

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN realizada con el método modificado de Khanuja *et al.* (1999) de las muestras del grupo 4 (Pedernales Canoa Km 4, 65 individuos), del grupo 12 (Pichincha Quiroga, 33 individuos) y del grupo 15 (Manta Puerto Cayo, 32 individuos) mostró buenos resultados pues para la mayoría de individuos se obtuvo una concentración de ADN entre 30 y 50 ng/ul. Además, la contaminación y la degradación de ADN no son significativas, ya que no influyeron en la reacción de la PCR. En la Figura 3.1 se aprecia las bandas de ADN genómico extraído para las muestras de las tres poblaciones de piñón.

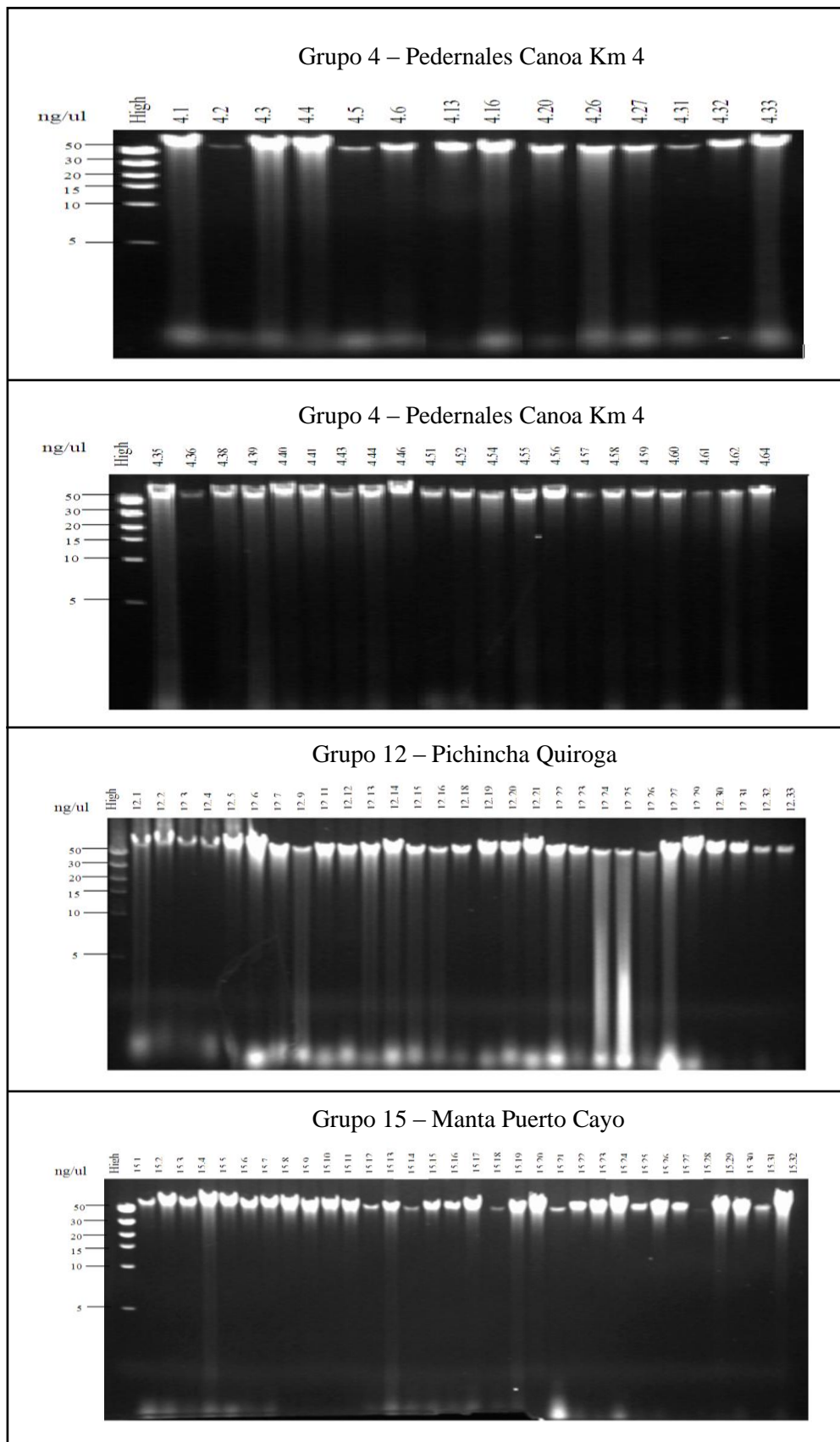


Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de las soluciones de ADN de las muestras de piñón. En los gels se indica la codificación de las muestras, el grupo al que pertenecen y la concentración correspondiente a cada banda del marcador de peso molecular High DNA mass ladder INVITROGEN®.

Debido principalmente a la disponibilidad de reactivos y al número de muestras se analizaron 15 individuos de cada población de *Jatropha curcas* L. La cuantificación de ADN por fluorimetría se realizó de 45 soluciones de ADN. La codificación para estos individuos se muestra en la Tabla 3.1. Los valores de lectura obtenidos y el valor de la concentración de ADN se muestran en el Anexo A.

Tabla 3.1 Código de individuos seleccionados de las tres poblaciones de piñón utilizados para la amplificación de bandas y análisis de datos.

Pedernales Canoa Km 4	Pichincha Quiroga	Manta Puerto Cayo
4.1	12.6	15.2
4.4	12.7	15.3
4.13	12.11	15.6
4.16	12.12	15.8
4.20	12.13	15.9
4.27	12.14	15.10
4.32	12.15	15.11
4.33	12.18	15.15
4.38	12.19	15.17
4.46	12.20	15.23
4.52	12.21	15.26
4.56	12.22	15.27
4.58	12.29	15.29
4.59	12.30	15.30
4.64	12.31	15.32

3.2 Amplificación de fragmentos de ADN mediante primers ISSRs

3.2.1 Selección de primers

Se amplificaron fragmentos de ADN con los 10 primers descritos en la Tabla 2.4 (*Materiales y métodos*, ver apartado 2.8) utilizando dos soluciones de ADN (muestra 8 y 13) a concentraciones de 5 y 30 ng/ul, con el fin de probar la viabilidad de las soluciones de primers, escoger los primers que amplifiquen el mayor número de fragmentos de ADN y conocer de manera general cual es la concentración óptima de ADN en la PCR. En la Figura 3.2 se indican los productos amplificados con los 10 primers.

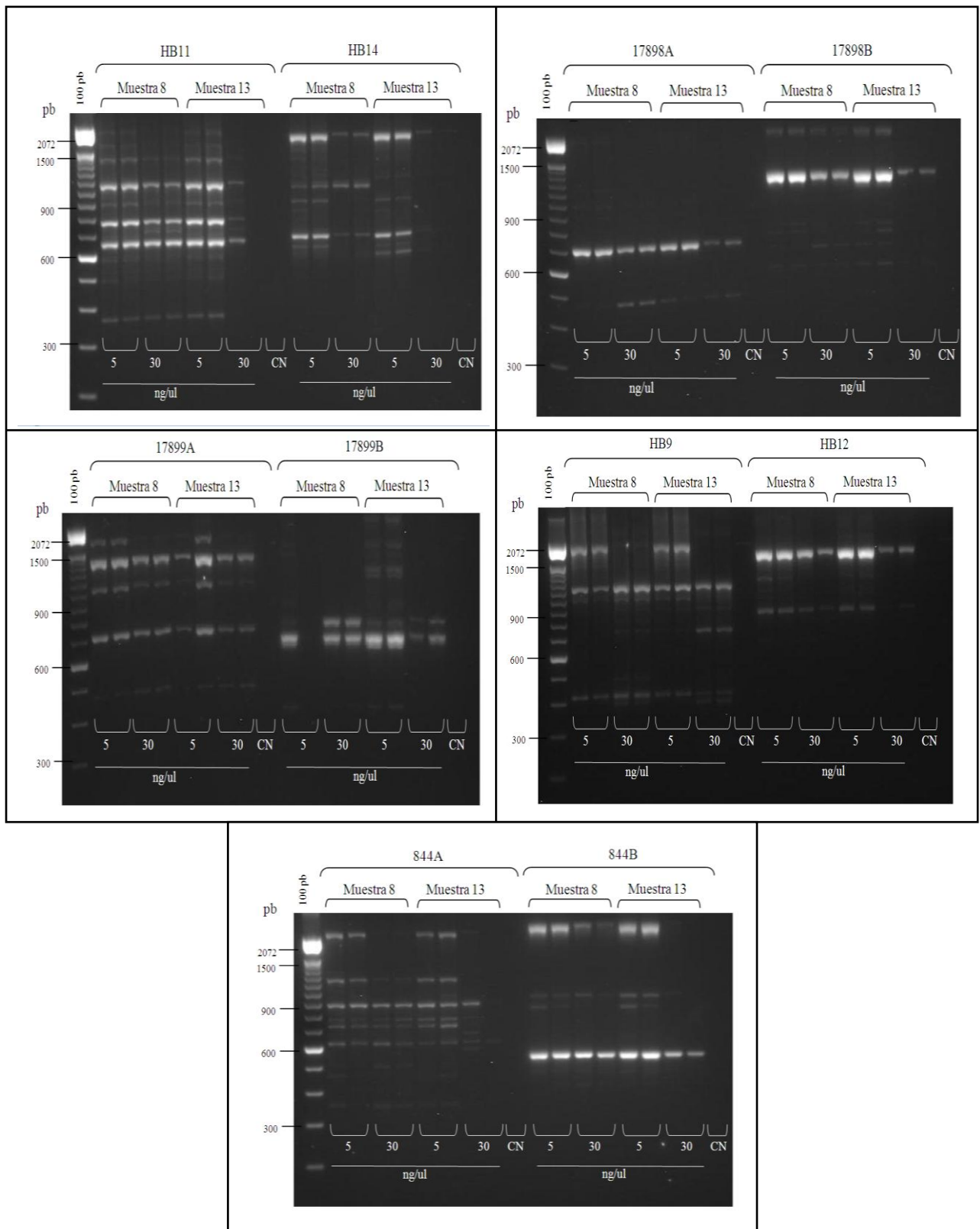


Figura 3.2 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos amplificados con 10 primers. Se indica la concentración de ADN correspondiente a cada muestra y el número de pares de bases del marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®. El control negativo se indica como CN.

