



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE  
LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: Análisis de la variabilidad genética de muestras *ex vitro* e *in vitro* de clones de Babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* var. pentagona Badillo) usando marcadores moleculares de Secuencias Internas Simples Repetitivas (ISSR)**

**AUTOR: BRITO CABEZAS, SHIRLEY MONSERRAT**

**DIRECTOR: PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL PhD**

**SANGOLQUÍ**

**2017**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Que el trabajo titulado “Análisis de la variabilidad genética de muestras *ex vitro e in vitro* de clones de Babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* var. pentagona Badillo) usando marcadores moleculares de Secuencias Internas Simples Repetitivas (ISSR)”, realizado por, **SHIRLEY MONSERRAT BRITO CABEZAS** ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **BRITO CABEZAS, SHIRLEY MONSERRAT** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, agosto 2017

---

**PROAÑO TUMA, KARINA ISABEL PhD**

DIRECTORA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD**

Yo, SHIRLEY MONSERRAT BRITO CABEZAS

**Declaro que:**

*El proyecto denominado “Análisis de la variabilidad genética de muestras ex vitro e in vitro de clones de Babaco (*Vasconcellea × heilbornii* var. pentagona Badillo) usando marcadores moleculares de Secuencias Internas Simples Repetitivas (ISSR)” ha sido desarrollado en base a una investigación científica exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente, este trabajo es de mi autoría.*

*En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.*

Sangolquí, Agosto 2017.

**BRITO CABEZAS, SHIRLEY MONSERRAT**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, SHIRLEY MONSERRAT BRITO CABEZAS

**Autorizo que:**

El proyecto de grado denominado “Análisis de la variabilidad genética de muestras *ex vitro e in vitro* de clones de Babaco (*Vasconcellea × heilbornii* var. pentagona Badillo) usando marcadores moleculares de Secuencias Internas Simples Repetitivas (ISSR)” sea publicado en la biblioteca virtual de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

Sangolquí, agosto 2017.

---

**BRITO CABEZAS, SHIRLEY MONSERRAT**

## **DEDICATORIA**

Aquí el final de una etapa pero el principio de otra.

El presente trabajo es dedicado principalmente a mis padres Carlos y Jacqueline que con su incansable esfuerzo me hicieron valorar las cosas de la vida diaria, que lo material no importa y lo que realmente importa son el corazón que pongas a las cosas.

A mis hermanos Andrea y Adrian que a pesar de las peleas siempre estamos el uno para el otro, que pase lo que pase seremos únicos en el cual cada uno posee una razón de ser que nos hace diferentes.

A mi pequeña sobrina que ilumina mi camino, ella con sus ojos negros me convierte en la mejor persona del mundo y que con sus pequeños abrazos me indica que todo estará bien.

A mi Carlitos Andres que es mi ángel en el cielo que me enseñó que el amor verdadero atraviesa el tiempo y el espacio, que, aunque no se encuentre físicamente siempre será mi apoyo.

**Shirley Brito**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, con sede Sangolquí, por permitirme desarrollar mis estudios en un ambiente ameno con docentes que han sabido guiarme en este camino.

A la Ph.D Karina Proaño Tuma, quien me brindó la oportunidad de elaborar el proyecto de titulación en los laboratorios que se encuentran a su cargo y además le agradezco por darme la confianza de utilizar los recursos del laboratorio y sobre todo por inculcar en mí calidad profesional y humana.

A la MS.c Mónica Jadán y Ph.D Claudia Segovia por su colaboración científica y apertura de laboratorios que con su enseñan promueven la investigación y el desempeño como mujer en el ámbito científico

A mis amigos Daniel, Freddy, Rafael, Denisse, Janina, Emilia Alexis, Ana Cristina, Christian, Mayra, Gabriela y un especial agradecimiento a mis familiares, quienes con su compañía y apoyo durante la elaboración de este proyecto en todo momento han logrado conmigo esta nueva meta.

**SHIRLEY MONSERRAT BRITO CABEZAS**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>CERTIFICACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....</b>	<b>iii</b>
<b>AUTORIZACIÓN.....</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTADO DE ANEXOS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Formulación del problema .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Justificación del problema.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Objetivos de la investigación .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Objetivo general .....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
<b>1.4 Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
1.4.1 El Babaco ( <i>Vasconcellea x heilbornii</i> var. pentagona Badillo) .....	3
1.4.1.1 Origen y Taxonomía .....	4
1.4.1.2 Descripción morfológica.....	6
1.4.1.3 Cultivo.....	7
1.4.2 Diversidad genética.....	10
1.4.2.1 Frecuencias alélicas.....	11
1.4.2.2 Diferenciación entre poblaciones .....	12
1.4.3 Técnicas moleculares .....	12
1.4.3.1 Extracción de ADN.....	12
1.4.3.2 Determinación de la concentración y pureza del ADN.....	13
1.4.3.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa. ....	14
1.4.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	15



