación de la transferibilidad en geles de agarosa, se realizó geles denaturantes de poliacrilamida (electroforesis vertical) para poder

determinar con exactitud los posibles polimorfismos generados (Figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

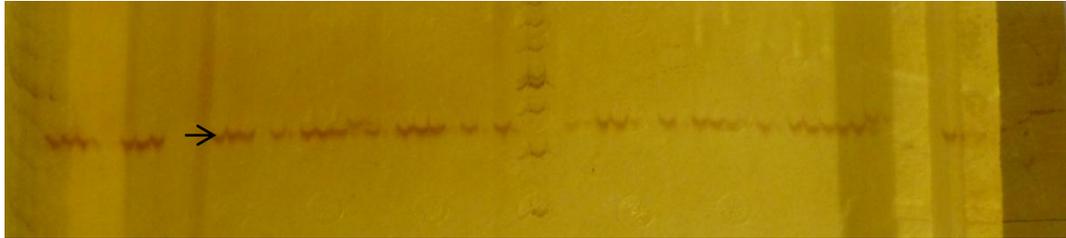


Figura 7. Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-39 (monomórfico).

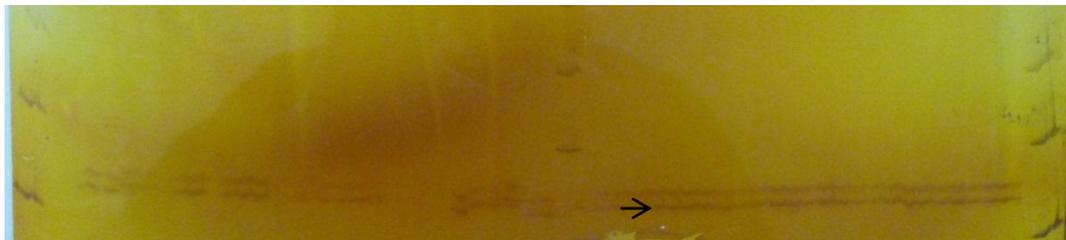


Figura 8. Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-48 (monomórfico).

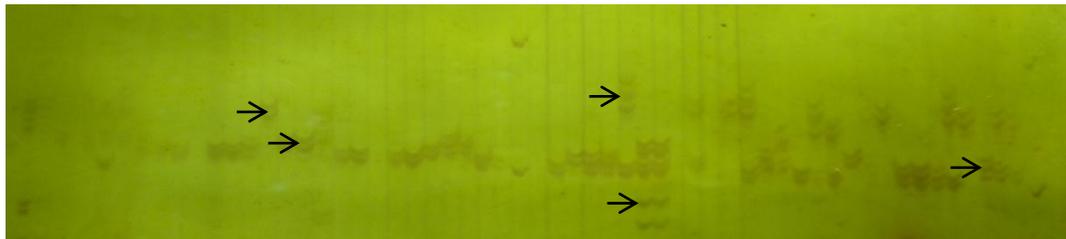


Figura 9. Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-69. Las flechas indican los polimorfismos generados; se observa a este marcador como el más polimórfico.



Figura 10. Gel de poliacrilamida al 6 %, con primer SSR-87 (monomórfico).

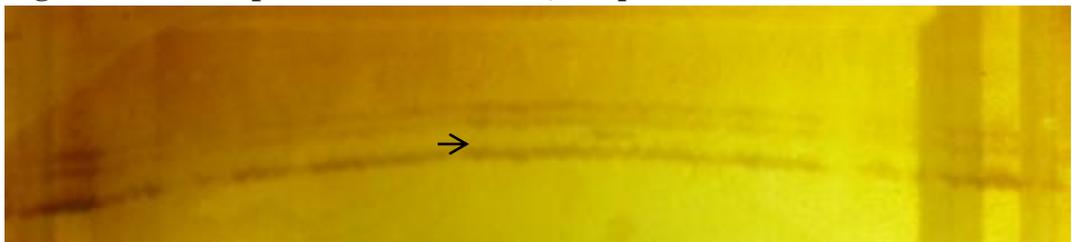


Figura 11. Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-106 (monomórfico).

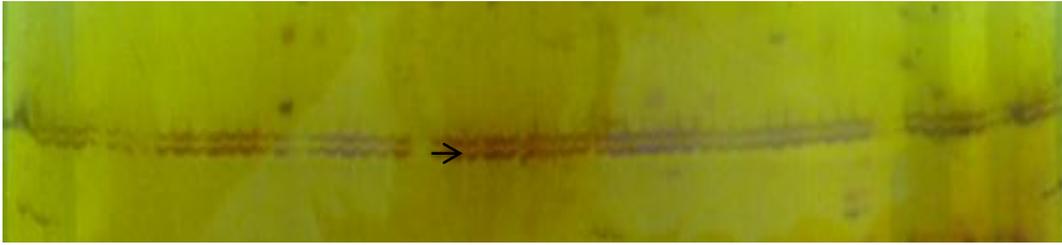


Figura 12. Gel de poliacrilamida al 6 %, primer SSR-144 (monomórfico).

4.1.5 PRESCREENING Y SELECCIÓN DE *PRIMERS* RAPDs Y GENOTIPAJE DE LA COLECCIÓN DE GUANÁBANA.

- **Guanábana**

De los *primers* SSRs que se evaluaron con los ADN's de las accesiones de guanábana, se pudo demostrar que la mayoría de estos se presentaron como monomórficos, por lo que se continuó la caracterización de la colección mediante el uso de marcadores RAPDs.

Posteriormente al realizar el pre-screening con 90 *primers* RAPDs, se seleccionaron 10, y se volvió a evaluar la capacidad de generar polimorfismos; con los que se obtuvo el mayor número de bandas fueron los siguientes: OPW-01, OPW-04, OPM-02, OPC-11, OPG-14, OPG-18, OPB-08, OPB-09, OPC-04, OPM-04; finalmente se procedió a la amplificación con cuatro materiales de *A. muricata* y un control negativo, de éstos se eligieron 6 *primers* que mostraron mayor número de bandas polimórficas para la caracterización molecular de la colección (Cuadro 3); los gels del genotipaje se muestran en el anexo 7.

Estos seis *primers* RAPDs generaron un total de 39 bandas, de las cuales 24 fueron polimórficas (Cuadro 5); siendo el marcador OPG 18 el que mayor número de bandas amplificó.

Cuadro 5. Detalle del porcentaje de polimorfismos generados por los marcadores RAPDs utilizados en la caracterización.

Primer	Productos Amplificados			%	%
	Total bandas	Monomórficas	Polimórficas	Monomf.	Polimorf.
OPG-14	6	3	3	50.00	50.00
OPG-18	9	1	8	11.11	88.89
OPB-08	6	4	2	66.67	33.33
OPB-09	5	1	4	20.00	80.00
OPC-04	5	3	2	60.00	40.00
OPM-04	8	3	5	37.50	62.50
Total	39	15	24	40.88 %	59.12 %

- **Mango**

Se seleccionaron 10 marcadores SSRs para la caracterización de las accesiones de *M. indica* L.; 8 microsatélites desarrollados por SCHNELL *et al.* (2005) de un total de 15, y 2 desarrollados por UKOSKIT K. (2007) de un total de 16. Se seleccionaron según el número de polimorfismos generados en investigaciones anteriores. En el presente trabajo se produjo un total de 26 bandas o alelos con los 10 microsatélites analizados (Cuadro 6), el número de alelos por locus varían de 1 a 4, con un promedio de 3 alelos por microsatélite en las 60 accesiones genotipadas. El promedio de polimorfismo generado por los microsatélites fue de 40 %.

Cuadro 6. Detalle del porcentaje de polimorfismos generados por los marcadores SSR utilizados en la caracterización.

Primer	Productos amplificados			%	%
	Total bandas	Monomórficas	Polimórficas	Monomf.	Polimorf.
MiSHRS-1	4	4	0	100	0
MiSHRS-4	2	2	0	100	0
MiSHRS-18	4	0	4	0	100
MiSHRS-32	2	2	0	100	0
MiSHRS-36	1	1	0	100	0
MiSHRS-37	4	0	4	0	100
MiSHRS-39	3	0	3	0	100
MiSHRS-48	1	1	0	100	0
MITG-436-2	2	2	0	100	0
MIAC-326	3	0	3	0	100
Total	26	8	18	60 %	40 %

4.1.6 ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA

- **Guanábana**

Se procesaron los datos obtenidos de los geles con la información de los 6 marcadores para la elaboración de una matriz binaria, y de esta manera realizar el análisis de diversidad genética mediante el coeficiente de Nei (NEI. 1978). Las accesiones que presentaron datos perdidos, a pesar de haber realizado varias pruebas de amplificación fueron separadas de la matriz, debido a que afectaría en el análisis estadístico (G9P1, G17P1, G34P1, G41P2, G42P1 y G50P1).

A través de la observación de los geles de las accesiones analizadas, se pudo hallar un total de 39 alelos entre monomórficos y polimórficos en toda la población estudiada, a este valor se le adicionó los polimorfismos generados por el marcador SSRs, lo cual proporcionó un total de 46. Los datos de las accesiones fueron clasificados por individuos, población y provincias obteniendo de esta manera un análisis de agrupamiento para cada uno.

El índice de diversidad genética para esta especie fue de $H_t = 0.40$. La matriz de distancias fue establecida mediante el coeficiente de Nei estándar (1978), y representada en un dendrograma generado por UPGMA (Método de agrupamiento por media de aritméticas no ponderable).

Se debe indicar que para determinar el índice de diversidad genética se agrupó a individuos geográficamente cercanos debido al tamaño de la muestra poblacional (Cuadro 7.); esto sucedió con individuos de Yaguachi, Pedro Carbo e Isidro Ayora, los cuales formaron un grupo pertenecientes a la provincia del Guayas; lo mismo sucedió con individuos de Esmeraldas, Colope, Río Verde y Santo Domingo, perteneciendo al grupo de la provincia de Esmeraldas y Santo Domingo; Camilo Ponce Enríquez y Huaquillas pertenecieron al grupo formado por la provincia de Azuay y El Oro.

Cuadro 7. Índice de diversidad genética (I.D.G) de *A. muricata*

	Manabí						Los Ríos	Guayas			Esmeraldas/ Sto. Domingo	Azuay / El Oro	Brasil
	P	CH	JJP	24 M	PV	S.A/ J	PQ	GYQ	Y/P.C /I. A	Q	E/C /R. V/S. D	C.P/ H	B
OPG14	0.54	0.26	0.24	0.41	0.36	0.63	0.43	0.44	0.29	0.63	0.47	0.44	0.17
OPB08	0.27	0.17	0.17	0.31	0.29	0.33	0.17	0.23	0.30	0.25	0.29	0.27	0.29
OPB09	0.31	0.00	0.15	0.11	0.00	0.00	0.18	0.24	0.33	0.15	0.45	0.07	0.15
OPG18	0.63	0.67	0.52	0.68	0.54	0.61	0.67	0.72	0.66	0.75	0.80	0.66	0.56
OPC04	0.46	0.38	0.35	0.42	0.28	0.35	0.38	0.24	0.24	0.50	0.43	0.20	0.00
OPM04	0.59	0.31	0.29	0.74	0.30	0.91	0.46	0.49	0.57	0.81	0.76	0.70	0.56
	0.47	0.30	0.29	0.45	0.29	0.47	0.38	0.39	0.40	0.51	0.53	0.39	0.29
Índice de Diversidad Genética Total													0.40

P=Paján; CH=Chone; JJP=Jipijapa; 24M=24 de Mayo; PV=Portoviejo; S.A=Santa Ana; J=Junín; PQ=Palenque; GYQ=Guayaquil; Y=Yaguachi; P.C=Pedro Carbo; I.A=Isidro Ayora; Q=Quinindé; E=Esmeraldas; R.V=Río Verde; S.D=Santo Domingo; C.P=Camilo Ponce E.; H=Huaquillas; B=Brasil.
Promedio I.D.G Ht= 0.40

- **Mango**

Luego del análisis visual de los geles de poliacrilamida en mango, se procedió a tomar lectura de los polimorfismos generados con los 10 marcadores microsatélites, creando una matriz binaria. Se obtuvo un total de 26 bandas entre monomórficas y polimórficas. El índice de diversidad genética calculado por zona para los 10 marcadores amplificando 60 accesiones fue de Ht= 0.438. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Índice de diversidad genética por zona

	Procedencia de accesiones		
	Chone	Valle del Rio Portoviejo	Daule
Promedio diversidad por zona	0.451524807	0.413427239	0.45132953
Índice de diversidad genética Ht= 0.43876053			

4.1.6.1 Definición de grupos genéticos (*clusters*)

- **Guanábana**

La construcción de árboles o dendrogramas UPGMA mediante el programa FIGTREE, permitió visualizar las relaciones de los individuos analizados, obtenida a partir de la matriz de distancia genética de Nei estándar (1978), este coeficiente de diversidad genética produjo un valor $H_t = 0.40$, demostrando que existe variabilidad genética entre las accesiones analizadas.