De acuerdo a la Figura 3.2 se realizó el conteo y el análisis de los fragmentos de ADN amplificados que presentaron mayor intensidad. Los 6 primers seleccionados debido a que mostraron mayor número de bandas bien definidas fueron 17899A, 17899B, HB9, HB11, HB14 y 844A (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Número de fragmentos de ADN amplificados usando primers ISSRs a partir de muestras a concentración de ADN de 5 y 30 ng/ul.

[ADN] ng/ul	Primers ISSRs										Número de bandas
	17898A	17898B	17899A	17899B	HB9	HB12	HB11	HB14	844A	844B	
5	2	3	5	5	5	4	10	8	9	4	58
30	2	3	4	2	6	2	7	4	7	3	42
Número de bandas	4	6	9	7	11	6	17	12	16	7	

3.2.2 Optimización de la Técnica de PCR

Para establecer las condiciones adecuadas de PCR se llevaron a cabo distintos ensayos para optimizar: concentración de ADN, concentración de cloruro de magnesio, temperatura de alineamiento y número de ciclos.

3.2.2.1 Concentración de ADN

Para determinar la concentración de ADN óptima se tomaron en cuenta los resultados obtenidos en geles de agarosa y fluorometría. Se realizó un ensayo de PCR con soluciones de ADN de las muestras 8 y 13 a diferentes concentraciones: 2.5, 5 y 10 ng/ul para identificar la mejor concentración a emplear.

Se observa en la Figura 3.3 que el mayor número de bandas definidas fueron amplificadas a una concentración de 10 ng/ul en la muestra 8 y a 5 ng/ul en la muestra 13, por lo que se resuelve trabajar a la concentración de 5 ng/ul, pues se ha comprobado que en la mayoría de ensayos se obtienen buenos resultados, además de limitar el uso de solución de ADN.

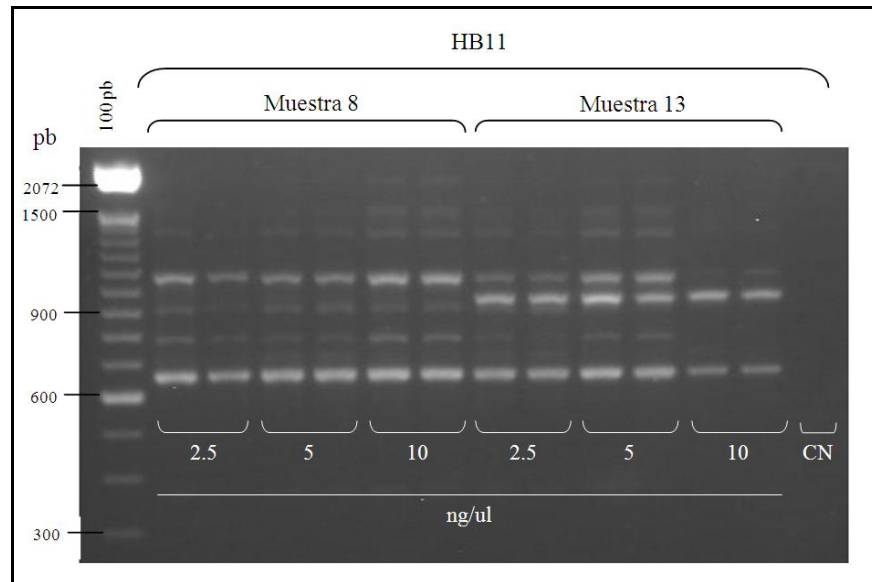


Figura 3.3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos amplificados en el ensayo de concentración de ADN. Se utilizaron las muestras 8 y 13 a concentraciones de 2.5, 5 y 10 ng/ul y el marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®. El control negativo se muestra como CN.

3.2.2.2 Concentración de MgCl₂

En la determinación de la concentración de MgCl₂ se utilizaron los primers 17898A y 17898B y soluciones de ADN a una concentración de 5 ng/ul. En la Tabla 3.3 se muestran las concentraciones de reactivos de PCR con las que se trabajó. Para el primer 17898A se utilizó concentraciones de MgCl₂ de 1.5, 1.8 y 2.1 mM y para el primer 17898B se usó concentraciones de MgCl₂ de 1.7, 2.0 y 2.3 mM.

Tabla 3.3 Volúmenes de reactivos para una reacción de PCR de 25 μ l variando la concentración de $MgCl_2$ en un rango de 0.3 mM para el primer 17898A y 17899B.

Reactivo	Volumen (μ l) para una reacción de PCR de 25 μ l					
	Primer 17898A			Primer 17898B		
	[$MgCl_2$]=1.5 mM	[$MgCl_2$]=1.8 mM	[$MgCl_2$]=2.1 mM	[$MgCl_2$]=1.7 mM	[$MgCl_2$]=2 mM	[$MgCl_2$]=2.3 mM
Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
$MgCl_2$	0.75	0.9	1.05	0.85	1	1.15
dNTP's	2	2	2	2	2	2
Primer	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Taq-polimerasa	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
H ₂ O	17.3	17.15	17	17.2	17.05	16.9
ADN	2	2	2	2	2	2

En la Figura 3.4 se observan las bandas resultantes del ensayo de concentración de $MgCl_2$. Las variaciones de concentración de $MgCl_2$ (1.5, 1.8 y 2.1 mM) para el primer 17898A mostraron perfiles de bandas muy similares.

Las variaciones de concentración de $MgCl_2$ de 2 y de 2.3 mM correspondientes al primer 17898B amplificaron productos de similar intensidad, sin embargo se puede observar que para la concentración de 1.7 mM no se obtuvo ningún producto amplificado. Con estos resultados se determinó que se utilizará la concentración de $MgCl_2$ de 2 mM para los primers 17899A, HB14 y 844A y la concentración de 1.8 mM para los primers 17899B, HB9 y HB11, condiciones optimizadas en investigaciones anteriores (Ochoa *et al.*, 2008).

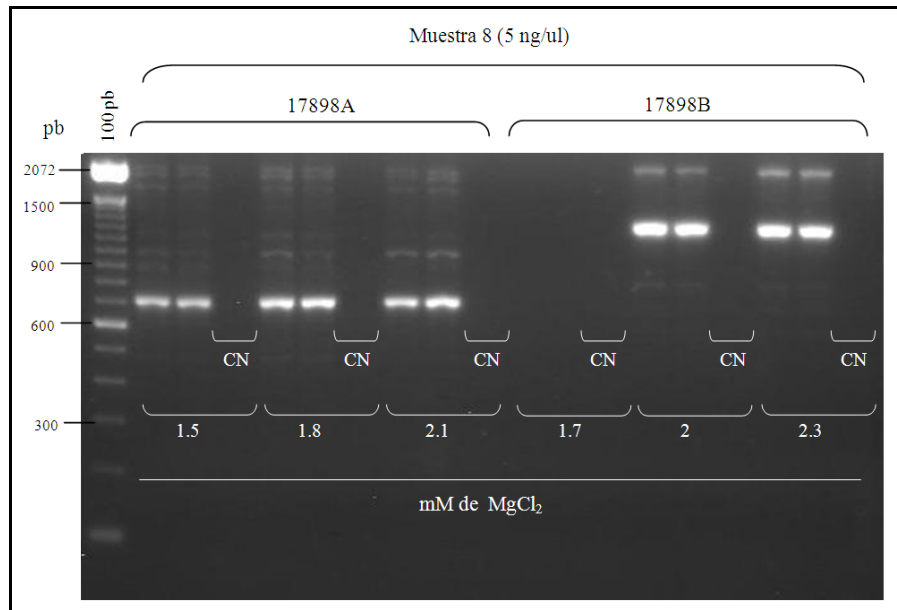


Figura 3.4 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos amplificados en el ensayo de concentración de MgCl₂ con el primer 17898A y 17898B. Se utilizó la muestra 8 a concentración 5 ng/ul y el marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®. El control negativo de los distintos ensayos se muestra como CN.

3.2.2.3 Temperatura de alineamiento

En el ensayo para determinar la temperatura de alineamiento se utilizó el primer 844A y una solución de ADN a concentración de 5 ng/ul. Según los datos para este primer mostrados en la Tabla 2.6 (*Materiales y métodos*, ver apartado 2.8), la temperatura de alineamiento es de 54 °C. Se realizó entonces el ensayo con un rango de variación de 4 °C en la temperatura de alineamiento: 46 °C, 50 °C, 54 °C, 58 °C y 62 °C.

En la Figura 3.5 se puede observar que los productos obtenidos a distintas temperaturas de alineamiento mostraron diferencias en el número de bandas y su concentración. La temperatura de alineamiento a la que se amplificaron mejor los fragmentos de ADN con el primer 844A es a 54 °C, temperatura establecida anteriormente (Ochoa *et al.*, 2008). A 50 °C se obtuvo resultados similares aunque las bandas son menos definidas. A 46 °C y 58 °C el patrón de bandas es bastante distinto

mostrando un bajo número de bandas. A 62 °C no existió ningún producto amplificado. En base a estos resultados se utilizará la temperatura de alineamiento indicada en la Tabla 2.6 (*Materiales y métodos*, ver apartado 2.8) para los 6 primers anteriormente seleccionados.

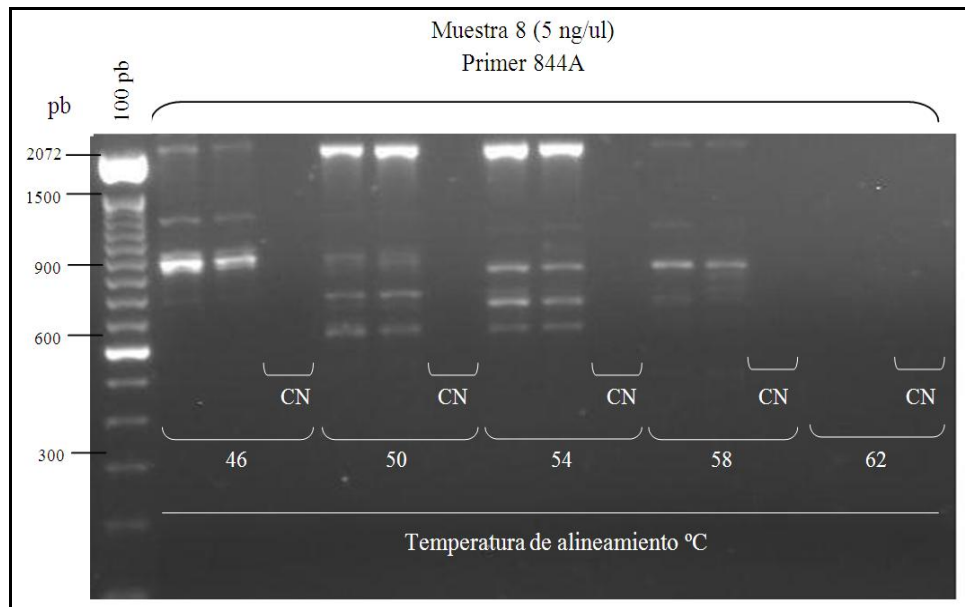


Figura 3.5 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos amplificados en el ensayo de temperatura de alineamiento con el primer 844A. Se utilizó la muestra 8 a concentración 5 ng/ul y el marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®. El control negativo de los distintos ensayos se muestra como CN.