1.4.4 Marcadores moleculares .....	16
1.4.4.1 ISSR .....	17
1.4.5 Análisis de datos .....	19
1.4.5.1 Coeficientes de similitud .....	20
1.4.5.2 AMOVA.....	21
<b>1.5 Hipótesis de investigación.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Participantes.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Zona de estudio .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Fase de recolección .....	22
2.2.2 Fase de Laboratorio.....	22
<b>2.3 Período de investigación .....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Diseño .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Procedimientos .....</b>	<b>24</b>
2.5.1 Recolección de las muestras vegetales.....	24
2.5.2 Extracción de ADN .....	26
2.5.2.1 Protocolo de extracción de ADN de CYMMIT (2006) .....	26
2.5.2.2 Protocolo de extracción de ADN de Khanuja, Shasany, Darokar & Kumar (1999).....	27
2.5.3 Cuantificación y pureza del ADN .....	28
2.5.4 Electroforesis .....	28
2.5.5 Amplificación de fragmentos de ADN mediante primers ISSR .....	29
2.5.6 Visualización de productos amplificados .....	32
2.5.7 Registro de datos .....	33
2.5.8 Análisis de variedad .....	33
2.5.8.1 Cálculo de distancias genéticas .....	34
2.5.8.2 Análisis de la diferenciación genética.....	35
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Extracción y cuantificación de ADN .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Estandarización de las condiciones de temperatura y MgCl<sub>2</sub> para la amplificación de ISSR.....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Estandarización de la temperatura de alineamiento .....	39
3.2.2 Estandarización del MgCl <sub>2</sub> .....	41



3.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante primers ISSRs .....	42
3.4 Análisis de variabilidad .....	45
3.5 Distancias genéticas.....	48
3.6 Análisis de la diferenciación genética.....	56
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....</b>	<b>57</b>
4.1 Extracción de ADN .....	57
4.2 Amplificación de fragmentos de ADN mediante marcadores moleculares ISSR.....	58
4.3 Análisis de variabilidad genética .....	59
4.4 Distancias genéticas.....	60
4.5 Diferenciación genética.....	62
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mapa del Ecuador, zonas de origen y cultivo del babaco. Se muestran coloreadas las provincias de norte a sur: Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo y Loja.....	5
<b>Figura 2</b>	Fotografía de la distribución del fruto y de la flor femenina en el babaco. ....	7
<b>Figura 3</b>	Fruto partenocárpico del babaco, cutícula delgada pulpa esponjosa.....	7
<b>Figura 4</b>	Alineamiento de los iniciadores ISSR no anclados con respecto a un ADN molde.....	18
<b>Figura 5</b>	Alineamiento de iniciadores ISSR anclados con respecto a un ADN molde.....	18
<b>Figura 6</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de CYMMIT (2006). En el gel se encuentra el marcador High DNA Mass Ladder y las soluciones de ADN de las muestras vegetales de babaco (M1, M2, M3, M4). ....	36
<b>Figura 7</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Khanujan et al. (1999). En el gel se encuentra el marcador High DNA Mass Ladder y las soluciones de ADN de 4 muestras (M1, M2, M3, M4) vegetales de babaco .....	37
<b>Figura 8</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ensayo de pruebas de temperaturas del primer 844B. Se utilizó un solo individuo con dos repeticiones cada uno y marcador molecular Low Mass Ladder .....	39
<b>Figura 9</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ensayo de pruebas de concentraciones de MgCl <sub>2</sub> de los primer 17899A y HB12. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y marcador molecular Low Mass Ladder. ....	41
<b>Figura 10</b>	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 17898B de las tres poblaciones	

(1-10= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja). .....	43
<b>Figura 11</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 844B.Las flechas indican la ausencia de bandas las que fueron marcadas dentro de la matriz binaria. ....	46
<b>Figura 12</b> Matriz de contingencia triangular en base al coeficiente de disimilaridad de Nei de las tres poblaciones. Estaca, Organogénesis directa de ápice (O.D.ápice), Organogénesis directa de hoja (O.D. hoja).....	49
<b>Figura 13</b> Representación gráfica de los valores de variabilidad y similaridad promediados a partir del coeficiente de similaridad de Nei. Comparación entre Estaca, Organogénesis directa de ápice (O.D. ápice), Organogénesis directa de hoja (O.D. hoja).....	49
<b>Figura 14</b> Matrices de contingencia triangular de variabilidad y similaridad en base al coeficiente de Nei calculado para los individuos.....	50
<b>Figura 15</b> Representación gráfica de los valores de variabilidad y similaridad promediados a partir del coeficiente de similaridad de Nei. Comparación entre los individuos en estudio (1-10). ....	51
<b>Figura 16</b> Representación gráfica de variabilidad y similaridad promediados a partir del coeficiente de similaridad de Nei donde se comparan en conjunto poblaciones e individuos .....	52
<b>Figura 17</b> Dendograma obtenido con el agrupamiento UPGMA utilizando el índice de similaridad de Nei. Los individuos de las tres poblaciones se encuentran agrupados entre sí pues los colores verde, naranja y lila no forman grupos específicos sino que se mezclan con los otros grupos. ....	53
<b>Figura 18</b> Dendograma obtenido con el agrupamiento del vecino cercano (Nearest Neighbour) utilizando el índice de	