En la figura 13, se puede observar la formación de tres grupos (entre estos la presencia de dos genotipos (G37P2, G4P1) independientes al resto de individuos. Esto se pudo confirmar mediante el remuestreo Bootstrap. No existió duplicado de accesiones.

Asimismo, en las figuras 14 y 15 se muestran los dendrogramas formados por población y provincias respectivamente. Cabe recalcar que el método UPGMA empieza a agrupar individuos teniendo en cuenta la mínima distancia, mientras más cercanas a la unidad, presentan mayor similitud.

incorporarse (mayor distancia) al clúster final; cabe mencionar que el grupo 5 está conformado por varios subgrupos que demuestran la existencia de similitud en las accesiones que conforman esta población.

1. Brasil - Guayas/Balzar - El Oro/Huaquillas
2. Esmeraldas/Rio Verde - Guayas/Isidro Ayora
3. Azuay/Camilo Ponce - Manabí/Junin - Esmeraldas/Colope
4. Manabí/Sta Ana - Manabí/24 de Mayo - Manabí/Paján - Guayas/ Pedro Carbo
5. Guayas/Guayaquil - Esmeraldas/Quinindé; Manabí/Portoviejo - Manabí/Chone; Sto. Domingo; Manabí/Jipijapa; Guayas/Yaguachi; Los Ríos/Palenque.
6. Esmeraldas.

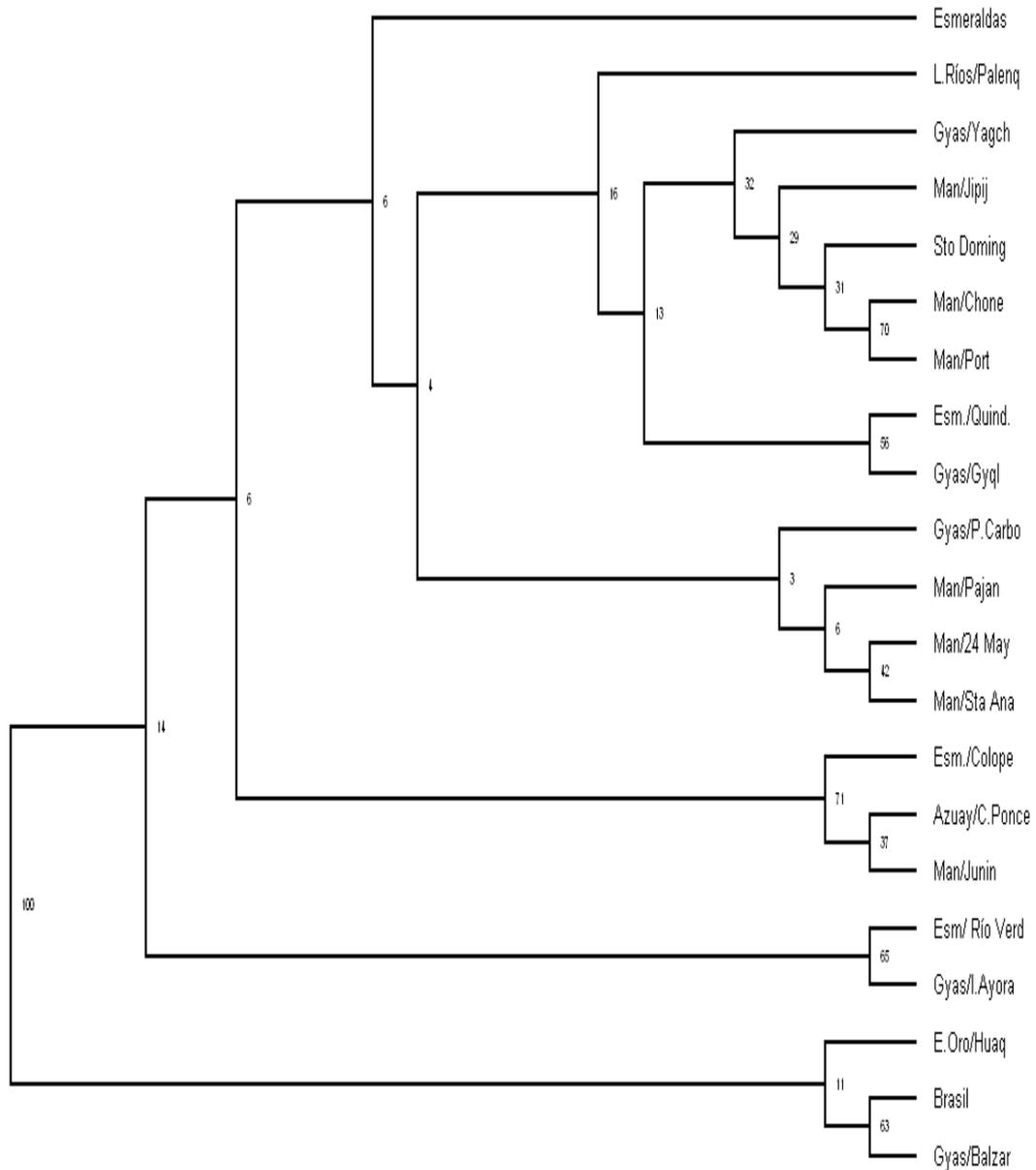


Figura 14. Dendrograma de las accesiones de guanábana por población mediante el coeficiente de similitud de NEI (1978) y representado gráficamente mediante el método UPGMA.

En forma paralela se realizó el análisis cluster por provincias mediante el coeficiente de similitud de Nei (1978) como se demuestra en la figura 15, donde se observa la formación tres grupos.

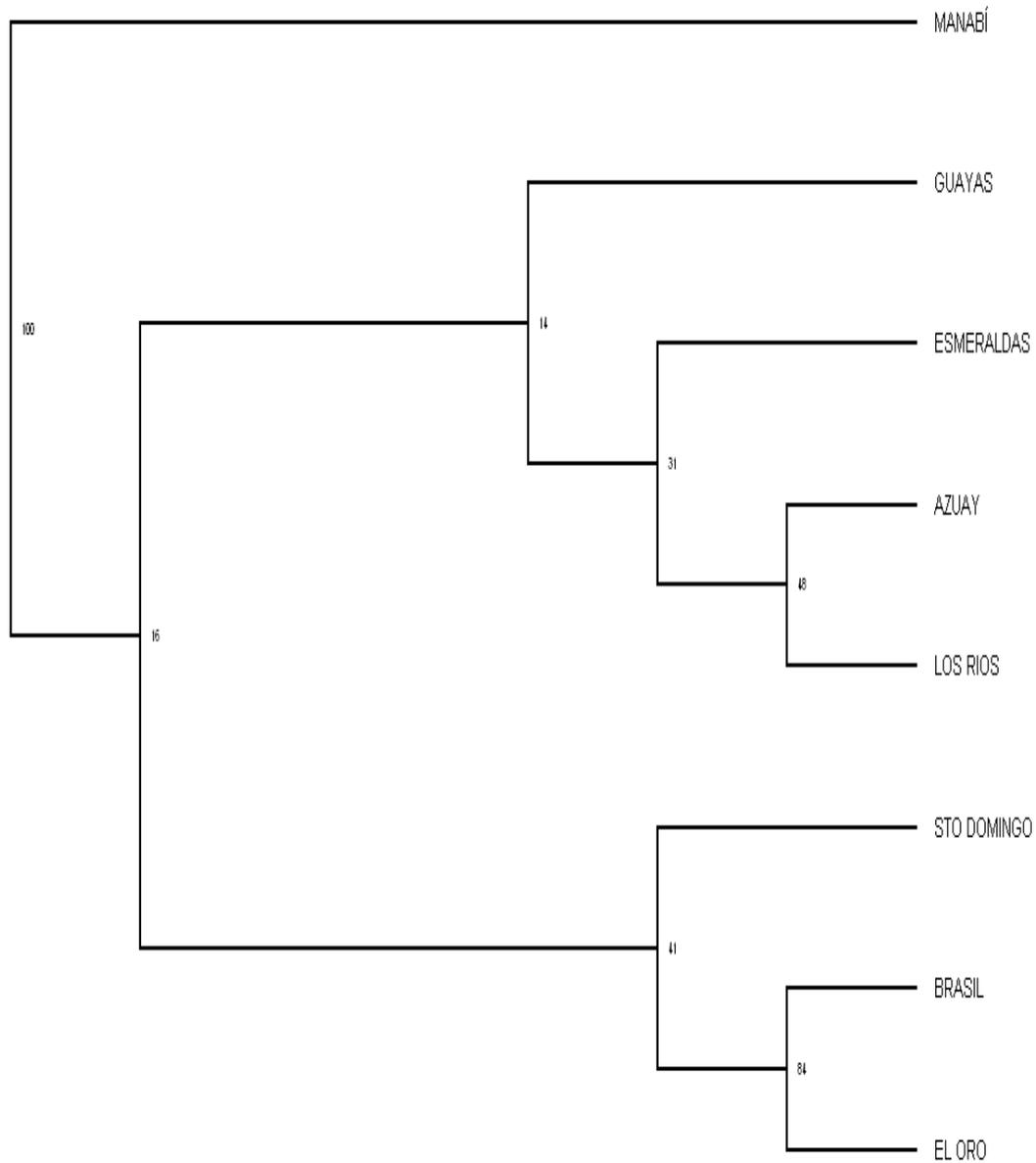


Figura 15. Dendrograma de las accesiones de guanábana por provincias mediante el coeficiente de similaridad de NEI y representado gráficamente mediante el método UPGMA.

A través del análisis de coancestrías con enfoque Bayesiano (Figura 16) se logró un grafico en donde se formaron dos grupos, en la clasificación de dicho algoritmo se observó que la mayoría de genotipos perteneciendo a un grupo en particular, contienen características similares a la de otro conglomerado, lo que

ocasiona en el gráfico líneas de individuos con dos colores. Se consideró un valor de $K=2$ (dos grupos o poblaciones).

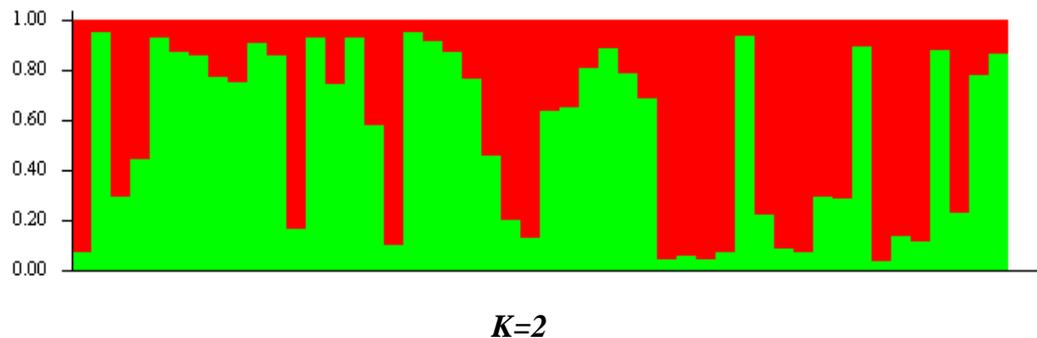


Figura 16. Resultado del análisis de co-ancestrías con Enfoque Bayesiano para las accesiones de guanábana.

- **Mango**

El análisis de la diversidad genética en esta especie realizado con los marcadores SSRs produjo un valor $H_t=0.438$. Cuanto más bajo es el valor del coeficiente de diversidad más homogéneos son los datos y por lo tanto el índice de diversidad genética será menor; como se observa en los dendrogramas obtenidos.

En la figura 17, dendrograma generado en base a la matriz de diversidad genética, permitió visualizar la cercanía genética de sus miembros; destaca además como los valores más próximos a cero al grupo compuesto por los tipos de mango desconocido, chupar y manzana, estos dos últimos se presentan como un mismo genotipo; siendo los más lejanos a cero el grupo compuesto por los tipos de mango chico y grande y miguelillo.