3.2.2.4 Número de ciclos

En el ensayo para determinar el número de ciclos se utilizó el primer 844A y una solución de ADN a una concentración de 5 ng/ul. Los datos mostrados para todos los primers en la Tabla 2.6 (*Materiales y métodos*, ver apartado 2.8) indican que el número de ciclos es 40. Se realizaron cuatro ensayos con un incremento en el número de ciclos (40, 45, 50 y 60).

La Figura 3.6 muestra diferencias en la intensidad y en el número de bandas a diferentes números de ciclos en la PCR. Los productos obtenidos a 40 y 45 ciclos

muestran resultados similares. A 50 y a 60 ciclos se muestran mayor número de bandas bastante intensas, a la vez se observan productos inespecíficos que no constan en ambas dupletas. En base a los resultados obtenidos y tomando en cuenta los inconvenientes de utilizar un tiempo de PCR mayor (Dieffenbach & Dveksler, 2003) se determinó que el número de ciclos a utilizarse será de 40.

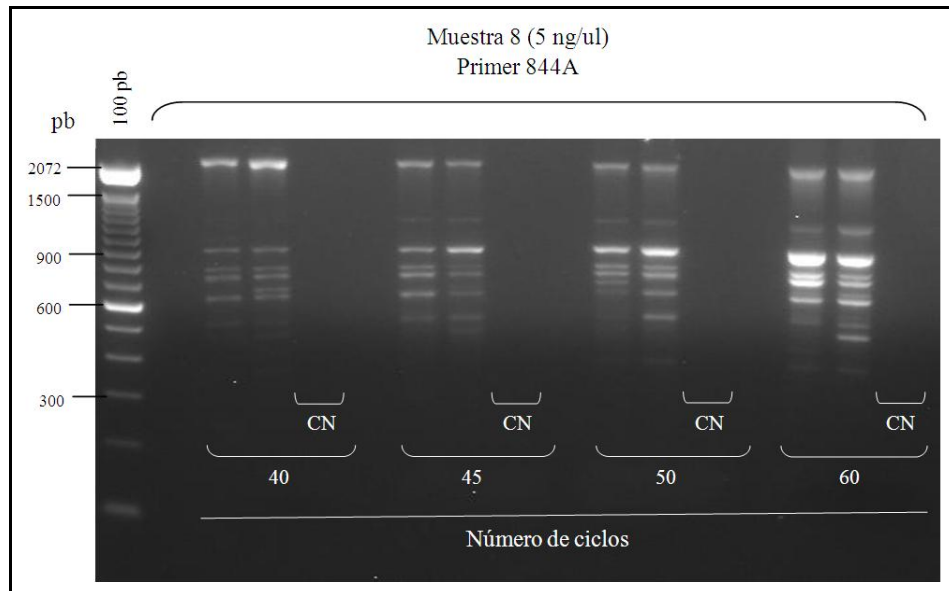


Figura 3.6 Electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de productos amplificados en el ensayo de número de ciclos con el primer 844A. Se utilizó la muestra 8 a concentración 5 ng/ul y el marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®. El control negativo de los distintos ensayos se muestra como CN.

3.2.3 Amplificación de fragmentos de ADN de todos los individuos

Luego de haber comprobado las condiciones de PCR descritas en la Tabla 2.5 y Tabla 2.6 (*Materiales y métodos*, ver apartado 2.8) se procedió a la amplificación de fragmentos de ADN con los 6 primers seleccionados utilizando las 45 soluciones de ADN obtenidas de 15 individuos de cada población de *Jatropha curcas* L. En toda la investigación fue necesaria la realización de aproximadamente 650 reacciones de PCR. Los productos amplificados con el primer HB11 y con el primer 17899A de todos los individuos se muestran en la Figura 3.7 y en la Figura 3.8.

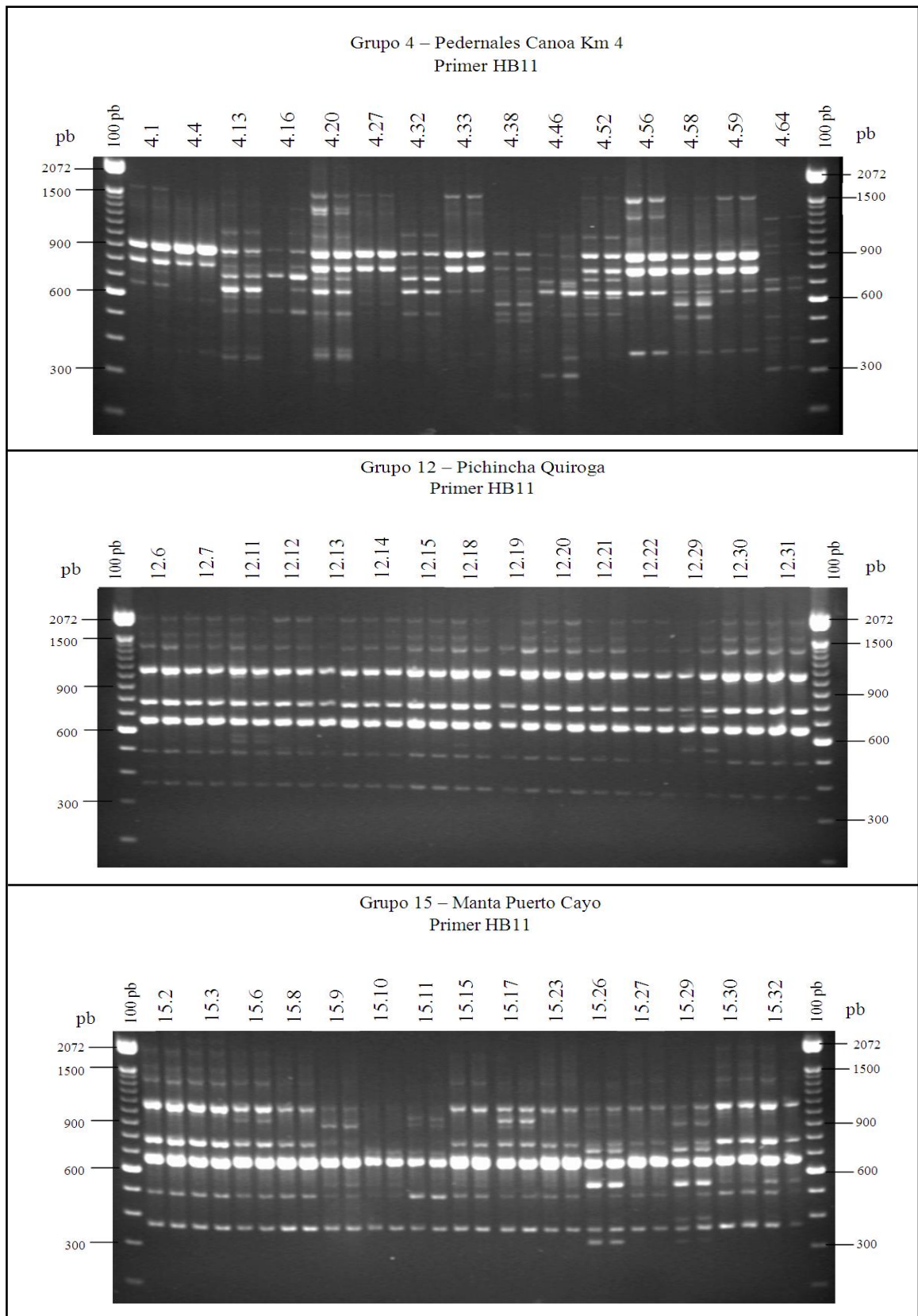


Figura 3.7 Electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de productos amplificados con el primer HB11 de las 3 poblaciones de *Jatropha curcas* L. analizadas. A cada extremo se indica el peso de las bandas del marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®.