similaridad de Nei. Los individuos de las tres poblaciones se encuentran agrupados entre sí pues los colores verde, naranja y lila no forman grupos específicos .....	54
<b>Figura 19</b> Análisis de los componentes principales de los treinta individuos objeto de estudio y las distintas poblaciones (E: Estaca, Ho: Organogénesis directa de hoja, Ap: Organogénesis de ápice). .....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Valor nutricional del babaco por cada 100 g de fruta .....	4
<b>Tabla 2</b>	División taxonómica del babaco .....	6
<b>Tabla 3</b>	Lista de primers utilizados en el análisis molecular, empleados como una variable de respuesta. ....	23
<b>Tabla 4</b>	Esquema del diseño experimental propuesto en el estudio de variabilidad genética de clones de babaco. ....	24
Tabla 5	Muestras vegetales recolectas de babaco con sus codificaciones de los diferentes tipos de propagación. ....	25
<b>Tabla 6</b>	Lista de Primers utilizados en el análisis molecular y sus respectivas secuencias.....	29
<b>Tabla 7</b>	Lista de Primers utilizados en el análisis molecular y sus respectivas secuencias.....	30
<b>Tabla 8</b>	Condiciones de temperatura y tiempo para la amplificación de secuencias de ISSR´s en la PCR. ....	31
<b>Tabla 9</b>	Temperatura calculada de melting y temperatura teórica alineamiento para cada primer y rangos de temperaturas ensayadas. ....	31
<b>Tabla 10</b>	Valores de concentración y pureza realizadas en el Nanodrop Thermo Scientific 2000 de cada muestra vegetal en estudio. ....	37
<b>Tabla 11</b>	Temperaturas de alineamiento estandarizadas para los 8 primers de estudio. ....	40
<b>Tabla 12</b>	Concentraciones de MgCl <sub>2</sub> a la cual logran visualizarse mejor las bandas para cada uno de los ocho primer.....	42
<b>Tabla 13</b>	Tabla resumen del total de bandas amplificadas por cada primer y el rango del tamaño en pares de bases.....	45
<b>Tabla 14</b>	Porcentaje de polimorfismo de las poblaciones estudiadas: estaca, organogénesis indirecta de ápice y organogénesis directa de hoja .....	46

<b>Tabla 15</b> Porcentaje de polimorfismo cada uno de los 10 individuos analizados en el estudio.....	47
<b>Tabla 16</b> Valores de resolución de primer (Rp) y PIC para los ocho primers utilizados en el estudio.....	48
<b>Tabla 17</b> Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	56

## RESUMEN

La comercialización del babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo) como fruta exótica representa un rubro importante a la economía del Ecuador, generado ingresos de alrededor de 416.25 mil USD por año desde 2002. La propagación de este cultivo se realiza mediante estacas o cultivo *in vitro*, que asegura el desarrollo de germoplasma libre de virus. Actualmente el uso de marcadores moleculares en los últimos años ha tomado gran interés debido a que pueden verificar la procedencia y estabilidad del material genético. La presente investigación pretende aplicar marcadores moleculares tipo ISSR como herramienta molecular que de soporte al cultivo de tejidos en estudios de variabilidad de clones de babaco propagados de manera *in vitro*. Según los resultados obtenidos los ocho marcadores moleculares amplificaron un total de 55 bandas, lo que mostró un patrón uniforme en todas las muestras analizadas. La información que proporcionaron los ISSRs en esta investigación fue un 25.45% de bandas polimórficas y un Rp promedio de 0,41. Finalmente las distancias genéticas de Nei establecieron un promedio de 0,978 de similaridad y 0,022 de variabilidad al ser plantas clonales. La investigación realizada sugiere que no existe variación significativa en las muestras *in vitro* de babaco, presentando estabilidad genética en los seis subcultivos analizados.

### **PALABRAS CLAVE:**

- **BABACO**
- **VARIABILIDAD GENÉTICA**
- **ISSR**



## ABSTRACT

The commercialization of babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *Pentagona* Badillo) as an exotic fruit represents an important entry for the economy of Ecuador, generated income of about 416.25 thousand USD per year since 2002. The propagation of this crop is made by cuttings or *in vitro* culture, which ensures the development of virus-free germplasm. Currently the use of molecular markers in recent years has taken great interest because it can verify the provenance and stability of the genetic material. The present research applies molecular markers like ISSR as a molecular tool that supports tissue culture in studies of variability of babaco clones propagated *in vitro* by direct organogenesis of apex and direct organogenesis of leaf. According to the results, the eight molecular markers amplified a total of 55 bands, which showed a uniform pattern in all samples analyzed. The information provided by the ISSRs in this investigation was 25.45% of the polymorphic bands and an average  $R_p$  of 0.41. Finally the genetic distances of Nei established an average of 0.978 of similarity and 0.022 of variability to be clonal plants. The research suggests that there is no significant variation in the *in vitro* samples of babaco, presenting genetic stability in the six subcultures analyzed.

### KEYWORDS:

- **BABACO**
- **GENETIC VARIABILITY**
- **ISSR**

## LISTADO DE ANEXOS

- ANEXO A** Matriz binaria de datos de cada uno de los ocho primer. 1= presencia de banda, 0= ausencia de banda.
- ANEXO B** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 17899A de las tres poblaciones (1-10= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja).
- ANEXO C** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 844A de las tres poblaciones (1-10= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja).
- ANEXO D** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 844 B de las tres poblaciones (1-10= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja).
- ANEXO E** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 17898A de las tres poblaciones (1-10= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja).
- ANEXO F** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer HB9 de las tres poblaciones (2-10= Estaca, 2A-10A= Organogénesis directa de ápice, 2B-10B=Organogénesis directa de hoja).
- ANEXO G** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer HB11 de las tres poblaciones (1-10°= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja).