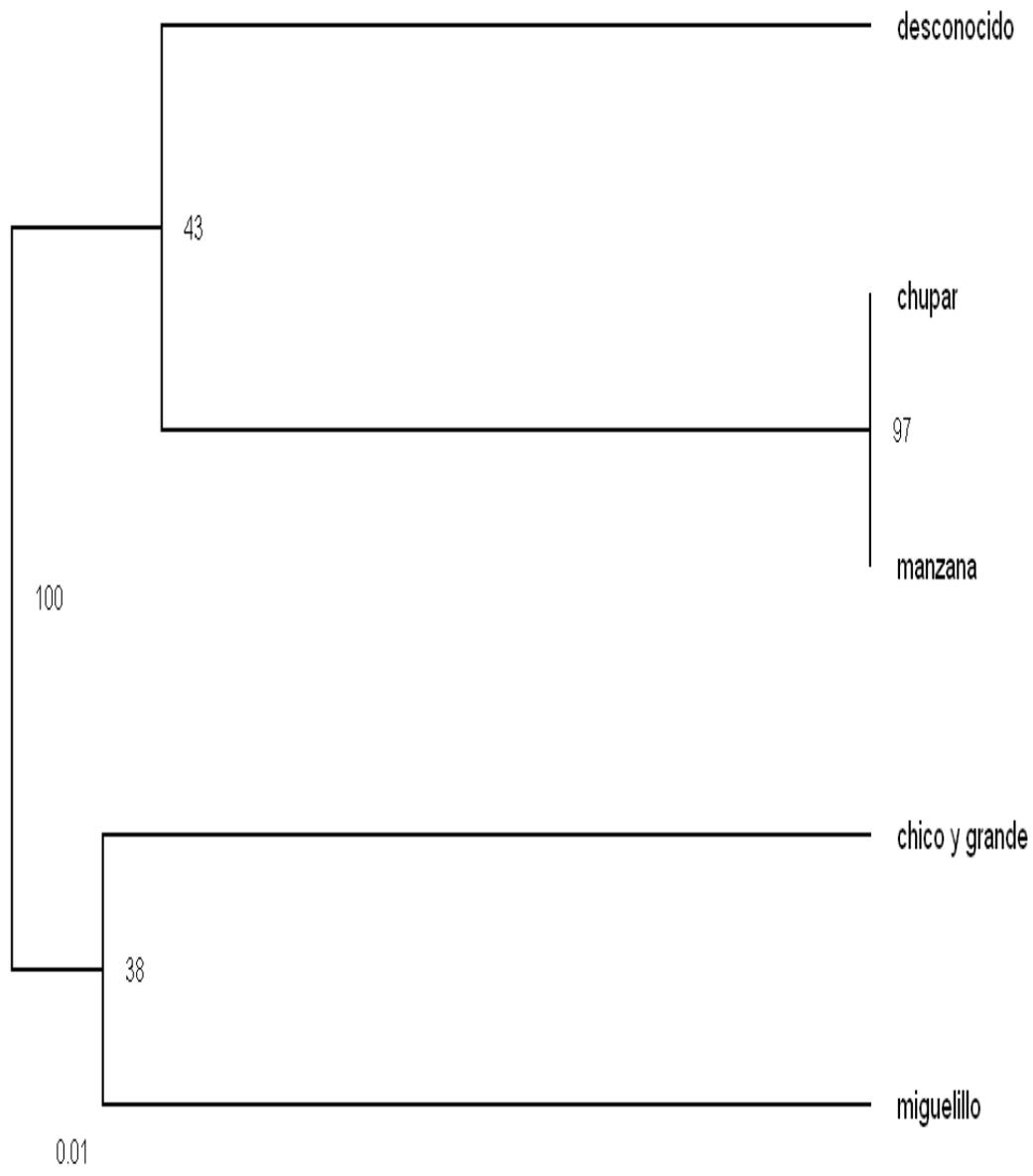
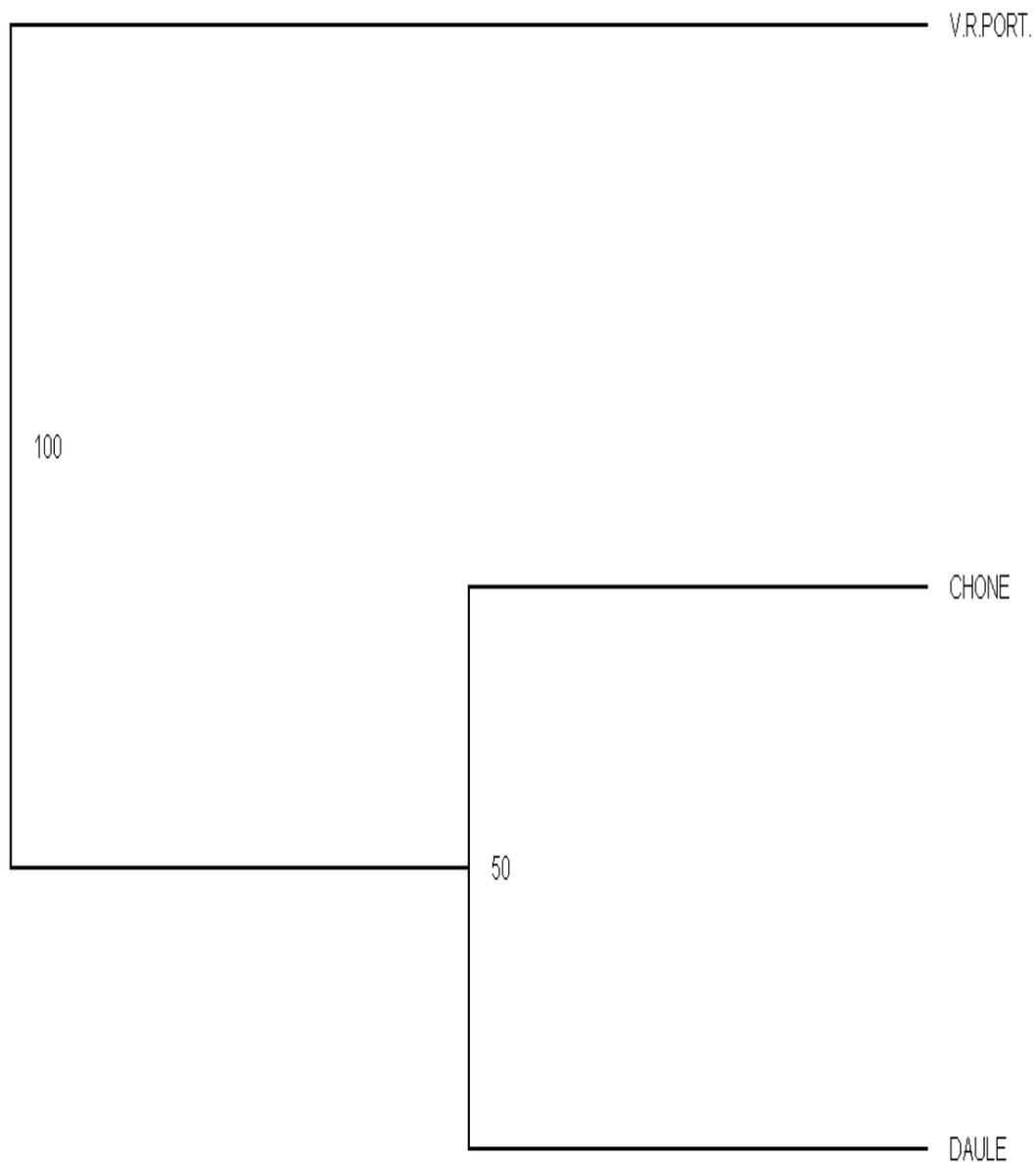


Figura 17. Dendrograma de las accesiones de mango, agrupados por tipo, utilizándose el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de similaridad de JACCARD.

El dendrograma generado para las accesiones de mango agrupados por zona como se muestra en la figura 18, permite verificar la formación de un grupo compuesto por las accesiones de Chone y Daule, lo que demuestra que son muy similares, y otro grupo, el tipo del Valle del Río Portoviejo refleja una mayor distancia a cero e independiente del grupo uno.



Ht =0.48

Figura 18. Dendrograma de las accesiones de mango, agrupados por zona, utilizándose el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de similaridad de JACCARD.

En base a los datos obtenidos en la caracterización molecular de las 60 accesiones con los 10 marcadores SSRs, el resultado del dendrograma obtenido a partir de la matriz generada por el coeficiente de similaridad de JACCARD y mediante el

método de agrupamiento UPGMA, se definieron cinco grupos como lo demuestra la figura 19. La distribución de las accesiones como se observa es homogénea en su mayoría, lo que nos indica que existe una gran similitud genética, en este caso existen varias accesiones que se presentan como duplicados.

En el agrupamiento 1, conformado por las accesiones 9, 17, 39, 38, 45, 16, 24 y 1 se presentan tres subgrupos, existiendo mucha homogeneidad, y 6 de ellas se presentan como duplicados. De la misma manera el agrupamiento 2, conformado por las accesiones 53, 37, 47, 29, 46, 48, 32 y 35 muestran que existen duplicados.

El grupo 3 conformado por las accesiones 21, 2, 14, 10, 18, 22, 15, 19 y 42 se encuentran en su mayoría duplicadas a excepción de la accesión 42. El grupo 4 conformado por las accesiones 7, 6, 26 como duplicados, y la accesión 51; y el grupo 5 con las accesiones 41, 36, 60, 50 presentes como duplicados de la colección y forman un subgrupo, al igual que las accesiones 4, 3, 5, 8, 13, 23, 30, 31, 52, 55, 56, 43, 58, 59, 20, 27, 28, 34, 12, 25, 33, 40, 44, 49, 54 y 57 constan como genotipos idénticos u homogéneos; y la accesión 11.

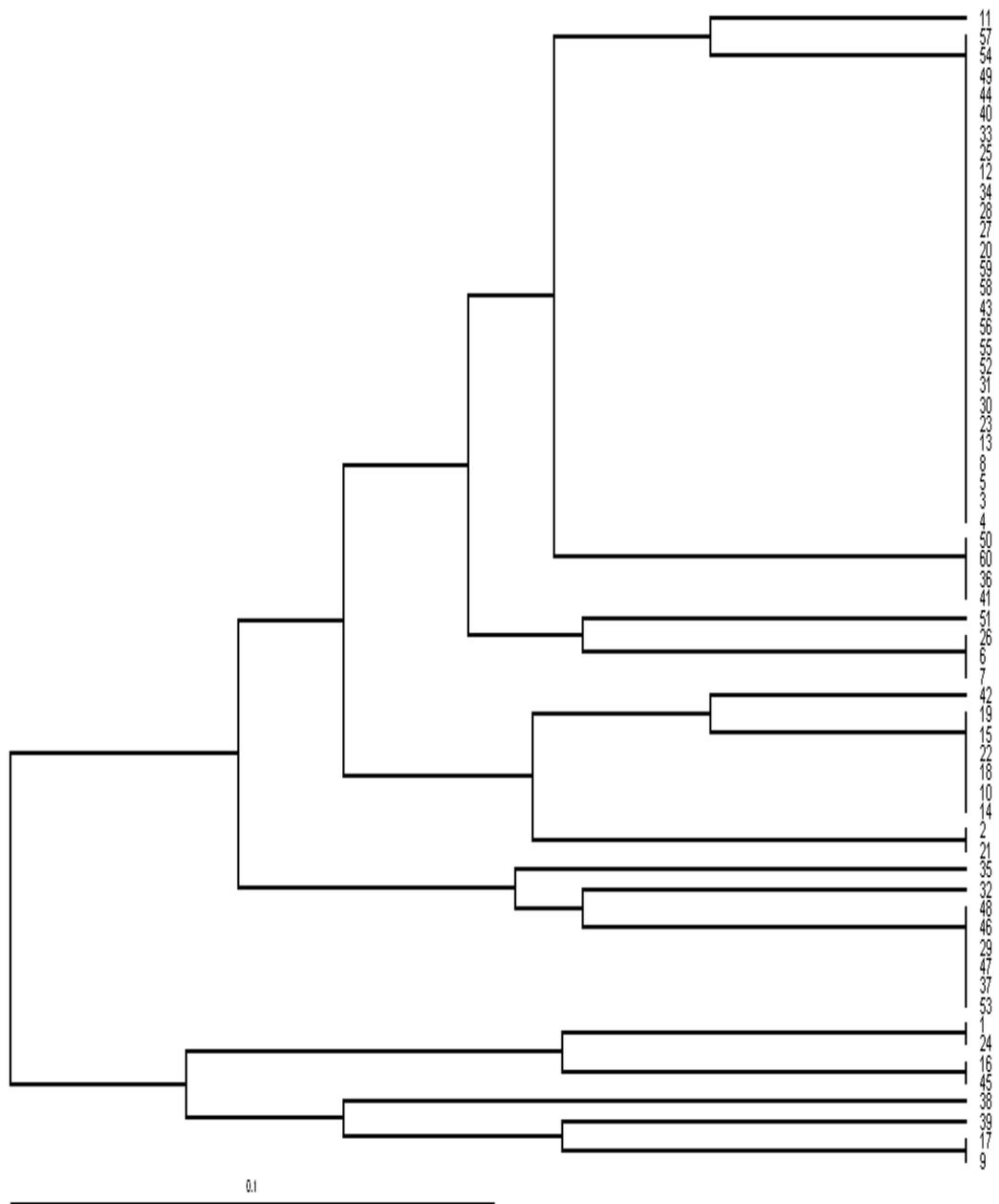


Figura 19. Dendrograma de las accesiones de mango, agrupados por individuos, utilizándose el método de agrupamiento UPGMA con el coeficiente de similaridad de JACCARD. La longitud de la línea, indica una disimilitud de 0.1



K=2



K=3

Figura 20. Resultado del análisis de co-ancestrías con Enfoque Bayesiano para las accesiones de mango.

Del mismo modo se realizó el análisis de co-ancestrías en donde se observa que existe homogeneidad en las poblaciones de mango (Figura 20).