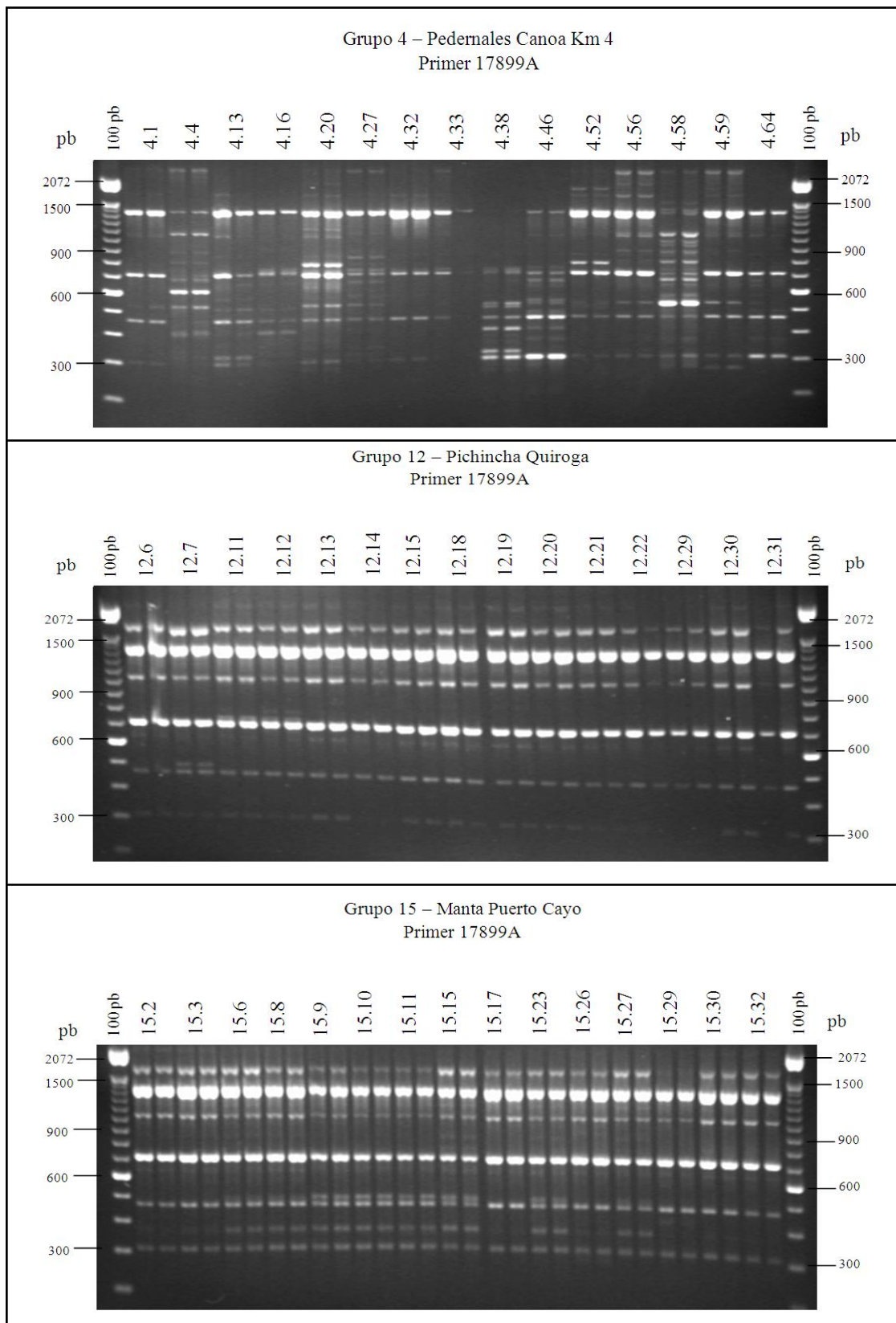


Figura 3.8 Electroforesis en gels de agarosa al 1.5% de productos amplificados con el primer 17899A de las 3 poblaciones de *Jatropha curcas* L. analizadas. A cada extremo se indica el peso de las bandas del marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®.

En la Figura 3.7 y en la Figura 3.8 se observa que los individuos del grupo 4 (Pedernales-Canoa Km 4) muestran patrones de bandas amplificadas muy diferentes dentro del grupo y comparados con los individuos del grupo 12 (Pichincha- Quiroga) y del grupo 15 (Manta-Puerto Cayo). Se observa también que dentro del grupo 12 y del grupo 15 los individuos presentan mucha similitud entre ellos.

La notable diferencia del grupo 4 (Pedernales-Canoa Km 4) y la similitud entre el grupo 12 (Pichincha- Quiroga) y el grupo 15 (Manta-Puerto Cayo) fueron observadas en todos los ensayos con los 6 primers utilizados. Además, en todos los geles analizados se observó que las bandas tienen un tamaño que van desde 2943.66 pb hasta 237.64 bp (Figura 3.7 y Figura 3.8).

Las dupletas de las muestras presentaron bandas iguales para la gran mayoría de ensayos, sin embargo pocas dupletas amplificadas con el primer 844A específicamente, presentaron diferencias. En la Figura 3.9 se muestran con una flecha a los individuos 4.4, 4.16, 4.27 y 4.33, los cuales tienen bandas distintas en las dupletas.

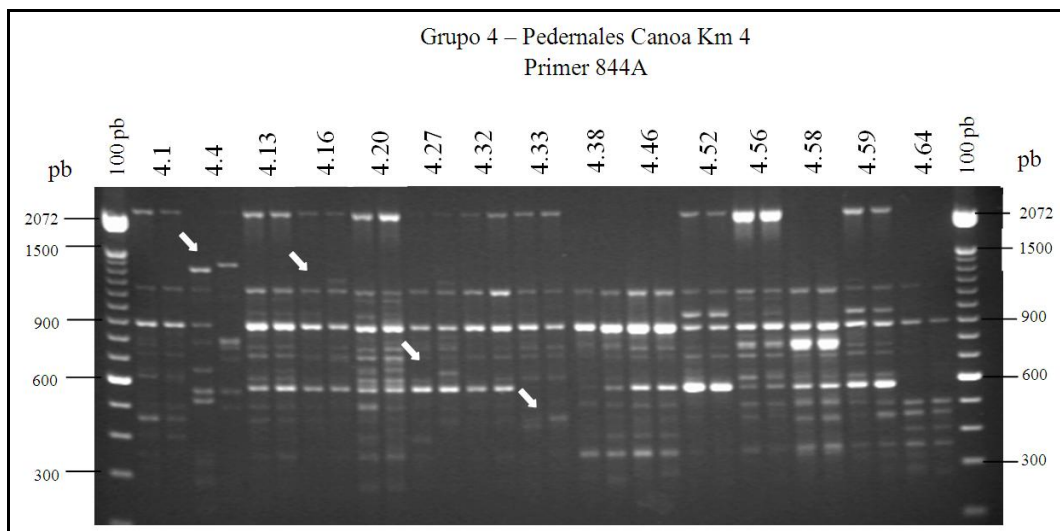


Figura 3.9 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos amplificados con el primer 844A del grupo 4 (Pedernales Canoa Km 4). A cada extremo se indica el peso de las bandas del marcador molecular TrackIt 100 bp INVITROGEN®. La flecha blanca indica aquellas bandas que no son iguales en las dupletas.

Las herramientas del programa Dolphin-View Band Tool permitieron realizar el registro de bandas visualizadas que presentaban extrema tenuidad y proximidad entre ellas. Posteriormente, se registró la presencia (1) o ausencia (0) de las bandas y se construyó una matriz binaria en Microsoft Office Excel 2007.

3.4 Análisis de datos

3.4.1 Características y atributos de los primers ISSRs

En esta investigación se utilizaron un total de 6 primers ISSRs para amplificar fragmentos de ADN de 45 individuos de *Jatropha curcas* L. En la Tabla 3.4 se muestra que dichos primers generaron un total de 122 bandas, de las cuales 120 (98.36%) son polimórficas y solamente 2 (1.46%) son monomórficas. Además, se observa que todos los primers, a excepción del primer 844A tienen un porcentaje de polimorfismo del 100%.

Tabla 3.4 Grado de polimorfismo y contenido de información de los 6 primers ISSRs utilizados.

No.	Primer ISSR	NTB	NBM	NBP	%BP	NBU	NBR	NBC	NBS
1	17899A	21	0	21	100	13	0	2	6
2	17899B	21	0	21	100	6	1	10	4
3	HB9	17	0	17	100	6	2	5	4
4	HB11	21	0	21	100	7	2	6	6
5	HB14	21	0	21	100	8	1	9	3
6	844A	21	2	19	90.47	6	2	6	5
Total		122	2	120	98.36	46	8	38	28
Porcentaje (%)		100	1.46	98.36		38.33	6.67	31.67	23.33
Mínimo		17	0	17	90.47	6	0	2	3
Máximo		21	2	21	100	13	2	10	6
Promedio		20.33	0.33	20	98.41	7.66	1.33	6.33	4.66

NTB: Número total de bandas
 NBM: Número de bandas monomórficas
 NBP: Número de bandas polimórficas
 %BP: Porcentaje de bandas polimórficas
 NBU: Número de bandas únicas
 NBR: Número de bandas raras
 NBC: Número de bandas compartidas
 NBS: Número de bandas similares

En la Tabla 3.4 se observa un total de 46 bandas únicas (38.33% de NBP) con un promedio de 7.66 bandas por primer. El mayor número de bandas únicas fue 13 detectado por el primer 17899A y el menor número de bandas únicas fue 6 detectado por los primers 17899B, HB9 y 844A. En el análisis de bandas realizado (tabla no mostrada) se observó que existen 36 bandas únicas para el grupo 4 (Pedernales - Canoa Km 4), mientras que para el grupo 12 (Pichincha - Quiroga) y para el grupo 15 (Manta Puerto Cayo) solamente se observaron 5, respectivamente.

Se pudo identificar en la Tabla 3.4 apenas 8 bandas raras (6.67% de NBP) con un promedio de 1.33 bandas por primer. Una o dos bandas raras fueron amplificadas por todos los primers, a excepción del primer 17899A que no detectó ninguna. El número de bandas compartidas es de 38 (31.67% de NBP) con un promedio de 6.33 bandas por primer. El primer 17899B amplificó 10 bandas compartidas, siendo éste el mayor número mientras que el primer 17899A amplificó solamente 2. Un total de 28 bandas similares (23.33% de NBP) fueron observadas, mostrando un promedio de 4.66 bandas por primer. El primer 17899A y el primer HB11 detectaron el mayor número de bandas similares que fue 6. El primer HB14 al contrario, detectó el menor número de bandas similares que fue 3 (Tabla 3.4).

El poder de resolución (RP) es la capacidad que tiene cada primer de dividir a todos los genotipos en dos grupos, esto nos permite conocer el potencial discriminatorio que posee cada primer. Para conocer el RP se calculó el índice de banda (Ib) y se realizó la sumatoria respectiva. En la Tabla 3.5 se indica que el primer 17899B posee un valor de RP de 8, mientras que el primer 17899A posee un valor de RP de 4.08. Estos resultados indican que el primer 17899B fue el más útil en la separación de genotipos.

Tabla 3.5 Valores de resolución de primer (RP) para los 6 primers ISSRs utilizados.

No.	Primer ISSR	Resolución de primer (RP)
1	17899A	4.08
2	17899B	8
3	HB9	4.71
4	HB11	6.62
5	HB14	7.06
6	844A	5.95
Mínimo		4.08
Máximo		8
Promedio		6.07

Con los resultados correspondientes al primer 17899A que mostró el menor RP y al primer 17899B que mostró el mayor RP, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para cada uno, con el fin de observar gráficamente su capacidad para agrupar a los individuos. En la Figura 3.10 se muestra el ACP con el primer 17899A.