- ANEXO H** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer HB12A de las tres poblaciones (6-10°= Estaca, 6A-10A= Organogénesis directa de ápice, 6B-10B=Organogénesis directa de hoja).
- ANEXO I.** Matriz de contingencia triangular, comparación entre los 30 individuos y las tres poblaciones (Estaca, organogénesis directa de ápice y organogénesis directa de hoja). Datos obtenidos a partir de distancias genéticas de Nei.

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

<b>µl</b>	microlitros
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CIA</b>	Cloroformo :Alcohol isoamílico
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetracético
<b>ISSR s</b>	Secuencias internas simples repetitivas
<b>M</b>	Molar
<b>m.s.n.m</b>	metros sobre el nivel del mar
<b>mg</b>	miligramos
<b>ml</b>	mililitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>TBE</b>	Tris- Borato de EDTA
<b>UV</b>	Luz ultravioleta

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

El Ministerio de Comercio Exterior en el 2017, menciona que el Ecuador se ha desarrollado como el tercer país con la mejor economía de América latina con una tasa anual de crecimiento del PIB del 7% desde el año 2013. La economía nacional se enfoca en la agricultura y la seguridad alimentaria como actividades principales (Dicano y Naranjo, 2014). Actualmente, se ha destacado la producción de cultivos agrícolas exóticos y ancestrales como es el cultivo del babaco (Robles-Carrión, Herrera, & Roldán, 2016).

El babaco es una planta nativa del sur del país con un gran potencial como especie cultivable para exportación, debido a características del fruto como la ausencia de semillas, alto valor nutritivo y agradable sabor de la pulpa (Robles-Carrión, Herrera, & Roldán, 2016). El fruto del babaco es conocido en países como Nueva Zelanda, Australia, Italia, España, Francia, Sur de África, Suiza, Canadá y Países Bajos principalmente en productos procesados como la mermelada (Sinche, 2009).

El cultivo del babaco se realiza principalmente mediante estacas (reproducción asexual) o a través del cultivo *in vitro*. La propagación se realiza utilizando como patrón brotes tiernos, hojas, ápices o injertos. Lamentablemente, al realizar la propagación por estaca o cultivo *in vitro*, se puede generar problemas fitopatológicos (Freire, 2015) o generar cambios genéticos después de (n) subcultivos en la planta, que podrían transmitirse a la descendencia.

Los cambios genéticos o variación somaclonal (Larkin & Scowcroft, 1981), es una característica indeseable cuando se requiere propagación clonal de una variedad con características de planta elite (Gao *et al.*, 2010). Además, la falta de estudios sobre variabilidad genética de los cultivos nativos y en especial del babaco es un problema que limita el cultivo a nivel internacional.

## 1.2 Justificación del problema

El babaco ha sido una fruta que ha dado rubros importantes en mercados internacionales como fruta exótica. El Ecuador posee 15 de las 21 especies del género *Vasconcellea* (Scheldeman, *et al.*, 2003). Este cultivo alcanza un rendimiento promedio de 225Tm ha<sup>-1</sup> durante su período de producción, lo que significa una de las más altas tasas de retorno dentro de los frutales (Villareal *et al.* 2003). El babaco ha llegado a comercializarse hasta en 3.20USD kg<sup>-1</sup> en países como Holanda y Alemania, principales consumidores de este fruto. Esto ha generado alrededor de 416.25 mil USD de ingresos por año desde 2002 (MAG, 2001).

El Ecuador al posicionarse como un país productor de cultivos frutales, requiere mejorar la calidad de estos productos para satisfacer el mercado a nivel internacional. La utilización de técnicas *in vitro* han dado buenos resultados en la propagación masiva de plantas élite, ya que se requiere cultivos con estabilidad genética y productividad estable (CORPEI, 2006).

El creciente interés por la necesidad de una genética estable en los cultivo, nos ha llevado al empleo de técnicas en biología molecular que desempeñen un papel importante en el análisis de recursos genéticos (Singh, Mishra, Kant, & Sashi, 2008). Por tal razón, el uso de marcadores moleculares tipo ISSR podrían ser útiles para analizar grandes secciones del genoma a un costo muy bajo y en especies para las cuales no hay datos genómicos previos como es el caso del babaco.

Es importante destacar que este estudio es pionero en el Ecuador. El análisis de la variabilidad genética es necesario, especialmente cuando hablamos de variación somaclonal entre poblaciones clonales reproducidas de manera *ex vitro* (estaca) e *in vitro* (organogénesis directa de ápice y hoja). Por lo tanto, determinar la estabilidad del cultivo mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSRS proporcionará la información contenida en el genoma, clasificará el material parental y acelerará la selección de las mejores progenies, lo que podrá satisfacer las demandas del mercado.

### 1.3 Objetivos de la investigación

#### 1.3.1 Objetivo general

Analizar la variabilidad genética de muestras *ex vitro* e *in vitro* de clones de babaco (*Vasconcellea* × *heilbornii* var. pentagona Badillo) usando marcadores moleculares de Secuencias Internas Simples Repetitivas (ISSR).