4.2 DISCUSIÓN

4.2.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Uno de los aspectos fundamentales a tomar en cuenta en este tipo de investigaciones es la calidad y cantidad de ADN genómico obtenido para realizar con éxito el proceso de caracterización de especies vegetales; existiendo un sinnúmero disponible de metodologías eficientes para extracción de ADN como son los reportados por DELLAPORTA *et al.* (1983); DOYLE y DOYLE (1990); BAHL y PFENNINGER (1996); y POREBSKI *et al.* (1997).

En el presente trabajo se optó por el método CTAB 5X desarrollado por EMBRAPA (2010), conociendo que este compuesto se asocia fuertemente al ADN, debido a que posee micelas cargadas positivamente, elimina proteínas y previene la degradación del ADN; esto concuerda con lo descrito por VALADEZ y KAHL (2000) citado por ROJAS F. *et al.* (2007) que indica que el CTAB a bajas concentraciones de sal forma complejos con el ADN y mantiene los polisacáridos y proteínas en solución. Cabe destacar además que las altas concentraciones utilizadas de β -Mercaptoetanol y PVP ayudaron en gran manera a la obtención de ADN de calidad conociendo que son agentes antioxidantes, reductores y estabilizadores de enzimas degradantes, esto concuerda con lo descrito por VELASCO R. (2005); POREBSKI *et al.* (1997) y MICHIELS *et al.* (2003) citados por VALDÉS-INFANTE J. *et al.* (s.f).

El método CTAB 5X utilizado ha sido probado también con éxito en otras especies vegetales como soya (*Glycine max*), plátano (*Musa AAB*) ROMERO M. (2010) entre otros; concluyendo que la metodología evaluada es simple, eficiente y rápida.

4.2.2 AMPLIFICACIÓN ADN GUANÁBANA Y MANGO

Un factor clave para la amplificación de ADN es el buffer de PCR, el cual contiene KCl, Tris Base y $MgCl_2$, este último componente es el que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción, ya que los iones Mg^{2+} son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa. La concentración óptima de $MgCl_2$ está en torno a 2 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs (FERREIRA y GRATTAPLAGIA, 1998); no obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg, ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación. En la investigación se utilizó el mix de reacción y el programa de amplificación para marcadores moleculares de la

EESC tanto para RAPD como para SSR (MORILLO E. y MIÑO G., 2011) que concuerda con lo descrito por FERREIRA y GRATTAPLAGIA (1998), los cuales permitieron una buena especificidad del producto PCR, demostrando que las concentraciones de los reactivos utilizados fueron las adecuadas, además de generar disminución en los costos de la caracterización.

4.2.3 TRANSFERIBILIDAD DE SSRS DE CHIRIMOYA A GUANÁBANA

Los resultados de las amplificaciones fueron visualizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (6 %), mediante tinción en plata siguiendo el protocolo de MORILLO E. y MIÑO G. (2011), siendo diferentes a lo esperado en cuanto a los patrones de bandas observados en *A. cherimola*. El 83.33 % de las bandas obtenidas en este trabajo fueron monomórficas a diferencia de lo descrito por ESCRIBANO *et al.* (2007) quienes encontraron gran número de bandas polimórficas en la transferencia de marcadores en especies relacionadas de la familia *Annonaceae*.

Lo mencionado anteriormente puede ser producto de la amplificación no selectiva, un fenómeno muy común cuando se amplifican microsatélites en especies diferentes a la especie para la cual se diseñaron los marcadores, debido a la transferencia y especificidad de los mismos. La transferibilidad de los microsatélites entre especies relacionadas es consecuencia de la homología de las secuencias de ADN en las regiones flanqueantes (ZUCCHI *et al.*, 2003 citado por HILJE I. 2008).

Para este trabajo se planteó la caracterización o análisis de la variabilidad genética a través del uso de marcadores SSRs desarrollados para chirimoya (*A. cherimola* Mill.) en estudios realizados por ESCRIBANO P. *et al.* (2004-2007), seleccionándose 17, en base a la amplificación de 52 microsatélites desde chirimoya en especies relacionadas, y al número de polimorfismos generados

(más informativos); debido que, la transferencia de marcadores que amplifican locis microsatélites desde otras especies es una práctica habitual para obtener marcadores adecuados para estudios de genética poblacional; los marcadores diseñados en una especie (fuente) son utilizados para amplificar locis homólogos en especies relacionadas (blanco); esperando que especies cercanas filogenéticamente compartan un mayor número de marcadores y la distancia genética entre especies podría ser un parámetro útil para predecir el éxito de la transferencia entre diferentes grupos taxonómicos (MORENO. *et al.*, 2011), esto concuerda con lo descrito por BARBARÁ *et al.* (2007) quienes afirman que la homologación de las regiones microsatélites permite la transmisibilidad de estos entre especies estrechamente relacionadas, además de la posibilidad de construcción del mapa comparativo entre ellas. También afirman que existe mayor éxito en la transferencia de microsatélites entre especies cuando éstas tienen tiempos de generación largos (especies perennes), sistemas de reproducción mixtos o exocruamiento, y cuando el tamaño del genoma en la especie blanco es más pequeño que el de la especie fuente.

Sin embargo, teniendo en cuenta lo anteriormente referido, en el presente estudio se obtuvo amplificación solo con 6 pares de *primers* de 17 probados, lo que representa una transmisibilidad del 35 %, y un 65 % no amplificó, esto también concuerda con los resultados descritos por ESCRIBANO *et al.* (2007) donde obtuvieron un bajo índice de amplificación en genotipos de *Asimina triloba* (30 %), indicando que la transferibilidad de SSR varía entre generación y según las distancias filogenéticas.

El bajo índice de transferibilidad de microsatélites de *A. cherimola* hacia *A. muricata* también puede deberse principalmente a diferencias en el tamaño del genoma, uno de los factores descritos por BARBARÁ *et al.*, (2007).

En el caso de *A. muricata* y *A. cherimola*, se necesitan más investigaciones para definir que tan cercanas son estas dos especies, razón por la cual se optó por continuar la caracterización utilizando marcadores RAPDs.

4.2.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS COLECCIONES

- **Guanábana**

Annona muricata L., es un recurso genético autóctono de los países tropicales de América del Sur, con un alto potencial para desarrollarse comercialmente; a pesar de este potencial su estudio no está muy desarrollado. Las diversas accesiones analizadas en este trabajo son procedentes de diversas zonas del país, determinando la diversidad genética usando la técnica RAPDS, que resultó ser una herramienta muy eficiente para alcanzar los objetivos planteados. El polimorfismo detectado con estos marcadores fue del 59,12 %. El marcador que más bandas amplificó fue el OPG-18 con 8 bandas. En total con estos marcadores se obtuvo 39 bandas, de las cuales, 24 bandas fueron polimórficas, este resultado es mayor a lo reportado por BROWN *et al.* (2003) citado por AZOFEIFA-DELGADO A. (2006) quienes identificaron 14 fragmentos RAPDs polimórficos, en la determinación de la variabilidad genética entre materiales de *A. muricata*.

Las accesiones evaluadas presentaron un índice de diversidad genética alto ($H_t=0.40$), comparado con la de otras especies de árboles tropicales como por ejemplo *Annona purpurea* ($H_t=0.27$ con SSRs, HILJE I. 2008); *Annona senegalensis* ($H_s=0.22-0.62$ con SSRs, KWAPATA *et al.*, 2007, citado por HILJE I. 2008) entre otras especies. Sin embargo, algunos autores opinan que la comparación entre especies debe hacerse con precaución, debido al limitado número de loci analizados (PHITER *et al.*, 2003; DEGEN *et al.*, 2004, citados por HILJE I.2008).

Los índices de diversidad genética por marcador, determinaron que existe mayor variación genética en la población de Quinindé, con un 51 %, seguido de las poblaciones de Paján (47 %) y la conformada por Santa Ana-Junín (47 %) basado en el análisis RAPDs.

De esta manera, cuando se habla de diversidad genética entre poblaciones distintas de una misma especie, se refiere a las diferencias que se encuentran en el acervo genético de las mismas, producto de diferentes factores biológicos y geográficos, que ocurren a lo largo de la distribución natural de la especie (NASON 2002, citado por HILJE I.2008).

- **Mango**

Se han utilizado diversas técnicas para el análisis de la variabilidad genética en mango; SCHNELL et al. (1995) por ejemplo, utilizaron marcadores genéticos RAPDs para la identificación de 25 variedades de mango y determinar sus relaciones genéticas. Por su parte, ADATO *et al.* (1995) analizaron los patrones genéticos de ADN obtenidos por pruebas multilocus de 15 minisatélites utilizando 26 variedades de mango y 14 cruzas; quienes encontraron que dichos marcadores diferenciaron el material en estudio por individuo y por grupo y, además, definieron las relaciones genéticas entre las cruzas de acuerdo con el patrón de bandeo, aunque para este último fin no obtuvieron claridad en sus resultados (GALVEZ D. 2006); en la presente investigación se obtuvo información genética a partir de 10 marcadores microsatélites, los cuales demostraron una escasa diversidad genética intraespecífica en las accesiones analizadas, pero demostraron un alto grado de variabilidad interespecífica, obteniendo un índice de diversidad genética por zona de H_t 0.43.

En la investigación realizada, asimismo, se identificó el grado de polimorfismos generado (40 %) por los marcadores microsatélites y el número de alelos por locus, los cuales varían de 1 a 4 por marcador, estos valores son contrarios a los obtenidos por RIBEIRO I. *et al.* (2012) quienes obtuvieron un mayor número de

alelos por locus, entre 2 a 8, y un total de 50 alelos, en la caracterización de 103 accesiones de mango del banco de germoplasma de EMBRAPA, evaluados con 11 marcadores microsatélites. Siendo los microsatélites MiSHRS-1 y mMicIR030 los que presentaron altos valores de polimorfismo, 7 y 8 alelos respectivamente.

El coeficiente de similaridad de JACCARD (1963) obtenido en la investigación demuestra que existe una disimilitud de 0.1, obteniendo de esta manera la formación de cinco grupos; esto discrepa con lo reportado por RIBEIRO *et al.* (2012) quienes obtuvieron un coeficiente de similaridad entre al 30 al 100 %, lo que refleja una alta variabilidad en la colección de mango estudiada; el dendrograma producido por el coeficiente de similaridad de JACCARD demostró la formación de tres grupos con una disimilitud de 0.2.

En general se puede asumir que los marcadores microsatélites que generan un alto número de alelos son aquellos que demuestran una mayor diversidad genética y mayor contenido de información polimórfica, lo que concuerda con lo descrito por WEIR B. (1996) quien señala que la heterocigosidad y el contenido de información polimórfica (PIC) son dos parámetros que representan la existencia de alta variabilidad, porque cada individuo diploide puede tener dos o más alelos por locus; por lo tanto los microsatélites son considerados los más adecuados para estudios de diversidad.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES:

- 1.) El estudio de la variabilidad genética de 54 accesiones de guanábana (*A. muricata* L.) se determinó mediante los marcadores RAPDs: OPG-14, OPB-08, OPB-09, OPC-04, OPM-04 y OPG-18, este último fue el que mayor número de bandas generó, reflejado en un 88,89 % de polimorfismo.
- 2.) La variabilidad genética de 60 materiales de mango (*M. indica* L.) fue determinada a través de los marcadores microsátélites MiSHRS-1, MiSHRS-4, MiSHRS-18, MiSHRS-32, MiSHRS-36, MiSHRS-37, MiSHRS-39, MiSHRS-48, MITG-436-2 y MIAC-326. Los marcadores empleados determinaron bajo nivel de polimorfismos.
- 3.) El análisis de diversidad genética de las colecciones de guanábana y mango produjeron un valor de $H_t=0,40$ y $H_t=0,438$ respectivamente, demostrando que existe diversidad genética entre las accesiones analizadas; esto se demuestra en la formación de grupos genéticos.
- 4.) El dendrograma generado para *M. indica* L. por el método UPGMA (Figura 19), revela que existe una disimilitud de 0.1, demostrando una gran correlación entre accesiones, y por tanto la presencia de accesiones duplicadas.
- 5.) En el caso de *A. muricata* L. no existió duplicados.
- 6.) En cuanto a la distancia genética, en *M. indica* L. se determinó una alta similaridad entre las accesiones de Chone y Daule y otra independiente del

grupo, que fue el tipo del “Valle del Río Portoviejo”. En cuanto a los tipos de mango de “Chupar” y “Manzana” se presentan como un mismo genotipo, mientras que los tipos “Chico y grande”, y “Miguelillo” presentan mayor distancia genética.

7.) Respecto a *A. muricata* L. se formaron tres grupos emparentados y clasificados por provincias:

- Grupo 1: Guayas, Esmeraldas, Azuay y Los Ríos
- Grupo 2: Pichincha, El Oro y las accesiones introducidas desde Brasil
- Grupo 3: las accesiones de Manabí; de manera independiente se integran a estos dos grupos.

Finalmente, se adecuó la metodología de EMBRAPA (2010) y los protocolos propuestos por MORILLO E. y MIÑO G. (2011) para el aislamiento del ADN genómico, especialmente la concentración de los reactivos y el adecuado programa de amplificación, que fueron determinantes al momento de realizar el trabajo de caracterización del ADN en el genotipaje de ambas colecciones.