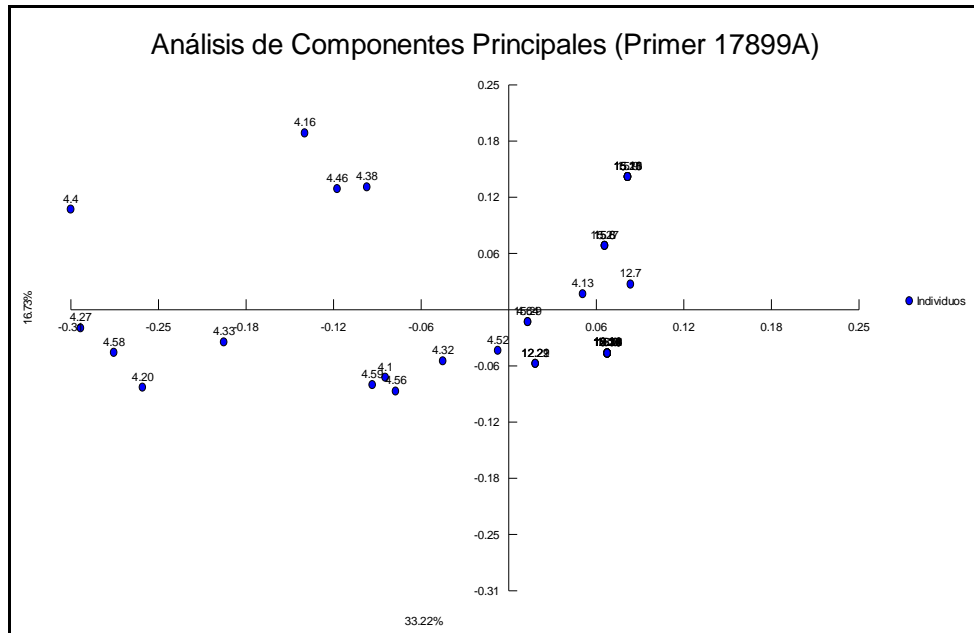


Figura 3.10 ACP generado con el primer 17899A (menor RP) en el programa MVSP (Multi-Variate Statistical Package) versión 3.1.

En la Figura 3.11 se muestra el ACP correspondiente a los resultados obtenidos con el primer 17899B.

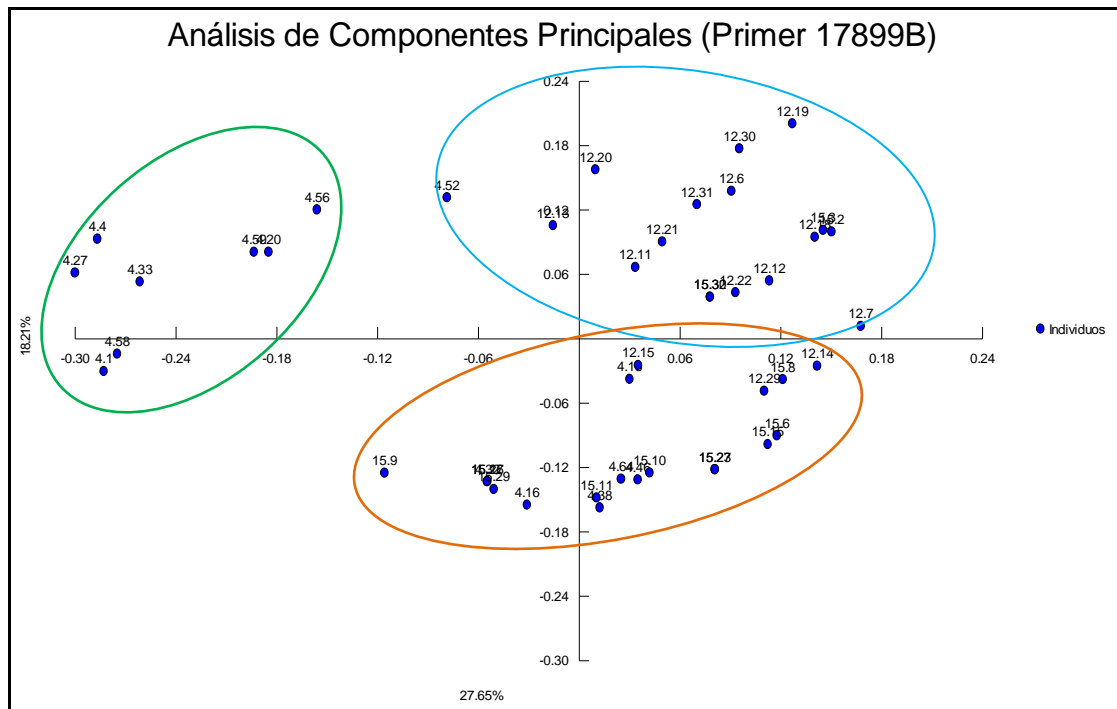


Figura 3.11 ACP generado con el primer 17899B (mayor RP) en el programa MVSP (Multi-Variate Statistical Package) versión 3.1. El círculo verde contiene a la mayoría de individuos del grupo 4, el círculo celeste del grupo 12 y el círculo naranja del grupo 15.

En la Figura 3.10 se observa que la distribución que muestran los individuos con el primer 17899A es menos definida que la distribución mostrada con el primer 17899B en la Figura 3.11, en donde se puede apreciar una estructura que agrupa a los individuos del grupo 12 (círculo celeste), a los individuos del grupo 15 (círculo naranja), y a los individuos del grupo 4 (círculo verde). De esta manera, se reitera la significativa capacidad discriminadora del primer 17899B, el cual posee el mayor valor de RP 8.

3.4.2 Distancias genéticas

El coeficiente de Dice permite analizar los individuos que poseen una mayor similitud entre sí, por lo que fue utilizado para analizar la matriz binaria construida anteriormente. De éste análisis se obtuvo una matriz cuadrática de similitud donde se muestran las medidas de distancia. A partir de esta matriz se calcularon los valores de disimilitud o variabilidad.

En la Tabla 3.6 se indican los valores de similitud y de variabilidad entre cada par de individuos de las tres poblaciones de *Jatropha curcas* L. de la provincia de Manabí. El mayor valor de similitud fue de 0.98 correspondiente a la relación entre los individuos 12.18 y 12.19 del grupo 12 (Pichincha-Quiroga), y entre los individuos 15.2 y 15.3 del grupo 15 (Manta-Puerto Cayo). Mientras que el menor valor de similitud fue de 0.32, el cual se registró entre los individuos 4.4 y 4.64, y entre los individuos 4.4 y 4.27 del grupo 4 (Pedernales-Canoa Km 4).

Además, se puede observar en la Tabla 3.6 que todos los valores bajos de similitud que van desde 0.3 a 0.6 (color celeste) se encuentran entre los individuos del grupo 4 (Pedernales-Canoa Km 4) con respecto a los demás individuos. En cambio, los valores altos de similitud que van desde 0.81 a 1 (color amarillo) se encuentran entre los individuos del grupo 12 (Pichincha-Quiroga) y del grupo 15 (Manta-Puerto Cayo). Los valores medios de similitud que van desde 0.61 a 0.8 (color verde) están distribuidos entre todos los individuos de los 3 grupos de *Jatropha curcas* L.

Tabla 3.6 Matriz de similitud y de variabilidad obtenida con el coeficiente de Dice de todos los individuos de las tres poblaciones de *Jatropha curcas* L. Los valores que se encuentran debajo de la diagonal corresponden a la similitud, mientras que los valores que se encuentran arriba de la diagonal pertenecen a la variabilidad. El color celeste representa a los valores de similitud bajos (0.3-0.6), el color verde a los valores medios (0.61-0.8) y el color amarillo a los valores altos (0.81-1).