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo para la extracción de ADN a partir de hoja de *Vasconcellea* × *heilbornii* var. pentagona Badillo.
- Estandarizar y optimizar las condiciones para la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando marcadores moleculares ISSR.
- Analizar los parámetros de diversidad genética basada en las frecuencias alélicas obtenidas mediante programas bioinformáticos.

### 1.4 Marco teórico

#### 1.4.1 El Babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo)

Ecuador al ser un país con una amplia variabilidad de climas y diversas características tanto geográficas como ecológicas (Alvez *et al.*, 2012), es un ambiente propicio para desarrollar la producción de cultivos agrícolas frutales, entre ellos el babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo).

El babaco, planta endémica del Ecuador, es apreciado principalmente por su aroma y sabor exclusivo. Desde el punto de vista nutricional el babaco es rico en fibra, contiene grandes cantidades de vitaminas, minerales y papaína (enzima con excelentes



propiedades digestivas y antiinflamatorias). La Tabla 1 muestra el valor nutricional por cada 100 g de fruta.

**Tabla 1**  
*Valor nutricional del babaco por cada 100 g de fruta*

<b>Nutrientes</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Agua	93-94 g
Energía	21 g
Proteína	0.70 g
Lípidos	0.02-0.3
Carbohidratos	4.6-6.0
Fibra	0.5-1.0
Colesterol	0 g
<b>Minerales</b>	<b>mg</b>
Calcio	8.0-12.0
Hierro	0.3-4.0
Magnesio	6.0-15.3
Fósforo	7.7-17.0
Potasio	132-220
Sodio	1.3-3.0
<b>Vitaminas</b>	<b>Mg</b>
Ácido ascórbico	23-31
Tiamina	0.02-0.03
Riboflavina	0.02-0.06
Niacina	0.5-1.0
Vitamina A	0.16-2.0

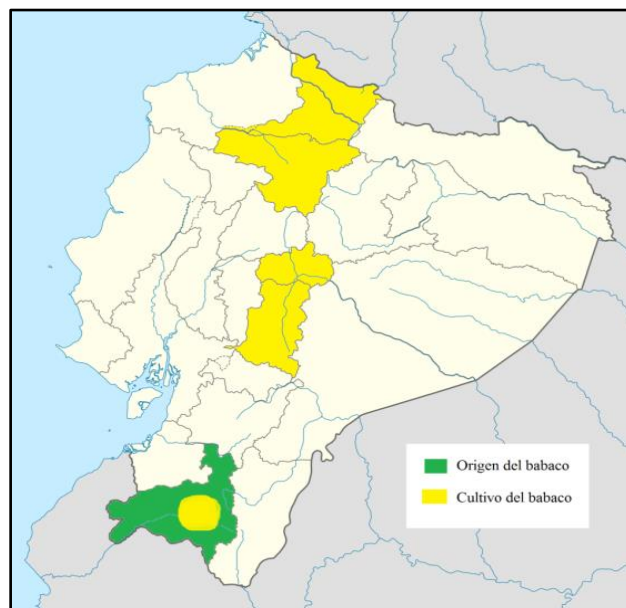
Fuente: (Ministerio de Prevención Social y Sanidad, 1965)

El cultivo de esta fruta es una actividad de importancia a nivel nacional e internacional. Es por ello, que el país debería invertir en estudios científicos, que mejoren la calidad del cultivo, eviten el ataque de microorganismos, potencialicen su producción agrícola, (Fabara *et al.*, 1985; Cacioppo, 1987; Scheldeman *et al.*, 2003) y garanticen una estabilidad genética.

#### 1.4.1.1 Origen y Taxonomía

El género *Vasconcellea* es endémico de las regiones tropicales y subtropicales de Sudamérica, principalmente de la cordillera de los Andes. El babaco (*V. x heilbornii*)

es un híbrido natural entre el chamburo (*V. pubescens*) y el toronche o jigacho (*V. stipulata*) (Scheldeman *et al.*, 2003). Esta fruta se encuentra fácilmente en zonas cálidas como valles, siendo originaria de la región centro - sur del Ecuador, específicamente de la provincia de Loja. Esta planta es cultivada principalmente en la región Sierra en las provincias de Tungurahua, Loja, Imbabura, Pichincha, Chimborazo, Carchi, entre otras (Figura 1) (Fabara *et al.*, 1985; Soria y Viteri, 1999; MAG, 2001).



**Figura 1** Mapa del Ecuador, zonas de origen y cultivo del babaco. Se muestran coloreadas las provincias de norte a sur: Carchi, Imbabura, Pichincha, Chimborazo y Loja.

La primera descripción taxonómica del babaco fue realizada por Heilborn (1922), al creer que era una nueva especie, a ésta se le asignó el nombre de *Carica pentagona*. Badillo en el año 1987, determinó que el babaco es un híbrido natural del cruce entre chamburo (*Vasconcellea pubescens*) y el toronche (*V. stipulata*), por lo que se lo clasificó como *Carica x Heilbornii* (Badillo) variedad *pentagona* (Heilborn) (Soria & Viteri, 1999). De acuerdo a una revisión taxonómica de la Universidad de Ghent mediante el uso de AFLPS, el babaco ha sido clasificado en el género *Vasconcellea*, en lugar del género *Carica* como se muestra en la Tabla 2 (Badillo *et al.*, 2000; Scheldeman *et al.*, 2003).