Es posible concluir que la baja variabilidad generada entre de las accesiones de mango analizadas, se deba específicamente a la forma de propagación y/o colecta del material, debido a que el 90 % de las accesiones o materiales proceden del Valle del Río Portoviejo.

RECOMENDACIONES

- Ampliar el Banco de Germoplasma de ambas colecciones existentes en el Programa de Fruticultura del INIAP, realizando nuevas colectas en diversas zonas del país, y de esta manera aumentar la posible diversidad genética de ambas especies.
- Emplear nuevos marcadores moleculares más informativos y/o discriminativos que garanticen un análisis exhaustivo de la diversidad genética de las colecciones.
- Teniendo en cuenta que es la primera información sobre análisis de la diversidad genética a nivel molecular de las colecciones de las especies analizadas del Programa de Fruticultura del INIAP, se recomienda aumentar el número de muestras por accesión a analizar en futuros estudios moleculares de las colecciones, ya que ayudaría a obtener mejores resultados en el análisis de la diversidad genética.
- Complementar la investigación realizada con información morfoagronómica de las colecciones; a fin de identificar materiales de interés agrícola, para ser utilizados en programas de mejoramiento genético, aprovechando su alto valor comercial.

7 BIBLIOGRAFÍA

AAGAARD J., KRUTOVSKII V y STRAUSS H. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81:69-78. En línea. Consultado el 20 de Febrero del 2011. Disponible en: http://www.cof.orst.edu/coops/tbgrc/publications/Aagard_1998_Heredity.pdf

AVILAN L. y RENGIFO C. 1990. EL MANGO (*Mangífera indica* L.). 1ed. Chacaito. Caracas. Venezuela, Editorial América. 401 p.

AZOFEIFA A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana* 17(2): 221-242. En línea. Consultado el 20 de Diciembre del 2011. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221.pdf

ARMOUR A., NEUMAN R., GOBERT S. y JEFFREYS A. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3(4):599-605. Consultado el 23 de Febrero del 2011. En línea. Disponible en: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/3/4/599.short>

BACKELJAU T., DE BRUN L., DE WOLF H., JORDAENS K., DONGEN S., VERHAGEN R. y WINNEPENNINCKX B. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11:119-130. En línea. Consultado el 20 de Febrero del 2011. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1096-0031.1995.tb00083.x/abstract>

BAHL A. and PFENNINGER M. 1996. A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Research*. 24 (7):1.587-1.588. Consultado el 15 de Diciembre

del 2011. En línea. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145817/pdf/241587.pdf>

BARBARÁ T., PALMA-SILVA C., PAGGI G. y BERED F. 2007. Cross species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* 16, 3759-3767.

CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1998. Protocolos de Laboratorio de Biología Molecular. Tipificación genética. Manual de capacitación. 2da Ed. Lima-Perú. En línea. Consultado el 25 de Febrero del 2011. Disponible en:
http://books.google.com.pe/books?id=ZmxTOpPjHZIC&pg=PP7&dq=microsatelites+en+biologia+molecular+de+plantas&hl=es&ei=CJJWT6BeyOxAqWtpdoJ&sa=X&oi=book_result&ct=bookthumbnail&resnum=2&ved=0CDkQ6wEwAQ#v=onepage&q&f=false

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL CIAT y CORPORACIÓN BIOTEC. 2002. Taller: Guanábana para Colombia y el mundo. Optimización de la cadena productiva. Ed. CABRA J, SÁNCHEZ M y SCHOONHOVEN A. 1ed. Colombia. Ediciones Norma. 56 p.

CHICAIZA G., PUCHA M. y URIGUEN P. 2003. Proyecto para la producción y exportación de la guanábana en la Hacienda “María Dolores” del Cantón El Guabo-Provincia de El Oro. Tesis. ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA (ESPOL). En línea. Consultado el 2 de Marzo del 2011. Disponible en:
http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-32243.pdf

COLTMAN D., BOWEN D y WEITH J. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina concolour*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology* 5:161-163. En línea. Consultado el 25 de

Febrero del 2011. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.1996.tb00303.x/abstract>

COMISIÓN NACIONAL PARA EL CONOCIMIENTO Y USO DE LA BIODIVERSIDAD. CONABIO 1991. *Annona muricata* L. En línea. Consultado el 20 de Octubre de 2011. Disponible en:
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/árboles/doctos/5-annon2m.pdf#search=%22ORIGEN%20Y%20DISTRIBUCION%20DE%20LA%20GUANABANA%22

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL CCI. 1998. Mango, perfil del producto. Boletín informativo No 1. En línea. Consultado el 28 de Abril del 2011. Disponible en:
http://www.cci.org.co/cci/cci_x/Sim/Perfil%20de%20Productos/perfilmango1.html

CRONQUIST A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. En línea. Consultado el 5 de Diciembre 2011. Disponible en http://www.conabio.gob.mx/informacion/catalogo_autoridades/plantas/112007/Cronquist/Cronquist.pdf.

CUBERO J. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2ed. Barcelona. Mundi-Prensa. España. 561 p.

DELLAPORTA S., WOOD J. and HICKS J. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21. En línea. Consultado el 15 de Diciembre del 2011. Disponible en:
http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/biosafety/Gef2/T5/16%20Dr%20Randhawa_%20Isolation%20%26%20purification%20of%20genomic%20DNA.pdf

DOYLE J.J and DOYLE J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15. En línea. Consultado el 15 de Diciembre del 2011. Disponible en http://www.fs.fed.us/psw/programs/nfgel/protocols/rapid_ctabdna.html

ESCRIBANO P., VIRUEL M. y HORMAZA I. 2007. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. Molecular Ecology Resources. E.E. la Mayora-CSIC, Algarrobo-Costa, Málaga 29750, Spain.

FAO. 2006. Guanábana (*Annona muricata*). Fichas Técnicas. Productos frescos y procesados. En línea. Consultado el 15 de Noviembre del 2011. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/GUANABANA.HTM

FENDRI M. 2008. En línea. Uso de marcadores microsatélites (SSRs) para el análisis de la variabilidad molecular y la identificación de las variedades de olivo del banco de germoplasma de “Boughara” (Sfax-Túnez). Tesis de Master, Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina, 99p. En línea. Disponible en http://portail2.reseau-concept.net/Upload/ciheam/fichiers/Thesis_Mr_FENDRI.pdf. Consultado el 14 de Mayo de 2010.

FERREIRA M. y GRATTAPAGLIA D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasil. 220 p.

FUNDACIÓN DE DESARROLLO AGROPECUARIO, INC. 1992. Cultivo de guanábana. Boletín técnico N° 12. Santo Domingo. República Dominicana. En línea. Consultado el 12 de Noviembre del 2011. Disponible en: <http://www.rediaf.net.do/publicaciones/guias/download/guanabana.pdf>

FUNDACIÓN MANGO ECUADOR. 2011. En línea. Consultado el 15 de Noviembre del 2011. Disponible en: <http://www.mangoecuador.org/areas-cultivo.php>

GALÁN V. 2009. El Cultivo del mango. INSTITUTO CANARIO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS. 2ed. Madrid, Mundi-Prensa. 340 p.

GUZMÁN M., GONZÁLEZ A., LUNA L. 2009. Las acetogeninas de Annonaceae: Efecto antiproliferativo en líneas celulares neoplásicas. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (4), 245 – 257. En línea. Consultado el 25 de Abril del 2011. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/856/85611265004.pdf>

HILJE I. 2008. Diversidad genética del árbol *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) utilizando microsatélites como marcadores moleculares. Consultado el 20 de Diciembre del 2012.

HUAMAN Z. y SCHMIEDICHE P. 1991. La importancia de la conservación ex situ de Recursos Genéticos de Papa. En: biodiversity <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2953E/A2953E.PDF>

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA INAMHI, EC. 2006. Anuario Meteorológico. Nro. 46. Quito, Ecuador. 121 p. En línea. Consultado el 25 de Junio 2011. Disponible en <http://www.inamhi.gov.ec/anuarios/am2006.pdf>.

JASIENIUK M AND MAXWELL B. (2001). Plant diversity: new insights from molecular biology and genomics technologies. Weed Science March 2001: Vol. 49, Issue 2 (Mar 2001), pg (s) 257-265. En línea. Biblioteca Virtual de la Universidad Estatal Península de Santa Elena. Consultado el 20 de Mayo del 2013. Disponible en: <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1614/0043->

1745(2001)049[0257:PDNIFM]2.0.CO;2.MIROSLAVA R. 2007. Ecología Molecular. 1 ed. México. En línea. Consultado el 15 de Febrero del 2011. Disponible en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap18.pdf>

MORA J, GAMBOA J y ELIZONDO R. 2002. Guía para el cultivo del mango. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 58p. En línea. Disponible en http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/tec-mango.pdf. Consultado el 14 de Abril de 2010.

MORENO A., MARCHELLI P., VENDRAMIN G. y GALLO L. 2011. Cross transferability of SSRs to five species of Araucariaceae: a useful tool for population genetic studies in *Araucaria araucana*. Forest System 20, 303-314. Consultado el 28 de Diciembre del 2012. Disponible en: www.inia.es/forestsystems.

MORILLO E y MIÑO G. 2011. Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP. Publicación Miscelánea Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Estación Experimental Santa Catalina. Quito, Ecuador. 124 p.

MURILLO J. 2001. Las Annonaceae de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humbolt. Bogotá – Colombia.

OTERO A., DE LA CRUZ M y OYAMA K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. Bol. Soc. Bot. Mex. 60:85-117. En línea. Consultado el 25 de Febrero del 2011. Disponible en: http://www.publicaciones.ujat.mx/publicaciones/kuxulkab/ediciones/32/f_Hernandez_y_Jimenez%202011_32.pdf

PARKER P., SNOW A., SCHUG M., BOOTON G. y FUERST P. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker.

Ecology 79:361-382. En línea. Consultado el 21 de Febrero del 2011. Disponible en:[http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/00129658\(1998\)079%5B0361:WMCTUA%5D2.0.CO%3B2](http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/00129658(1998)079%5B0361:WMCTUA%5D2.0.CO%3B2)

PARROTTA J. 1993. *Mangifera indica* L. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. En línea. Consultado el 13 de Enero del 2011. Disponible en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Mangiferaindica.pdf>

POREBSKI S., BAILEY G. and BAUM B. 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(1):8-15. En línea. Consultado el 15 de Diciembre del 2011. Disponible en: <http://www.mendeley.com/research/modification-of-a-ctab-dna-extraction-protocol-for-plants-containing-high-polysaccharide-and-polyphenol-components/>

RAMBAUT A. 2007. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. En línea. Consultado el 15 de Febrero del 2011. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

ROJAS F., MURILLO O., ARAYA E., AGUILAR G., ROCHA O. 2007. Validación y adaptación de la técnica de microsatélites para el análisis genético de *Vochysia guatemalensis* DONN. SM. En línea. Consultado el 22 de Diciembre del 2011. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/497/49790101.pdf>

SANGUINETTI C., NETO E. and SIMPSON J. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17:915-918. En línea. Consultado el 28 de Junio del 2011. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7840973>.

DOS SANTOS I., LIMA NETO F. Y SANTOS C. 2012. Allelic database and accession divergence of a Brazilian mango collection based on microsatellite

markers. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil. En línea. Consultado el 10 de Enero del 2013.

SCHENELL R., OLANO C., QUINTANILLA W. and MEEROW A. 2005. Isolation and characterization of 15 microsatellite loci from mango (*Mangifera indica* L.) and cross-species amplification in closely related taxa. En línea. Consultado el 10 de Enero del 2011. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-8286.2005.01018.x/citedby>.

TAXONOMY AND SISTEMATICS AT GLASGOW. 2001. En línea. Consultado el 12 de Septiembre del 2011. Disponible en: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>.

TACAN M. 2007. Caracterización agromorfológica e identificación de zonas potenciales de conservación y producción de guanábana (*Annona muricata*) y chirimoya (*Annona cherimola*) en fincas de agricultores y condiciones ex situ en Costa Rica. Tesis *Magister Scientiae*. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 115 p

UKOSKIT K. 2005. Development of microsatellite markers in Mango (*Mangifera indica* L.) using 5' anchored PCR. En línea. Consultado el 10 de Enero del 2011. Disponible en: http://www.tijsat.tu.ac.th/issues/2007/no3/2007_V12_No3_1.PDF.