Grupos	Grupo 4														Grupo 12										Grupo 15																				
	4.1	4.4	4.13	4.16	4.20	4.27	4.32	4.33	4.38	4.46	4.52	4.56	4.58	4.59	4.64	12.6	12.7	12.11	12.12	12.13	12.14	12.15	12.18	12.19	12.20	12.21	12.22	12.29	12.30	12.31	15.2	15.3	15.6	15.8	15.9	15.10	15.11	15.15	15.17	15.23	15.26	15.27	15.29	15.30	15.32
4.1		0,44	0,41	0,44	0,31	0,32	0,37	0,25	0,53	0,53	0,37	0,35	0,4	0,28	0,56	0,42	0,46	0,44	0,42	0,36	0,42	0,39	0,4	0,4	0,42	0,39	0,4	0,37	0,4	0,41	0,4	0,4	0,45	0,45	0,4	0,47	0,39	0,45	0,37	0,44	0,4	0,43	0,44	0,43	0,42
4.4	0,56		0,58	0,58	0,41	0,34	0,62	0,43	0,56	0,47	0,54	0,43	0,36	0,37	0,68	0,59	0,63	0,61	0,59	0,55	0,63	0,63	0,63	0,61	0,61	0,59	0,61	0,63	0,62	0,61	0,62	0,62	0,62	0,6	0,5	0,6	0,53	0,59	0,56	0,58	0,59	0,62	0,58	0,62	0,62
4.13	0,59	0,42		0,37	0,24	0,51	0,29	0,45	0,45	0,33	0,34	0,34	0,37	0,34	0,44	0,32	0,31	0,29	0,26	0,29	0,29	0,25	0,28	0,28	0,32	0,29	0,3	0,27	0,29	0,27	0,27	0,24	0,27	0,24	0,2	0,33	0,31	0,25	0,23	0,23	0,27	0,29	0,28	0,27	0,26
4.16	0,56	0,42	0,63		0,41	0,45	0,31	0,49	0,5	0,42	0,43	0,52	0,43	0,49	0,57	0,49	0,47	0,55	0,49	0,5	0,49	0,47	0,49	0,51	0,51	0,48	0,46	0,44	0,49	0,5	0,51	0,51	0,49	0,49	0,4	0,49	0,4	0,47	0,45	0,41	0,46	0,49	0,47	0,51	0,53
4.20	0,69	0,59	0,76	0,59		0,32	0,38	0,35	0,49	0,36	0,35	0,28	0,31	0,28	0,53	0,36	0,41	0,39	0,36	0,36	0,4	0,36	0,37	0,35	0,36	0,34	0,37	0,38	0,35	0,36	0,37	0,35	0,41	0,37	0,3	0,46	0,42	0,37	0,32	0,33	0,32	0,37	0,31	0,35	0,35
4.27	0,68	0,66	0,49	0,55	0,68		0,52	0,23	0,49	0,49	0,43	0,35	0,28	0,33	0,68	0,51	0,57	0,52	0,53	0,47	0,53	0,52	0,54	0,52	0,5	0,5	0,51	0,54	0,51	0,52	0,55	0,55	0,56	0,54	0,5	0,58	0,53	0,51	0,47	0,52	0,51	0,58	0,49	0,51	0,52
4.32	0,63	0,38	0,71	0,69	0,62	0,48		0,39	0,45	0,38	0,33	0,47	0,49	0,41	0,43	0,42	0,43	0,38	0,39	0,41	0,38	0,41	0,42	0,44	0,41	0,41	0,36	0,33	0,42	0,43	0,42	0,42	0,43	0,4	0,3	0,38	0,35	0,4	0,32	0,37	0,29	0,37	0,36	0,39	0,44
4.33	0,75	0,57	0,55	0,51	0,65	0,77	0,61		0,53	0,55	0,34	0,24	0,37	0,21	0,61	0,46	0,5	0,45	0,44	0,4	0,46	0,45	0,47	0,46	0,46	0,46	0,42	0,44	0,44	0,45	0,47	0,47	0,45	0,42	0,4	0,46	0,38	0,4	0,41	0,39	0,42	0,4	0,41	0,42	0,43
4.38	0,47	0,44	0,55	0,5	0,51	0,51	0,55	0,47		0,31	0,53	0,49	0,42	0,46	0,52	0,53	0,54	0,49	0,5	0,51	0,5	0,54	0,53	0,54	0,54	0,55	0,53	0,53	0,55	0,54	0,55	0,53	0,51	0,48	0,4	0,42	0,44	0,41	0,47	0,42	0,43	0,45	0,41	0,47	0,51
4.46	0,47	0,53	0,67	0,58	0,64	0,51	0,62	0,45	0,69		0,48	0,45	0,35	0,42	0,37	0,43	0,44	0,44	0,4	0,44	0,4	0,42	0,44	0,45	0,47	0,42	0,43	0,41	0,45	0,42	0,43	0,43	0,42	0,39	0,4	0,37	0,37	0,39	0,37	0,38	0,34	0,39	0,31	0,41	0,44
4.52	0,63	0,46	0,66	0,57	0,65	0,57	0,67	0,66	0,47	0,52		0,34	0,5	0,32	0,51	0,37	0,4	0,38	0,37	0,36	0,41	0,4	0,4	0,39	0,39	0,38	0,39	0,37	0,4	0,38	0,42	0,42	0,43	0,42	0,4	0,54	0,48	0,43	0,41	0,39	0,4	0,44	0,45	0,44	0,43
4.56	0,65	0,57	0,66	0,48	0,72	0,65	0,53	0,76	0,51	0,55	0,66		0,26	0,16	0,56	0,36	0,37	0,35	0,32	0,31	0,37	0,35	0,37	0,36	0,36	0,37	0,34	0,38	0,35	0,35	0,38	0,37	0,37	0,37	0,3	0,42	0,37	0,35	0,33	0,29	0,35	0,31	0,36	0,31	0,32
4.58	0,6	0,64	0,63	0,57	0,69	0,72	0,51	0,63	0,58	0,65	0,5	0,74		0,28	0,58	0,48	0,49	0,43	0,44	0,43	0,46	0,47	0,46	0,47	0,49	0,46	0,51	0,46	0,47	0,48	0,46	0,43	0,46	0,4	0,46	0,43	0,43	0,39	0,42	0,42	0,46	0,39	0,38	0,41	
4.59	0,72	0,63	0,66	0,51	0,72	0,67	0,59	0,79	0,54	0,58	0,68	0,84	0,72		0,51	0,34	0,38	0,38	0,32	0,29	0,36	0,35	0,35	0,34	0,36	0,36	0,34	0,36	0,35	0,33	0,35	0,35	0,37	0,3	0,38	0,31	0,35	0,29	0,31	0,33	0,35	0,36	0,35	0,36	
4.64	0,44	0,32	0,56	0,43	0,47	0,32	0,57	0,39	0,48	0,63	0,49	0,44	0,42	0,49		0,53	0,52	0,54	0,48	0,52	0,48	0,49	0,51	0,53	0,58	0,53	0,51	0,49	0,53	0,49	0,48	0,51	0,49	0,49	0,5	0,48	0,45	0,51	0,42	0,52	0,46	0,48	0,45	0,51	0,52
12.6	0,58	0,41	0,68	0,51	0,64	0,49	0,58	0,54	0,47	0,57	0,63	0,64	0,52	0,68	0,47		0,14	0,17	0,07	0,05	0,08	0,1	0,06	0,08	0,08	0,06	0,11	0,14	0,07	0,09	0,07	0,15	0,16	0,3	0,28	0,33	0,22	0,21	0,21	0,23	0,21	0,3	0,16	0,24	
12.7	0,54	0,37	0,69	0,53	0,59	0,43	0,57	0,5	0,46	0,56	0,6	0,63	0,51	0,62	0,48	0,86		0,19	0,12	0,19	0,12	0,19	0,13	0,15	0,15	0,18	0,16	0,16	0,19	0,2	0,18	0,21	0,25	0,3	0,33	0,26	0,25	0,25	0,27	0,27	0,33	0,23	0,24		
12.11	0,56	0,39	0,71	0,45	0,61	0,48	0,62	0,55	0,51	0,56	0,62	0,65	0,57	0,62	0,46	0,83	0,81		0,14	0,19	0,15	0,21	0,18	0,2	0,13	0,2	0,16	0,18	0,21	0,23	0,2	0,26	0,27	0,2	0,3	0,35	0,26	0,2	0,3	0,25	0,27	0,27	0,18	0,2	
12.12	0,58	0,41	0,74	0,51	0,64	0,47	0,61	0,56	0,5	0,6	0,63	0,68	0,56	0,68	0,52	0,93	0,88	0,86		0,1	0,05	0,1	0,08	0,08	0,13	0,11	0,11	0,11	0,09	0,1	0,14	0,12	0,15	0,18	0,3	0,28	0,33	0,22	0,19	0,21	0,25	0,23	0,27	0,16	0,18
12.13	0,64	0,45	0,71	0,5	0,64	0,53	0,59	0,6	0,49	0,56	0,64	0,69	0,57	0,71	0,48	0,95	0,81	0,81	0,9		0,1	0,09	0,08	0,08	0,1	0,08	0,14	0,16	0,09	0,07	0,11	0,09	0,15	0,15	0,3	0,28	0,33	0,21	0,18	0,21	0,23	0,2	0,31	0,16	0,16
12.14	0,58	0,37	0,71	0,51	0,6	0,47	0,62	0,54	0,5	0,6	0,59	0,63	0,54	0,64	0,52	0,92	0,88	0,85	0,95	0,9		0,1	0,06	0,09	0,14	0,12	0,09	0,09	0,1	0,1	0,12	0,1	0,16	0,14	0,2	0,24	0,3	0,18	0,14	0,2	0,24	0,2	0,26	0,15	0,17
12.15	0,61	0,37	0,75	0,53	0,64	0,48	0,59	0,55	0,46	0,58	0,6	0,65	0,53	0,65	0,51	0,9	0,81	0,79	0,9	0,91	0,9		0,08	0,08	0,13	0,06	0,11	0,14	0,09	0,07	0,14	0,11	0,17	0,18	0,3	0,33	0,21	0,16	0,19	0,25	0,18	0,27	0,16	0,16	
12.18	0,6	0,37	0,72	0,51	0,63	0,46	0,58	0,53	0,47	0,56	0,6	0,63	0,54	0,65	0,49	0,94	0,87	0,82	0,92	0,92	0,94	0,92		0,02	0,09	0,07	0,1	0,12	0,06	0,08	0,08	0,06	0,16	0,17	0,3	0,29	0,34	0,2	0,17	0,2	0,26	0,2	0,28	0,17	0,15
12.19	0,6	0,39	0,72	0,49	0,65	0,48	0,56	0,54	0,46	0,55	0,61	0,64	0,53	0,66	0,47	0,94	0,85	0,8	0,92	0,92	0,91	0,92	0,98		0,09	0,07	0,12	0,15	0,03	0,08	0,08	0,06	0,18	0,16	0,3	0,31	0,36	0,22	0,19	0,22	0,28	0,21	0,3	0,17	0,14
12.20	0,58	0,39	0,68	0,49	0,64	0,5	0,59	0,54	0,46	0,53	0,61	0,64	0,53	0,64	0,42	0,92	0,85	0,87	0,87	0,9	0,86	0,87	0,91	0,91		0,12	0,15	0,17	0,08	0,13	0,17	0,15	0,22	0,23	0,3	0,33	0,36	0,24	0,19	0,24	0,26	0,26	0,3	0,21	0,21
12.21	0,61	0,41	0,71	0,52	0,66	0,5	0,59	0,54	0,45	0,58	0,62	0,63	0,51	0,64	0,47	0,94	0,82	0,8	0,89	0,92	0,88	0,94	0,93	0,93	0,88		0,13	0,15	0,11	0,06	0,13	0,11	0,19	0,2	0,3	0,32	0,37	0,23	0,2	0,23	0,27	0,22	0,29	0,2	0,17
12.22	0,6	0,39	0,7	0,54	0,63	0,49	0,64	0,58	0,47	0,57	0,61	0,66	0,54	0,66	0,49	0,89	0,84	0,84	0,89	0,86	0,91	0,89	0,9	0,88	0,85	0,87		0,08	0,11	0,14	0,16	0,13	0,21	0,2	0,2	0,28	0,31	0,24	0,18	0,21	0,23	0,2	0,29	0,16	0,2
12.29	0,63	0,37	0,73	0,56	0,62	0,46	0,67	0,56	0,47	0,59	0,63	0,62	0,49	0,64	0,51	0,86	0,84	0,84	0,89	0,84	0,91	0,86	0,88	0,85	0,83	0,85	0,92		0,13	0,16	0,16	0,16	0,19	0,22	0,3	0,31	0,31	0,26	0,21	0,23	0,23	0,23	0,29	0,2	0,22
12.30	0,6	0,38	0,71	0,51	0,65	0,49	0,58	0,56	0,45	0,55	0,6	0,65	0,54	0,65	0,47	0,93	0,84	0,82	0,91	0,91	0,9	0,91	0,94	0,97	0,92	0,89	0,89	0,8																	

A partir de la matriz cuadrática mostrada anteriormente en la Tabla 3.6 se promediaron los valores de similaridad y de variabilidad para cada una de las tres poblaciones y entre todas las poblaciones de *Jatropha curcas* L. En la Figura 3.12 se puede observar que la mayor medida de variabilidad genética es de 0.33 y se encuentra en la población de Pedernales-Canoa Km 4 (grupo 4) mientras que la menor medida de variabilidad genética es de 0.09 y corresponde a la población de Pichincha-Quiroga (grupo 12). De esta manera se obtuvo una medida de variabilidad genética total de 0.28 entre los individuos de las poblaciones Pedernales-Canoa Km 4, Pichincha-Quiroga y Manta-Puerto Cayo.