**Tabla 2**  
*División taxonómica del babaco*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Anthophyta
<b>Clase</b>	Angiospermae
<b>Subclase</b>	Magnoliopsida (Dicotiledónea)
<b>Orden</b>	Parietales
<b>Familia</b>	Caricaceae
<b>Género</b>	<i>Vasconcellea</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Vasconcellea x heilbornii</i> var. pentagona Badillo
<b>Nombres comunes</b>	Babaco, Papaya de montaña, Papayuela

Fuente: (Badillo *et al.*, 2000)

#### 1.4.1.2 Descripción morfológica

El babaco es una planta arbustiva de cultivo semiperenne. Su tronco es recto, no leñoso y cilíndrico que puede alcanzar 3 m en un año, sus hojas son alternadas con un limbo que posee de 5 a 7 lóbulos con pecíolo largo. Su crecimiento es continuo y la vida media de las hojas es de 4 a 6 meses, luego de lo cual se desprenden del tallo gradualmente (Soria & Viteri, 1999).

La planta del babaco presenta únicamente flores femeninas, aparecen en la axila de las hojas, cuando termina la fase juvenil de la planta. En la figura 2 se visualiza las flores de forma acampanada, con cinco pétalos de color verde blanquecino y un cáliz de color verde oscuro (Fabara *et al.*, 1985; Vaca, 2008). Al ser una especie que no contiene flores masculinas, produce un fruto partenocárpico. Por tal razón, el desarrollo del babaco se realiza sin necesidad de una fecundación, obteniendo así un fruto sin semillas. (Carrasco *et al.*, 2009).



**Figura 2** Fotografía de la distribución del fruto y de la flor femenina en el babaco.

El fruto es una baya alargada sin cavidad ovárica ni semillas, que posee cinco caras y cinco aristas, cuyo tamaño máximo es de 20 cm de largo y hasta 15 cm de diámetro, que puede llegar a pesar entre 0,5 y 2 kg. Presenta en el exterior una cutícula delgada, mientras que en el interior, su pulpa se encuentra llena de tejido esponjoso blanquecino (Lim, 2012). Su sabor es ácido dulce, presentando un alto valor vitamínico con un bajo grado de azúcares y calorías (Soria y Viteri, 1999) (Figura 3).



**Figura 3** Fruto partenocárpico del babaco, cutícula delgada pulpa esponjosa.

#### 1.4.1.3 Cultivo

El babaco es un cultivo cuya propagación se da únicamente a través de forma asexual o vegetativa debido a su fruto partenocárpico (sin semilla) (Fabara *et al.*, 1985; Merino, 1989; Soria & Viteri, 1999). A continuación se describe las técnicas de propagación asexual del babaco.

#### **1.4.1.3.1 Propagación por estaca**

La obtención de plantas madre a partir de estacas en condiciones semicontroladas se la consigue en ciclo de producción. Se considera estaca a un fragmento de tallo con yemas que se introducen en el suelo o en un sustrato para que arraigue en él y forme una nueva planta (Sierra, 2003). Las estacas, por consiguiente, son un medio para la propagación vegetativa o asexual, que facilita a los agricultores al escoger ciertas características de la planta como la robustez, la sanidad y la edad (mínimo 2 años de edad). Las estacas pueden variar en longitudes con un rango cercano a 25 cm y con un diámetro aproximado de 3 a 5 cm.

La técnica consiste en cortar la parte superior de la planta. Es necesario tomar en cuenta el seccionamiento en bisel, para evitar que se pueda empozarse el agua y la posible pudrición de la planta, de la misma manera la base debe ser fragmentada en forma transversal, esto para que pueda ocurrir un buen enraizamiento. Por otra parte, es esencial realizar un control fitosanitario de la estaca con un fungicida como el Carbendanzin al 0,5% v/v. Jadán y colaboradores (2016) menciona que las estacas deben ser plantadas en fundas plásticas de 1 kg de capacidad, utilizando como sustrato suelo arenoso arcilloso, humus de lombriz y pomina en proporción 3:1:1. Una vez plantado el babaco se procede a regarlo dos veces por semana para acondicionarlas dentro de un invernadero (Jadán, Basantez, Gómez, & Bermudez, 2016).

La temperatura en el invernadero debe estar entre los 23°C y su humedad relativa de 40-50%. La aplicación del fungicida en las secciones del tallo se la realiza cada 2 días durante 3 semanas, de la misma manera se emplea bioestimulante GERMO-TB01 aplicado dos veces por semana, lo cual ayuda en el rejuvenecimiento celular (Jadán, Basantez, Gómez, & Bermudez, 2016).

#### 1.4.1.3.2. Propagación por cultivo *in vitro*

El objetivo de esta técnica es obtener una propagación de forma rápida, a gran escala y de plantas sanas, libres de virus, bacterias, entre otros. La micropropagación y el cultivo de meristemas, son excelentes opciones utilizadas para la multiplicación del cultivo de babaco (Fabara, *et al.*, 1985; Soria & Viteri, 1999). Sin embargo solo dos estudios han sido relacionados con el babaco hasta la actualidad sobre la micropropagación de esta especie a partir del cultivo *in vitro* de ápices (Cohen & Cooper, 1982) y de yemas axilares (Cossio, 1988) mostrando pocos detalles del proceso realizado.