VALDÉS-INFANTE J., RODRÍGUEZ N., BECKER D., VELÁZQUEZ B., SOURD D., ESPINOSA G., RITTER E., RISTERUCCI A., BILLOTTE N., y ROHDE W. s.f. Caracterización molecular por AFLP y SSR del Banco de Germoplasma del guayabo (*Psidium guajava* L.) en Cuba. En línea. Consultado el 20 de Diciembre del 2011. Disponible en: http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/import/Germoplasma_Guayabo_Cuba.pdf

VELASCO R. 2005. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Grupo de Investigación ASUBAGROIN- FCA. Unicauca. Colombia. En línea. Consultado el 16 de Diciembre del 2011. Disponible en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art32.pdf>

WILLIAMS J., KUBELIK A., LIVAK K., RAFALSKI J. y TINGEY S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18:6531-6535. En línea. Consultado el 18 de Febrero del 2011. Disponible en: <http://nar.oxfordjournals.org/content/18/22/6531.short>

WHITKUS R., DOEBLEY J. y WENDEL J. 1994. Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: Phillips R.L. y J.K. Vasil (Ed.). *DNA-based markers in plants*. Klumer Academic Publishers, Netherlands. pp. 116-14. En línea. Consultado el 18 de Febrero de 2011. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=hQCv1sFX5U8C&oi=fnd&pg=PA116&dq=Nuclear+DNA+markers+in+systematics+and+evolution&ots=GowEiZUnjL&sig=xo6NLq9CGi5dUigByzuoAl6kTko#v=onepage&q=Nuclear%20DNA%20markers%20in%20systematics%20and%20evolution&f=false>

ZAMUDIO, T. 2005. Regulación jurídica de las biotecnologías. En línea. Consultado 18 Septiembre de 2011. Disponible en: <http://www.biotech.bioetica.org/pcios/bilbliogral.htm>.

ANEXOS

Cuadro 1A. Listado de reactivos, materiales y equipos

Reactivos	Equipos	Materiales
Nitrógeno Líquido	Balanza analítica	Tijeras
Tris HCl 1M pH 8	Potenciómetro	Fundas
NaCl	Baño María	Hielera
EDTA 0.5M pH 8	Sorbona	Hielo seco
CTAB	Vórtex	Morteros
PVP	Centrífuga	Tubos Eppendorf
Bisulfito sódico	Refrigerador	Micro pipetas
β-mercaptoetanol	Cámara de electroforesis	Puntas blancas (2 a 20 µl)
Cloroformo Alcohol	horizontal y vertical	Puntas amarillas (10 a 100 µl)
Isoamílico (CIA 24:1)	Fuente de poder	Puntas celestes (100 a 1000 µl)
Etanol	Transiluminador UV	Flotadores
Agua destilada	Termociclador	Guantes de nitrilo
Agarosa		Espátulas
TAE		Parafilm
Bromuro de etidio		Cinta de papel
MgCl ₂ (25mM)		Tubos PCR
Buffer 10x		Placas
dNTP's		Papel toalla
Primer RAPD y SSR		Peines
Taq Polimerasa		Separadores
Agua ultrapura		
Aceite mineral		
Hidróxido de sodio al 1%		
Bind silane		
Ácido acético glacial		
Auri glass		
Acrilamida		
Bis-Acrilamida		
TEMED		
Persulfato de amonio (APS)		
TBE 1x		
Ácido nítrico		
Nitrato de plata		
Formaldehído		
Tiosulfato de sodio		

Cuadro 2A. Listado de las accesiones de guanábana, códigos y procedencia geográfica

Código de accesión en campo	Código Laboratorio	Procedencia geográfica	Código de accesión en campo	Código Laboratorio	Procedencia geográfica
G1P21	G1	Manabí-Junín	G28P2	G28	Los Ríos-Palenque
G2P6	G2	Manabí-Paján	G29P1	G29	Guayas-Guayaquil
G3P1	G3	Manabí-Paján	G30P1	G30	Guayas-Guayaquil
G4P1	G4	Manabí-Paján	G31P1	G31	Guayas-Yaguachi
G5P2	G5	Manabí-Jipijapa	G32P1	G32	Esmeraldas-Quinindé
G6P4	G6	Manabí-Chone	G33P1	G33	Esmeraldas-Quinindé
G7P1	G7	Manabí-Chone	G34P1	G34	Esmeraldas
G8P1	G8	Manabí-Chone	G35P1	G35	Esmeraldas
G9P1	G9	Manabí-Paján	G36P1	G36	Esmeraldas-Colope
G10P1	G10	Manabí-Paján	G37P2	G37	Esmeraldas-Río Verde
G11P4	G11	Manabí-Paján	G38P2	G38	Santo Domingo
G12P7	G12	Manabí-Paján	G39P1	G39	Los Ríos-Palenque
G13P4	G13	Manabí-Paján	G40P1	G40	El Oro-Huaquillas
G14P18	G14	Manabí-Jipijapa	G41P1	G41	El Oro-Marcabellí
G15P2	G15	Manabí-Jipijapa	G42P1	G42	Loja-Puyango
G16P1	G16	Manabí-Jipijapa	G43P1	G43	Azuay-Camilo Ponce
G17P1	G17	Manabí-Jipijapa	G44P1	G44	Azuay-Camilo Ponce
G18P1	G18	Manabí-24 de Mayo	G45P1	G45	Azuay-Camilo Ponce
G19P1	G19	Manabí-24 de Mayo	G46P3	G46	Azuay-Camilo Ponce
G20P1	G20	Manabí-24 de Mayo	G47P1	G47	Guayas-Guayaquil
G21P3	G21	Manabí-Portoviejo	G48P1	G48	Guayas-Pedro Carbo
G22P1	G22	Manabí-Portoviejo	G49P1	G49	Guayas-Isidro Ayora
G23P4	G23	Manabí-Portoviejo	G50P1	G50	Guayas-Balzar
G24P1	G24	Manabí-Portoviejo	G51P1	G51	Brasil
G25P1	G25	Manabí-Santa Ana	G52P1	G52	Brasil
G26P3	G26	Manabí-Junín	G53P1	G53	Guayas-Guayaquil
G27P1	G27	Los Ríos-Palenque	G54P1	G54	Brasil

Fuente: Programa de Fruticultura E.E.L.S-INIAP (2011)

Cuadro 3A. Listado de las accesiones de mango, códigos y procedencia geográfica

Código de muestras en campo y laboratorio	Tipo	Procedencia geográfica	Código de muestras en campo y laboratorio	Tipo	Procedencia geográfica
M1	Miguelillo	Chone	M31	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M2	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M32	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo
M3	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M33	Desconocido	Daule
M4	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M34	Manzana	Chone
M5	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M35	Desconocido	Daule
M6	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo	M36	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M7	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo	M37	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M8	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M38	Desconocido	Daule
M9	Miguelillo	Chone	M39	Desconocido	Daule
M10	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M40	Desconocido	Daule
M11	Miguelillo	Chone	M41	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo
M12	Desconocido	Daule	M42	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M13	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M43	Chico y grande	Daule
M14	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M44	Desconocido	Daule
M15	Desconocido	Daule	M45	Desconocido	Daule
M16	Miguelillo	Chone	M46	Desconocido	Daule
M17	Miguelillo	Chone	M47	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo
M18	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M48	Desconocido	Daule
M19	Desconocido	Daule	M49	Desconocido	Daule
M20	Manzana	Chone	M50	Manzana	Chone
M21	Manzana	Chone	M51	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo
M22	Manzana	Chone	M52	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M23	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M53	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M24	Desconocido	Daule	M54	Desconocido	Daule
M25	Desconocido	Daule	M55	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M26	Desconocido	Daule	M56	Chupar	Valle del Río Portoviejo
M27	Manzana	Chone	M57	Desconocido	Daule
M28	Manzana	Chone	M58	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo
M29	Manzana	Chone	M59	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo
M30	Chupar	Valle del Río Portoviejo	M60	Chico y grande	Valle del Río Portoviejo

Fuente: Programa de Fruticultura de la E.E.P-INIAP (2011)

Cuadro 4A. Cuantificación de ADN de guanábana y dilución

Cuantificación de ADN de guanábana por fluorometría									
			Dilución a 5 ng/ μ l					Dilución a 5 ng/ μ l	
Código	Lectura μ g/ml	Concentración μ g/ml	ADN	H2O Tz	Código	Lectura μ g/ml	Concentración μ g/ml	ADN	H2O Tz
G1	3.37	135	4	96	G28	1.69	67.5	7	93
G2	2.89	116	4	96	G29	2.9	116	4	96
G3	0.731	29.2	17	83	G30	2.9	116	4	96
G4	2.7	108	5	95	G31	3.71	148.4	3	97
G5	1.24	49.6	10	90	G32	9.1	364	1	99
G6	2.39	95.6	5	95	G33	1.5	65	8	92
G7	3.05	122	4	96	G34	0.5	20	25	75
G8	2.51	100.4	5	95	G35	1.56	62.4	8	92
G9	0.851	34.04	85	15	G36	1.56	62.4	8	92
G10	0.98	39.2	13	87	G37	1.21	48.4	10	90
G11	2.78	111.2	5	95	G38	1.38	55.2	9	91
G12	2.69	107.6	5	95	G39	1.60	64	8	92
G13	0.731	29.2	17	83	G40	0.731	29.2	17	83
G14	1.85	74	7	93	G41	0.329	13.2	38	62
G15	0.731	29.2	17	83	G42	0.731	29.2	17	83
G16	0.975	39	13	87	G43	0.25	10	50	50
G17	0.731	29.2	17	83	G44	1.60	64	8	92
G18	0.731	29.2	17	83	G45	1.60	64	8	92
G19	2.03	81.2	6	94	G46	9.7	388	1	99
G20	2.03	81.2	6	94	G47	0.25	10	50	50
G21	2.16	86.4	6	94	G48	2.58	103.2	5	95
G22	0.785	31.4	16	84	G49	1.85	74	7	93
G23	0.749	29.9	17	83	G50	0.298	11.9	42	58
G24	2.81	112.4	4	96	G51	0.586	23.4	21	79
G25	1.56	62.4	8	92	G52	0.731	29.2	17	83
G26	1.56	62.4	8	92	G53	6.2	248	2	98
G27	2.46	98.4	5	95	G54	2.51	100.4	5	95

Cuadro 5A. Cuantificación de ADN de mango y dilución

Cuantificación de ADN de mango por fluorometría									
			Dilución a 5 ng/μl					Dilución a 5 ng/μl	
Código	Lectura μg/ml	Concentración μg/ml	ADN	H2O Tz	Código	Lectura μg/ml	Concentración μg/ml	ADN	H2O Tz
M1	0.491	19.64	25	75	M31	1.24	49.6	10	90
M2	2.32	92.8	5	95	M32	1.60	64	8	92
M3	1.56	62.4	8	92	M33	1.24	49.6	10	90
M4	0.496	19.84	25	75	M34	1.56	62.4	8	92
M5	0.496	19.84	25	75	M35	1.24	49.6	10	90
M6	1.5	65	8	92	M36	0.98	39.2	13	87
M7	2.35	94	5	95	M37	2.03	81.2	6	94
M8	1.83	73	7	93	M38	2.9	116	4	96
M9	3.05	122	4	96	M39	2.32	92.8	5	95
M10	1.60	64	8	92	M40	2.32	92.8	5	95
M11	0.51	20.4	25	75	M41	1.21	48.4	10	90
M12	2,3	92	6	94	M42	2.51	100.4	5	95
M13	1.5	65	8	92	M43	1.21	48.4	10	90
M14	0.491	19.64	25	75	M44	0.496	19.84	25	75
M15	1.24	49.6	10	90	M45	0.496	19.84	25	75
M16	1.5	65	8	92	M46	1.21	48.4	10	90
M17	3.37	135	4	96	M47	1.21	48.4	10	90
M18	1.21	48.4	10	90	M48	1.60	64	8	92
M19	0.51	20.4	25	75	M49	0.491	19.64	25	75
M20	1.21	48.4	10	90	M50	0.491	19.64	25	75
M21	2.51	100.4	5	95	M51	1.24	49.6	10	90
M22	0.51	20.4	25	75	M52	0.51	20.4	25	75
M23	0.95	38	13	87	M53	2.3	92	5	95
M24	1.21	48.4	10	90	M54	2.3	92	5	95
M25	2.51	100.4	5	95	M55	2.25	90	5	95
M26	1.24	49.6	10	90	M56	0.51	20.4	25	75
M27	0.98	39.2	13	87	M57	1.24	49.6	10	90
M28	1.60	64	8	92	M58	0.491	19.64	25	75
M29	1.24	49.6	10	90	M59	0.491	19.64	25	75
M30	0.491	19.64	25	75	M60	1.24	49.6	10	90

Protocolo 1A. Electroforesis vertical en gel denaturante de acrilamida

1.) Tratamiento de placas

- Lavar las dos placas de vidrio (adherente y repelente) con jabón líquido, preferiblemente utilizar esponjas distintas y realizar presión sobre los vidrios al lavar para retirar restos de acrilamida o de solución repelente, luego sumergir las placas en bandejas separadas en una solución de hidróxido de sodio al 1% durante dos horas y enjuagar con mucho cuidado con agua destilada aproximadamente a 45 °C, evitar tocar la superficie a tratar con los guantes. Dejar secar.
- Con papel toalla absorbente secar residuos de agua de ambas placas y rociar etanol al 100%, limpiar las placas de manera horizontal y vertical, esto es para poder cubrir toda la superficie del vidrio y así evitar problemas futuros. Realizar este proceso tres veces. Luego, en cada placa se distribuye 1 ml de cloroformo realizando los mismos movimientos por tres ocasiones con un papel distinto para cada aplicación y se espera 10 minutos para continuar con el tratamiento. La superficie de las placas debe estar totalmente lisa al tacto, indicativo de que se ha limpiado correctamente.
- La placa adherente se la trató con la siguiente solución (1000 µl de etanol al 100%, 3 µl de bind silane y 5 µl de ácido glacial acético). Distribuir uniformemente 500 µl de esta solución con papel absorbente en forma horizontal y luego 500 µl en forma vertical. Dejar secar por 60 min.
- La placa repelente se la trató con la solución comercial antilluvia o LLUVIEX. Distribuir uniformemente 500 µl de esta solución con papel absorbente en forma horizontal y luego 500 µl en forma vertical. Dejar secar por 60 min o preferiblemente tratar las placas con un día de anticipación.