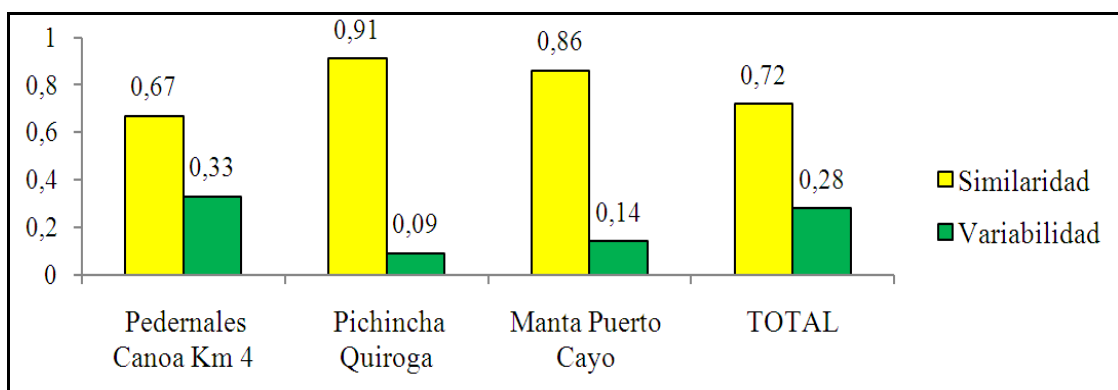


Figura 3.12 Representación gráfica de los promedios de similaridad y variabilidad dentro cada población y entre todas las poblaciones (Total) de *Jatropha curcas* L.

3.4.3 Agrupamientos

El análisis UPGMA agrupa a los individuos en forma aglomerativa y jerárquica en base a promedios de similaridad, como resultado de ello se obtiene una representación gráfica o dendograma, mediante el cual se puede observar la formación de grupos a distintos valores de similaridad.

En el dendograma del análisis UPGMA mostrado en la Figura 3.13 se observa que a partir del promedio de similaridad de 0.73 se dividen dos ramas, la rama superior

que contiene a individuos del grupo 15 (color naranja) y la rama inferior que a la vez se divide en el valor de similaridad de 0.81, aglomerando a todos los individuos del grupo 12 (color celeste) y a ciertos individuos del grupo 15. De esto se puede afirmar que el grupo 15 se encuentra muy relacionado con el grupo 12, pues forman un conjunto definido. Al contrario del grupo 4 (color verde) que se encuentra dividido en dos partes, la primera que se forma por los individuos 4.64, 4.46, 4.38, 4.52, 4.32 y 4.16, los cuales están cerca al grupo 15 y la segunda que contiene a los individuos 4.20, 4.13, 4.4, 4.58, 4.27, 4.59, 4.56, 4.33 y 4.1, los mismos que se localizan cerca del grupo 12.

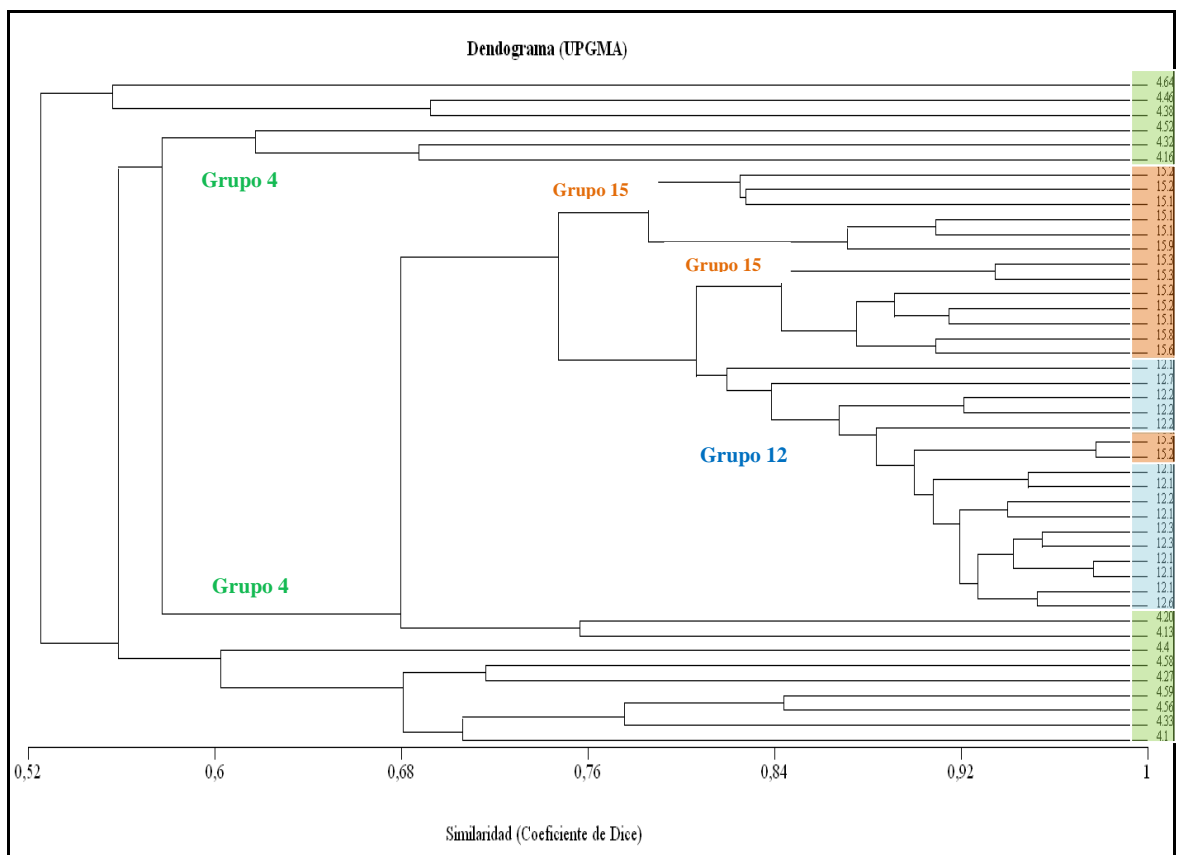


Figura 3.13 Dendrograma obtenido con el agrupamiento UPGMA utilizando las similaridades calculadas mediante el coeficiente de Dice. Los individuos del grupo 4 están representados de color verde, aquellos del grupo 12 de color celeste y aquellos del grupo 15 de color naranja.

El análisis Njoin o del vecino más cercano permite determinar a los individuos que se encuentran más y menos relacionados entre sí dependiendo de sus similitudes. La cercanía de dos individuos y el hecho de que se formen de una misma rama indican la similitud entre ellos. La Figura 3.14 muestra el dendograma obtenido de este análisis. Se observa que entre los individuos 15.10 y 15.11 existe la mayor relación de similitud de las muestras analizadas. Estos individuos están a la vez relacionados en un menor grado de similitud con el individuo 15.9, a este nivel de similitud se encuentran relacionados también los individuos 12.18, 12.19, 12.30, 12.31, 12.11 y 12.20.

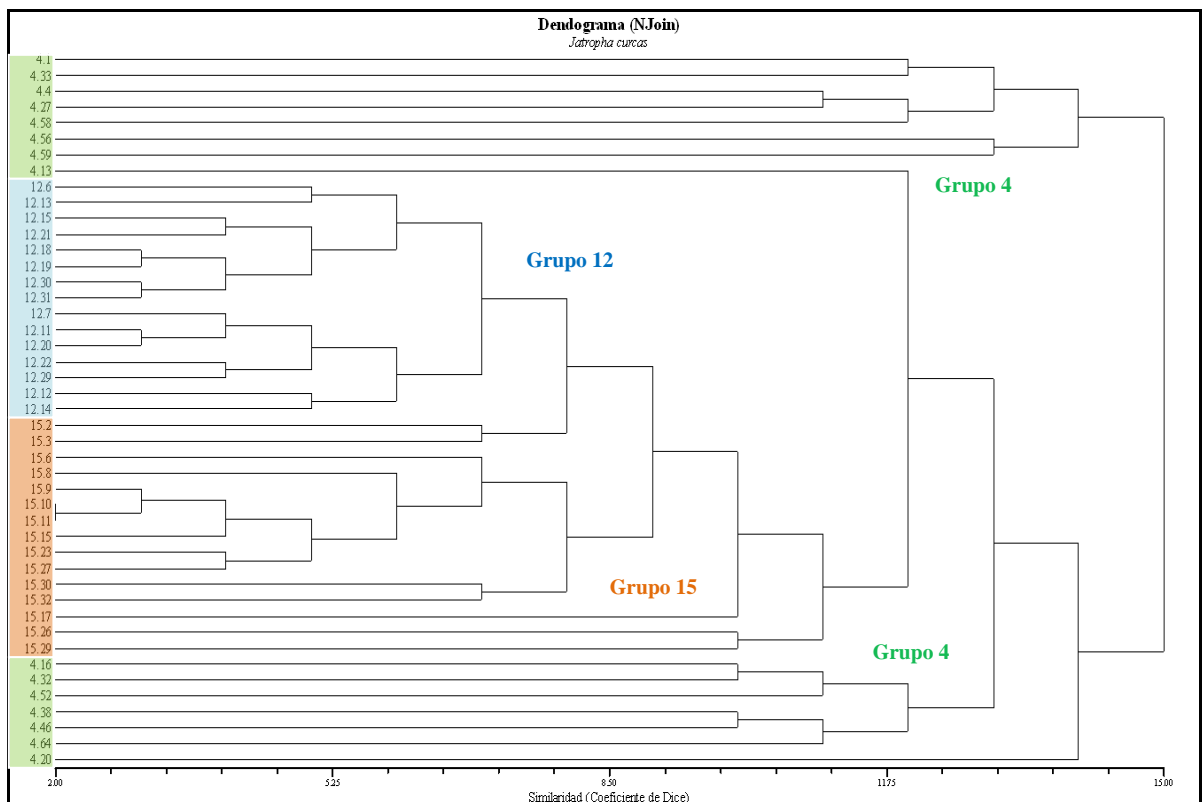


Figura 3.14 Dendograma obtenido con el agrupamiento Njoin o del vecino más cercano utilizando las similitudes calculadas mediante el coeficiente de Dice. Los individuos del grupo 4 están representados de color verde, aquellos del grupo 12 de color celeste y aquellos del grupo 15 de color naranja.

Este dendograma nos permite encontrar a los individuos genéticamente más distantes. En el caso del grupo 4 (Pedernales-Canoa Km 4) los individuos más distantes son 4.1 y 4.20, en el grupo 12 (Pichincha-Quiroga) son 12.6 y 12.14 y en el grupo 15

(Manta-Puerto Cayo) son 15.2 y 15.29. De esta manera es posible determinar los vecinos más cercanos o lejanos de cada uno de los individuos.

En general, los grupos principales de individuos se mantienen tanto el dendograma UPGMA (Figura 3.13) como en el dendograma NJoin (Figura 3.14), mientras que las relaciones internas de los individuos varían considerablemente. Esto posiblemente se debe a que el método UPGMA reduce consecutivamente los promedios de similitud, por lo que solamente permite observar las relaciones entre grupos, en cambio el método NJoin si permite establecer relaciones entre individuos.