En el 2016 Jadán y colaboradores establece una técnica de cultivo *in vitro* de yemas axilares a partir de babaco (*Vasconcellea x helbornii*) lo que dio origen de esta investigación. El material vegetal fue recolectado de plantas madre de cultivo bajo condiciones controladas como sustrato franco arenoso arcilloso, humus de lombriz y pomina en proporción 3:1:1 (Cevallos & Ramos, 1990). Las plantas fueron desinfectadas con anterioridad con la aplicación de fungicida Caberdazin 0.5% (v/v) (Nufarm, EUA), temperatura controlada entre 15- 20°C, humedad relativa de 40-50% y control de luz mediante malla sombra (50%), además el uso del bioestimulante GERMO-TB01 (Germoplanta Cia. Ltda, Quito) donde su aplicación por asperción se la realizó en el área foliar cada 2 días.

La desinfección se la realiza con yemas axilares de tamaño aproximado de 3 a 5 cm. En primer lugar, se lava con una solución jabonosa durante 15 minutos en agitación continua, seguido de esto se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. A continuación son sumergidos en una solución del fungicida DORBAQ (LONZA Inc., EUA) por 30 minutos en agitación a igual velocidad. Se realiza un lavado con agua destilada estéril, posterior al lavado se utiliza una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% durante 10 min y la inmersión en una solución con los dos antibióticos Sulfato de Gentamicina y Estreptomina or 3 horas.

El procedimiento de cultivo *in vitro* se realiza dentro de una cámara de flujo laminar, una vez adentro se realizan tres lavados con agua destilada estéril y se reducen

los brotes a un tamaño de 2.0 cm. Los brotes se colocan en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo semisólido compuesto por las sales de Cohen y Cooper (1982), a las que se le adicionan 6-bencil aminopurina (6-BAP), ácido naftalen-acético (ANA), y maltosa. Finalmente se solidifican con BACTOTM AGAR (Becton & Dickinson Co, EUA). Los explantes deben ser colocados en cámara de cultivo en estantes con tubos fluorescentes de luz blanca con un fotoperiodo de 12 horas luz. (Jadán, Basantez, Gómez, & Bermudez, 2016).

### **1.4.2 Diversidad genética**

En el Ecuador la variabilidad genética tanto de especies silvestres como de especies cultivables, ha sido un área poco estudiada. Por tal razón, el estudio de la diversidad genética en clones de babaco toma gran importancia, ya que el cultivo de esta fruta representa rubros importantes a la economía del país.

La variación genética conocida como variación somaclonal o epigenética es la variación que se genera durante el cultivo *in vitro* de plantas (cultivos celulares de tejidos u órganos) que proviene de células somáticas. En programas de mejoramiento genético, la variación somaclonal puede constituirse en un recurso importante que genera variabilidad. Sin embargo, durante la micropropagación y en bancos de germoplasma *in vitro*, este tipo de variación es indeseable (Sánchez-Chiang & Jiménez, 2009). En este contexto, el estudio de la diversidad genética de clones de babaco obtenidos mediante técnicas *in vitro* con la aplicación de marcadores moleculares ISSR pueden detectar este tipo de variación.

La diversidad genética se ve reflejada en las diferencias de caracteres que presentan secuencias de ADN ligeramente diferentes. A su vez, las variantes de estas secuencias pueden resultar en diferentes secuencias de aminoácidos y por ende de proteínas. Esta variación puede resultar en alteraciones bioquímicas o morfológicas que causan diferencias a nivel reproductivo, sobrevivencia o comportamiento de los individuos (Reed & Frankham, 2003).



El estudio de las causas y de los patrones responsables de la diversidad genética se analiza a nivel de genética de poblaciones. Una de las medidas de variación es la estructura genética y su relación entre los individuos de una población, que se fundamentan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas, con pruebas estadísticas (Piñero, 2008)

#### **1.4.2.1 Frecuencias alélicas**

El primer paso para analizar la estructura y diversidad genética es la obtención de frecuencias alélicas. El empleo de marcadores moleculares codominantes o dominantes facilita este tipo de análisis. En marcadores codominantes en los que se pueden diferenciar los heterocigotos de los homocigotos (isoenzimas, microsatélites, o secuencias de genes nucleares de copia única), la estimación de las frecuencias alélicas es relativamente sencilla (Eguiarte, Souza, & Aguirre, 2007). En el caso de marcadores dominantes en el que pese los heterocigotos no pueden ser distinguidos de los homocigotos dominantes (RAPDs, AFLPs e ISSRs) son actualmente muy populares, ya que permiten analizar directamente grandes secciones neutras del genoma a un bajo costo, inclusive en estudios con especies sin datos genómicos previos.

Para el cálculo de frecuencias alélicas usualmente se considera que las poblaciones están cerca del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se estima la frecuencia de los alelos recesivos ( $q$ ), a partir de los individuos “sin banda”, como la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias, esto es,  $x = q^2$ , siendo  $q = x^{1/2}$ . Por otro lado, la frecuencia de los alelos dominantes ( $p$ ) es igual a  $1 - q$  Lynch & Crease (1990). Otra opción es no tomar en cuenta las frecuencias alélicas y trabajar con otros estimados de la diversidad, que permiten separar a la variación genética en componentes dentro y entre las poblaciones, como es el estimador de Jaccard (Lewontin, 1972; Domínguez *et al.*, 2005).