2.) Preparación de Solución de Poliacrilamida (PA)

- Se preparó 1000 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida al 6% (urea 500g; acrilamida 57 g; bis-acrilamida 3 g y Tampón TBE 10 X 50 ml, aforar a 1000 ml con agua destilada) mantener en agitación constante hasta que todos los componentes se hayan disuelto en el plato agitador – calentador, proteger de la luz con papel de aluminio.

3.) Preparación del gel de secuenciación

- Ensamblar las dos placas de vidrio colocando los separadores de 0.04 mm y ajustar con pinzas todo el borde de la placa, tener cuidado de no mover los separadores y de no ajustar demasiado. Colocar la placa ensamblada dentro de una bandeja.
- En la sorbona (cámara de extracción de gases) se midió 100 ml de solución de PA y se añadió 714,28 µl de APS (Persulfato de amonio) con 71,4 µl de TEMED, se agita cuidadosamente. La solución de PA se dispensó entre las placas con mucha uniformidad y evitando la formación de burbujas, ya que estas impiden una adecuada corrida de las muestras amplificadas.
- Seguidamente se ubicó el peine del mismo grosor de los separadores (0.04 mm) de forma inversa para formar la línea base y se dejó polimerizar el gel por dos horas. Una vez transcurrido este tiempo se retira el peine y se limpia el borde de la placa para descartar residuos de urea y de acrilamida, se voltea el peine y se forman los pocillos.
- Luego de polimerizado el gel se realiza una pre-corrida en la cámara de electroforesis vertical con buffer TBE 1X por 15 min a 400 V para denaturar el gel.

4.) Preparación del producto amplificado, carga en gel y electroforesis.

- Se añade el tampón blue stop a los productos amplificados para darle peso y color a las muestras a cargar, se agrega la mitad de tampón azul de parada del volumen final de amplificación en este caso se agregó 3.75 μ l; luego se denatura las muestras a 94 °C por 5 min y se enfría en hielo.
- Se procede a cargar 4 μ l de las muestras denaturadas en el gel de PA junto con el marcador de peso molecular TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (2 μ l), se aconseja dejar los tres primeros pocillos del gel libres debido a defectos de corrida.
- Se realiza la electroforesis durante 8 horas a 400 V o 3 horas a 1000 V. Una vez transcurrido este tiempo se procede a realizar la tinción en la solución de nitrato de plata.

5.) Tinción con nitrato de plata

- Se retira la placa de la cámara y se procede a separar la placa adherente de la repelente paulatinamente sobre una superficie plana, con mucho cuidado para evitar romper el gel.
- La placa adherente se sumerge en 1000 ml de solución de tinción (10% de etanol al 100%; 0,5% de ácido glacial acético y 0,2 % de nitrato de plata AgNO₃) por 20 min en agitación constante y cubriéndola de la luz. Transcurrido el tiempo se retira de esta solución y se lava durante 1min con agua mili-Q o agua destilada, no exceder en el enjuague.
- Posteriormente en 1000 ml de solución de revelado (Hidróxido de sodio NaOH al 0,3 %) previamente calentada en baño maría a 55 °C se añade 300 μ l formaldehído mezclando por medio de agitación y se sumerge la placa hasta poder observar las bandas. En caso de que las bandas no se visualicen es

necesario incrementar el volumen de formaldehído. Es necesario chequear continuamente para evitar que el gel se queme.

- Inmediatamente se retira y se coloca en 1000 ml de solución de parada (10% etanol al 100% y 0,5% de ácido glacial acético) hasta que las bandas se tornen más oscuras, se retira y se deja secar para luego ser fotodocumentado y determinar el peso de las bandas.

Figura 1A. Gel de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata* .Las flechas indican los polimorfismos generados con los distintos marcadores RAPDs.

- OPG-14

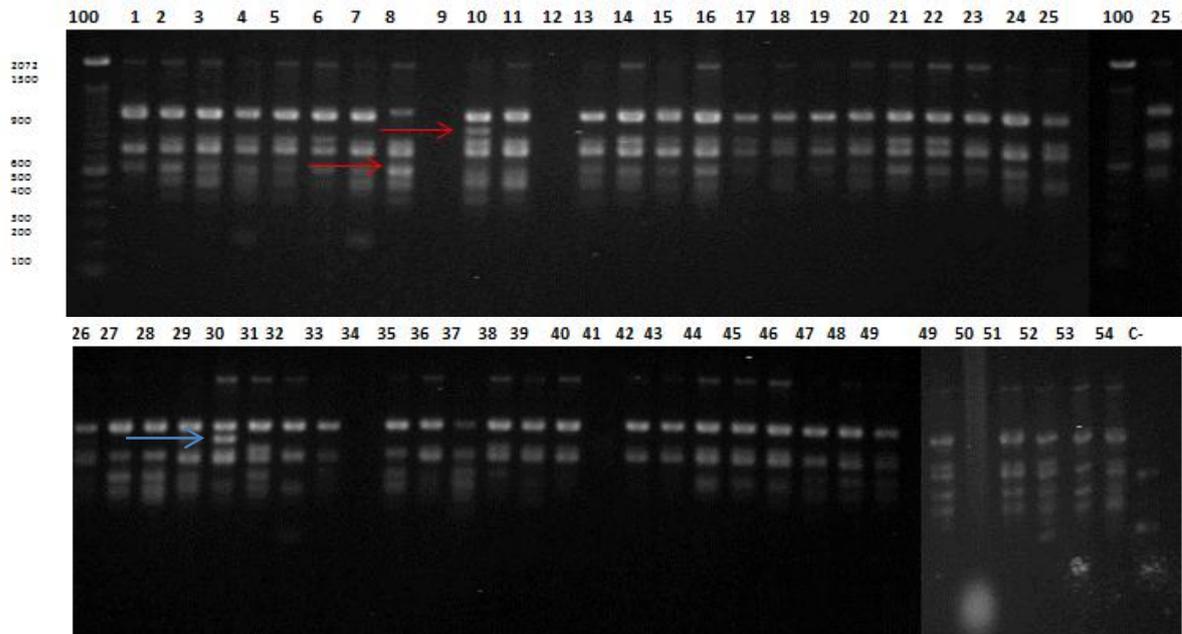


Figura 2A. Gel de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata* .Las flechas indican los polimorfismos generados.

- OPG-18

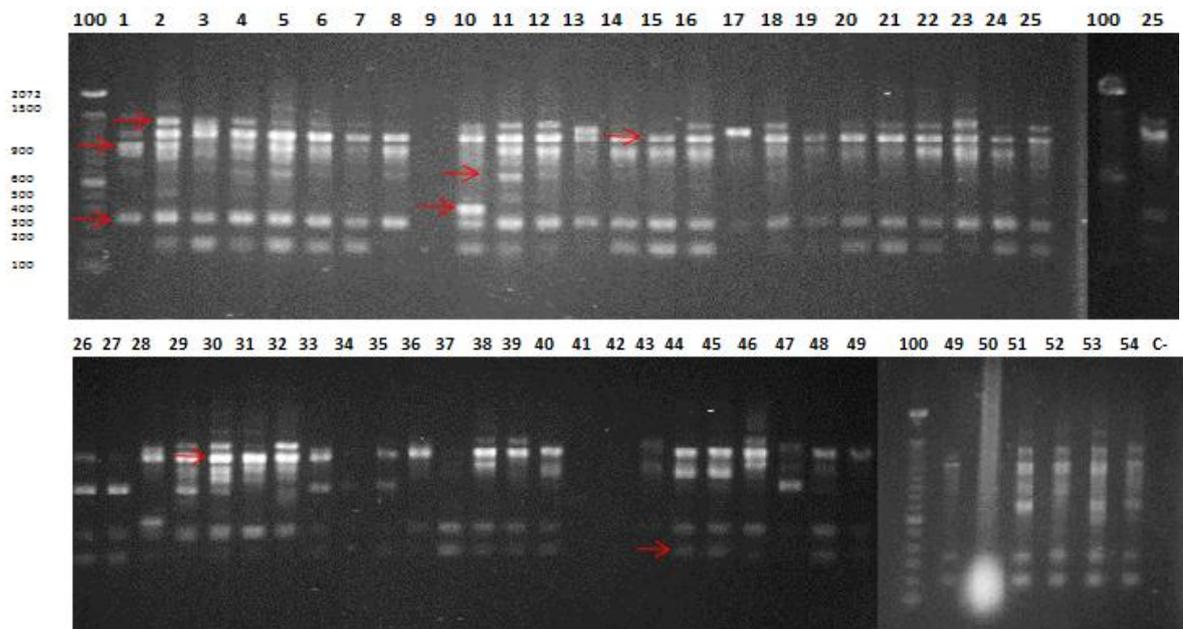


Figura 3A. Gel de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata* .Las flechas indican los polimorfismos generados.

- OPB-08

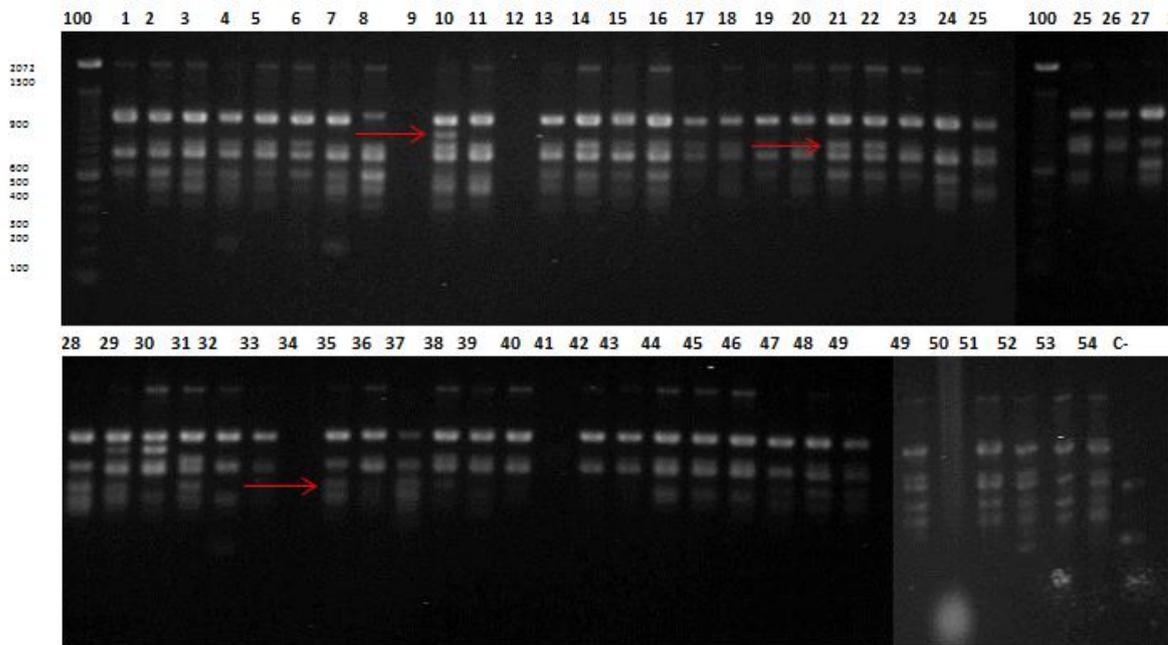


Figura 4A. Gel de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata* .Las flechas indican los polimorfismos generados.