Además, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) a partir de las similitudes obtenidas con el coeficiente de Dice. El ACP permite conocer la agrupación que tienen los individuos en un espacio bidimensional. En la Figura 3.15 se observa la formación de 4 agrupaciones definidas. La primera contiene a todos los individuos del grupo 12 y a dos individuos del grupo 15 (círculo naranja). La segunda agrupa a todos los individuos del grupo 15 y a un individuo del grupo 4 (círculo celeste). La tercera y la cuarta agrupación (círculos verdes) contienen a 5 y a 9 individuos del grupo 4, respectivamente. El primer componente principal muestra la distribución de los individuos con un porcentaje de variación del 23.74% mientras que el segundo componente muestra en un 10.92%.

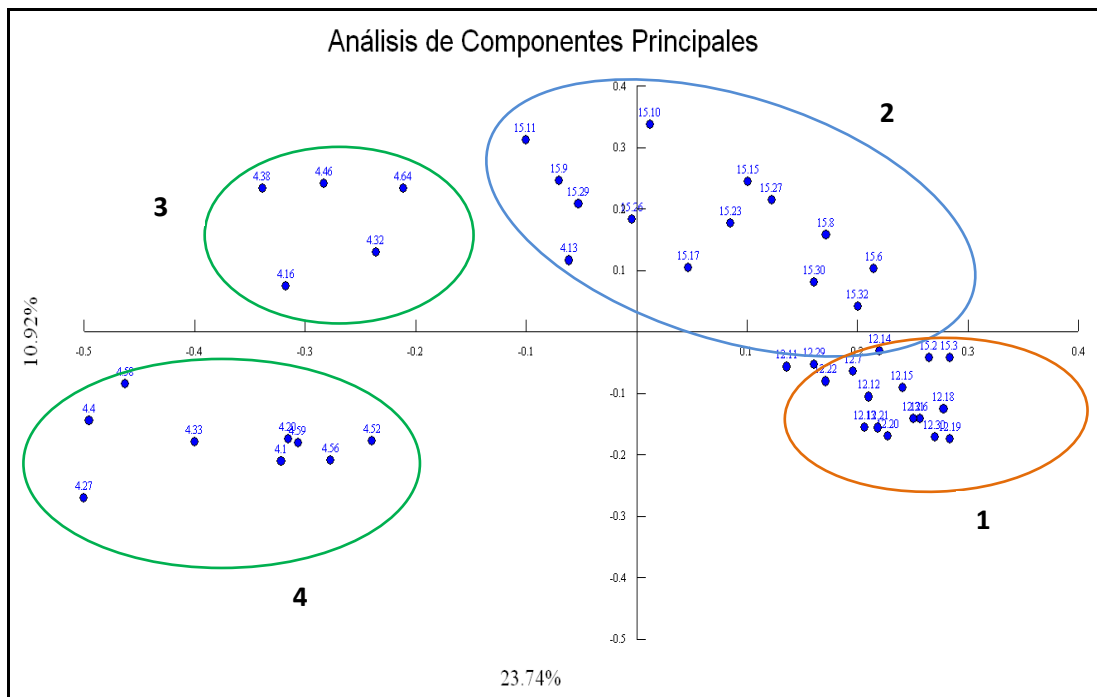


Figura 3.15 Distribución en dos dimensiones de los 45 individuos de *Jatropha curcas* L. mediante el análisis de componentes principales (ACP) basado en los coeficientes de similitud de Dice. Los números cercanos a los círculos representan a las 4 agrupaciones formadas.

La población de Pichincha- Quiroga (grupo 12, círculo naranja) se encuentra agrupada cerca de la población de Manta Puerto-Cayo (grupo 15, círculo celeste) mientras que la población de Pedernales Canoa Km 4 (grupo 4, círculos verdes) se separa considerablemente de las demás poblaciones formando dos conjuntos distintos.

Dentro de cada una de las cuatro agrupaciones mostradas en la Figura 3.15 se observa que la distancia a la que se encuentran separados los individuos de la misma agrupación es muy similar. Sin embargo, también se evidencia claramente que los individuos de la agrupación 1 (grupo 12 Pichincha- Quiroga) se encuentran estrechamente agrupados, en comparación con los individuos de las agrupaciones 2, 3 y 4, que están más separados entre ellos.

De acuerdo a los agrupamientos mostrados en las Figuras 3.13, 3.14 y 3.15, se puede inferir que casi todos los individuos del grupo 12 (Pichincha- Quiroga) y del grupo 15 (Manta-Puerto Cayo) se agrupan de acuerdo a la población a la que pertenecen. A diferencia del grupo 4 (Pedernales Canoa Km 4) que no agrupa a todos sus individuos en un mismo conjunto, lo cual indica que posiblemente los individuos de este grupo son genéticamente muy distintos entre ellos mismos, y entre los individuos del grupo 12 y del grupo 15.

3.4.4 Diferenciación genética

Para determinar si existe o no una diferencia genética significativa entre los grupos 4, 12 y 15 y entre los individuos de cada grupo de *Jatropha curcas* L. se llevó a cabo un análisis molecular de varianza o AMOVA. Para ello se determinó que el número de individuos es 45, el número de poblaciones es 3 y el número de regiones es 1. Los cálculos se realizaron con un número de permutaciones de 9999.

Los datos resultantes del AMOVA se resumen en la Tabla 3.7, en donde se indica que el mayor porcentaje de variación genética es 67%, observado dentro de las poblaciones. Se muestra también que el menor porcentaje de variación es de 33% registrado entre las tres poblaciones analizadas. Estos resultados sugieren una estructura poblacional moderadamente definida entre los individuos analizados en el presente estudio.

Tabla 3.7 Análisis de varianza molecular (AMOVA) usando los datos de los marcadores ISSRs de 45 individuos de *Jatropha curcas* L. de 3 poblaciones distintas.

Fuente de variación	DF	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Componente de varianza	Porcentaje de variación	Valor P
Entre poblaciones	2	171.378	85.689	5.025	33	0.000
Dentro de poblaciones	42	433.467	10.321	10.321	67	0.000
TOTAL	44	604.844		15.345	100	

Otras medidas de diferenciación genética que se calcularon para determinar la estructura poblacional de los individuos de *Jatropha curcas* L. fueron el coeficiente de endogamia F_{IS} , los índices de fijación F_{ST} y G_{ST} y el valor de flujo génico N_m , los cuales se muestran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Medidas de diferenciación genética y flujo génico que muestran las poblaciones de *Jatropha curcas* L.

Medidas de diferenciación genética	Valor calculado
F_{IS} (Grupo 4)	0.00862
F_{IS} (Grupo 12)	0.0888
F_{IS} (Grupo 15)	0.0469
F_{ST}	0.327
G_{ST}	0.2919
N_m	1.2131

3.4.5 Test de Mantel

Con el objetivo de conocer si existe una relación entre la composición genética y la localización geográfica correspondiente a cada población se aplicó un Test de Mantel, el cual permite analizar las relaciones estadísticas entre los elementos de dos matrices independientes con entradas similares, es decir con matrices que tengan el mismo número de filas y columnas y que la información de una matriz no se haya obtenido en función de la otra matriz (Peakall & Smouse, 2006).

Para ello, se utilizaron las matrices de distancias genéticas y de distancias geográficas (km), con un número de permutaciones de 9999. Los resultados del Test de Mantel se indican en la Figura 3.16, en donde se muestra que la variabilidad o distancia genética observada es independiente de la distancia geográfica de las poblaciones de *Jatropha curcas* L. Es decir no existe una relación significativa entre ambas matrices pues el valor de R^2 es bajo (0.4882).

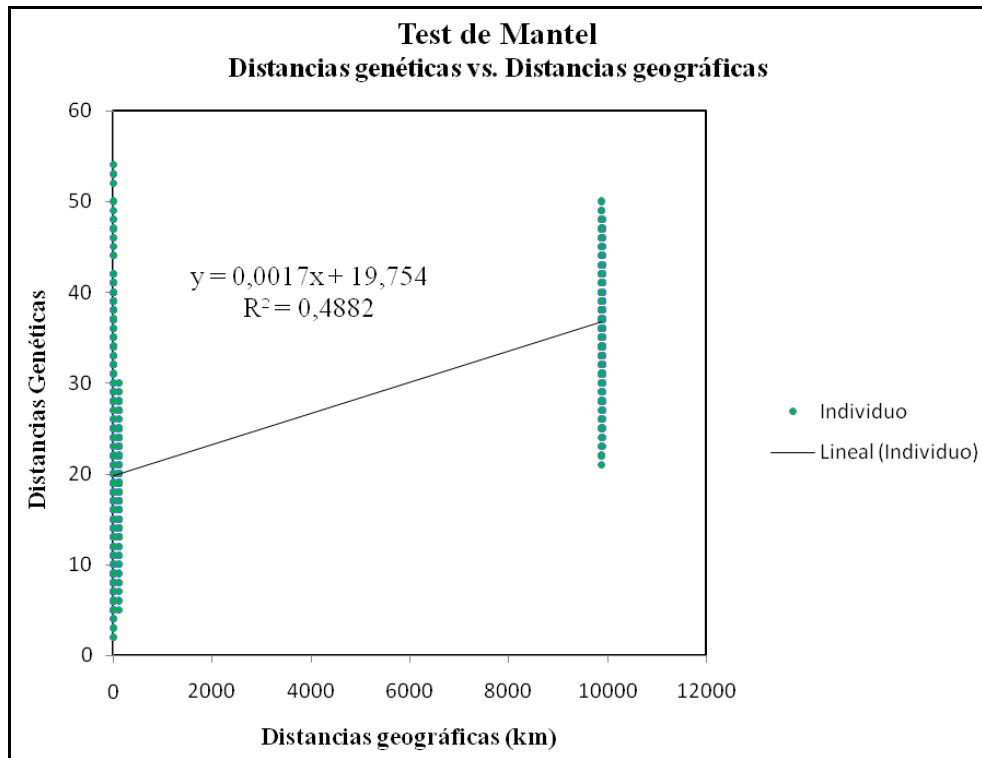


Figura 3.16 Gráfico obtenido mediante el Test de Mantel en donde se relaciona las distancias genéticas con las distancias geográficas de las tres poblaciones analizadas.

La escasa relación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de las 3 poblaciones de *Jatropha curcas* L. obtenidas mediante el Test de Mantel reiteran la falta de una estructura poblacional definida entre los individuos analizados.