- OPB-09

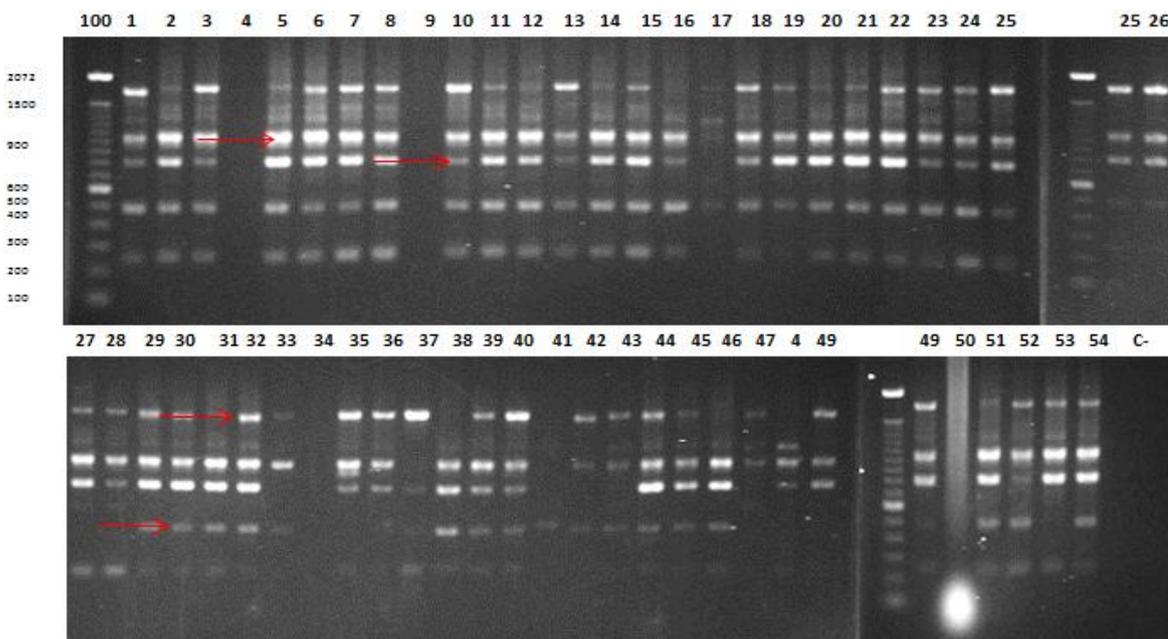


Figura 5A. Gel de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata* .Las flechas indican los polimorfismos generados.

- OPC-04

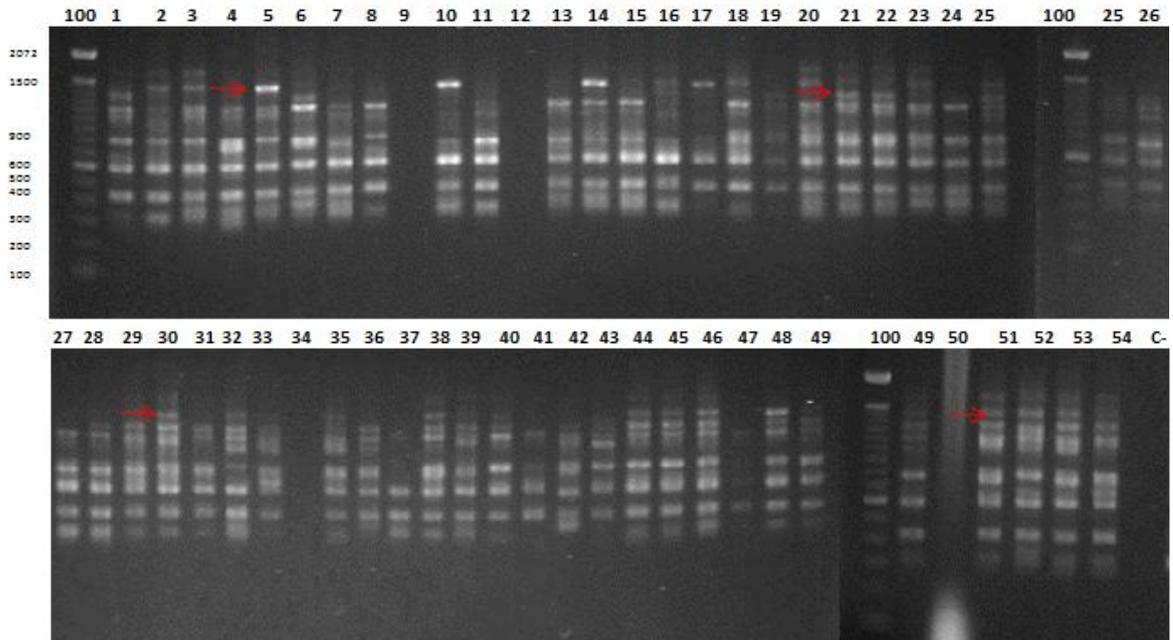


Figura 6A. Gel de agarosa al 1,5 % con producto amplificado del genotipaje de la colección de *A. muricata* .Las flechas indican los polimorfismos generados.

- OPM-04

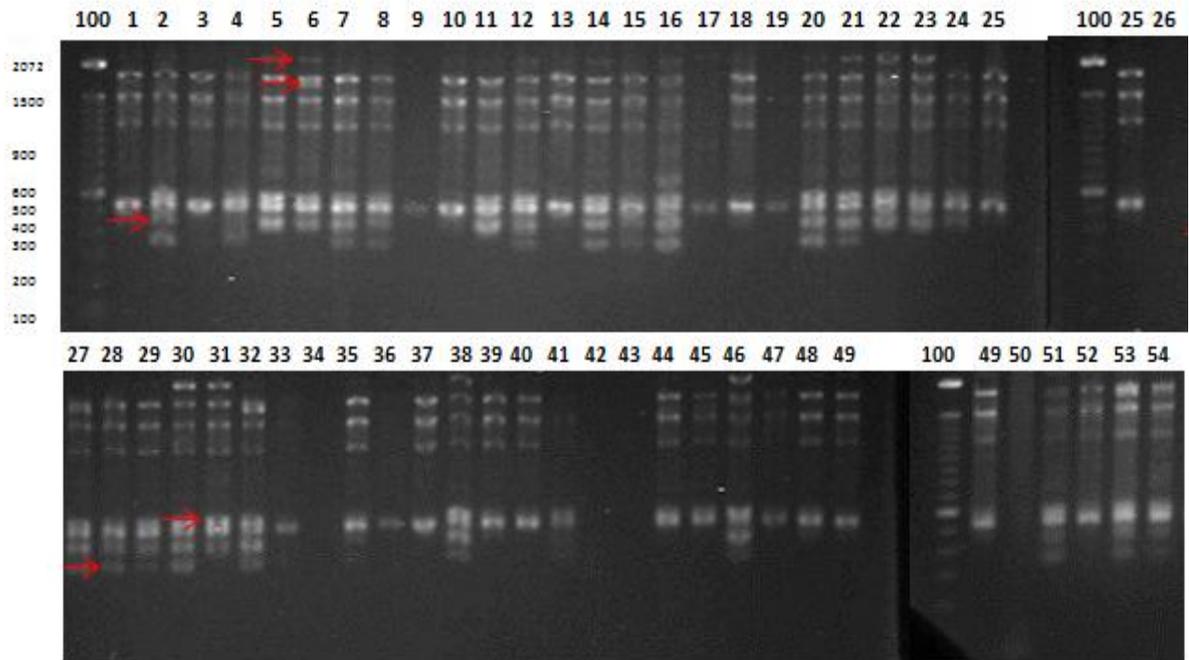


Figura 7A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-4; tamaño del producto (bp) 130**

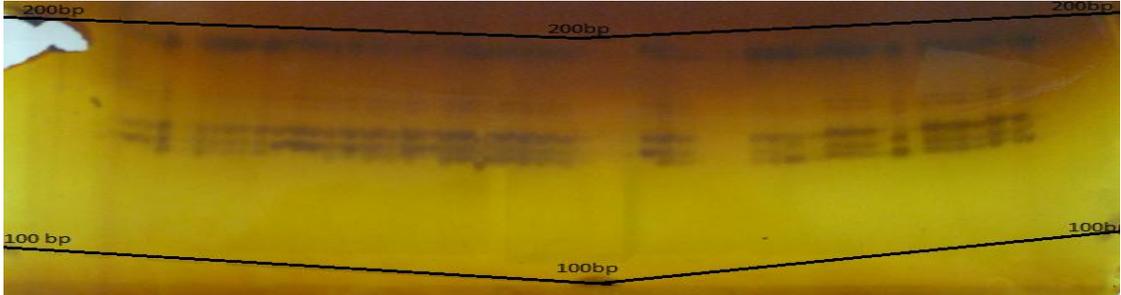


Figura 8A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-1; tamaño del producto (bp) 200**



Figura 9A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-18; tamaño del producto (bp) 100**

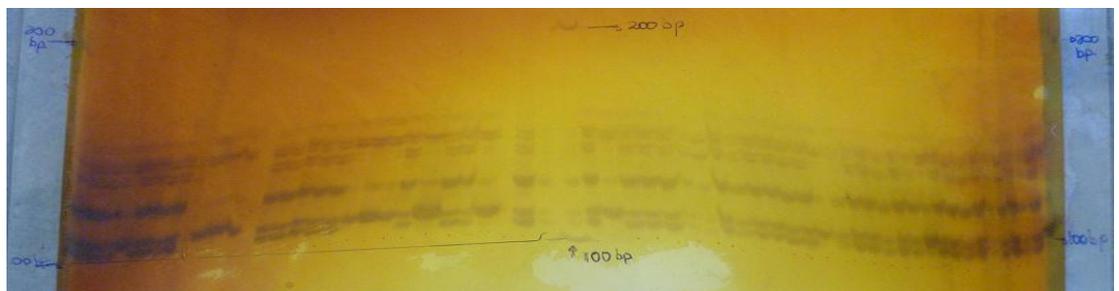


Figura 10A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-32; tamaño del producto (bp) 230**

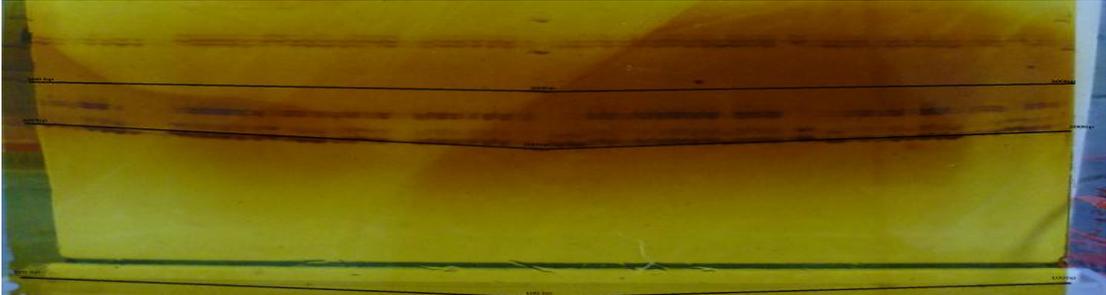


Figura 11A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-36; tamaño del producto (bp) 190**

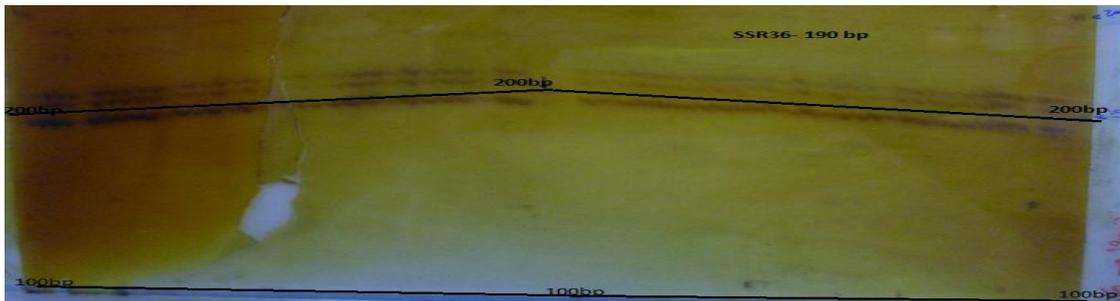


Figura 12A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-37; tamaño del producto (bp) 130**



Figura 13A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-39; tamaño del producto (bp) 370**

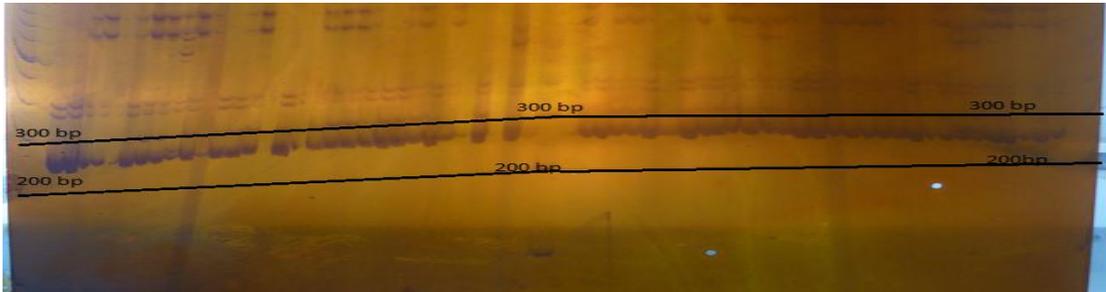


Figura 14A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MiSHRS-48; tamaño del producto (bp) 220**



Figura 15A. Gel de poliacrilamida al 6 % con producto amplificado para el genotipaje de la colección de *Mangifera indica* L.

- **Primer MITG 436-2; tamaño del producto (bp) 158**