### 1.4.2.2 Diferenciación entre poblaciones

Para detectar diferencias estadísticas significativas en las frecuencias alélicas entre las poblaciones se puede realizar diferentes pruebas estadísticas que involucran diferentes parámetros. En 1951 Sewall Wright introdujo un método para estimar la proporción de variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones, el cual usualmente emplea el estadístico  $F_{ST}$  o sus análogos, que permiten comparar de manera clara y cuantitativa la diferenciación existente entre poblaciones de distintas especies.

Se han desarrollado métodos de estimación de  $F_{st}$  para marcadores moleculares dominantes como RAPD, AFLP e ISSR (Holsinger & Wallace 2004). En el 2005 Excoffier y sus colaboradores, generalizaron el método  $F_{st}$  en el AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*). Éste método tiene menos requerimientos estadísticos y resulta menos sesgado que una estimación de  $F_{st}$  normal, y puede estimar los datos en varios niveles.

Otras medidas de “distancia genética” entre pares de poblaciones es la distancia genética de Nei (también llamado coeficiente de Dice), el cual refleja el número de sustituciones nucleotídicas en el ADN. El coeficiente de Nei se ha usado ampliamente en diferentes grupos de organismos permitiendo comparaciones a distintos niveles tanto entre poblaciones, entre variedades o subespecies e inclusive entre especies (Piñero *et al.*, 2008).

## 1.4.3 Técnicas moleculares

### 1.4.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico es esencial para las aplicaciones en biología molecular. El objetivo de la extracción de los ácidos nucleicos en plantas, es la obtención de un ADN con alto rendimiento y pureza (Bermudez-Guzmán *et al.*, 2016). Uno de los factores que pueden disminuir la cantidad, rendimiento y pureza del ADN, son los distintos tipos de metabolitos secundarios que secretan las plantas. Al contener

los metabolitos sustancias como fenoles, polifenoles, terpenos, quinonas y alcaloides afectan el rendimiento de la extracción. Conforme a esto, los investigadores utilizan ciertas modificaciones en los protocolos de extracción y purificación de ADN en cada especie analizada (Khanuja *et al.*, 1999).

En la extracción de ADN la etapa de lisis consiste en romper las estructuras que confinan el citoplasma y liberar al medio su contenido. Éste proceso utiliza sales que ayudan a romper la estructura tridimensional de macromoléculas como las proteínas o los ácidos nucleicos lo que denominamos como desnaturalización. En este proceso, la desnaturalización se da con la adición de una proteasa lo que resulta en la degradación de la fracción proteica asociada al ADN (Rådström *et al.*, 2004).

Posteriormente la purificación de ADN consta de tres fases: precipitación, lavado y resuspensión. El ADN al ser insoluble en alcohol se lo precipita con etanol frío o isopropanol y es recuperado mediante centrifugación. Posteriormente el lavado del pellet se lo realiza con alcohol frío y se lo vuelve a precipitar. (Rådström *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.2 Determinación de la concentración y pureza del ADN**

Luego de la extracción del ADN, son necesarios la cuantificación y el análisis de la calidad de las moléculas obtenidas. Actualmente uno de los métodos más utilizados para la cuantificación del ADN es el análisis mediante espectrofotometría en el NanoDrop® (Thermo Scientific 2000). Además de valores de concentración de ADN el equipo aporta con datos de relación 260/280 (ADN/Proteínas) y 260/230 (ADN y solventes orgánicos) lo que permiten tener información sobre la pureza del producto. Si la relación 260/280 es mayor a 1,6 puede estimarse que la muestra es lo bastante pura para confiar en la cuantificación espectrofotométrica (SGIKER, 2008).

### 1.4.3.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa es la forma más eficaz de separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños que van desde 100 pb a 25 kb, es por esta razón que continua siendo una herramienta imprescindible para la biología molecular al momento de caracterizar, identificar y evaluar la integridad del ADN (Dong, Lv, & Lai, 2012).

La agarosa es un polisacárido altamente purificado derivado del agar utilizado para separar macromoléculas como los ácidos nucleicos y grandes complejos proteicos dentro de los procesos moleculares. Una de las características importantes de la agarosa es no presentar desnaturalización, lo que permite que fragmentos de menor tamaño se mueven con mayor facilidad a través de los poros de la matriz de agarosa mientras que los fragmentos grandes enfrenten mayor resistencia y por ende migran lentamente (Universidad Nacional de Quilmes, 2012).

El tamaño del poro del gel puede ser predeterminado ajustando su concentración, así a mayor concentración menor tamaño de poro. El rango de concentración es aproximadamente entre 0,7% y 2% p/v. Con un gel 0,7% se obtiene una buena separación (resolución) de grandes fragmentos de ADN (5–10kb) y con uno 2% se resuelven mejor los fragmentos pequeños (0.2–1kb) (Universidad Nacional de Quilmes, 2012).

La agarosa tienen un menor poder de resolución que la poliacrilamida pero una gran rango de separación, por lo que pueden las moléculas de ADN pueden ser separadas desde 200 pb hasta aproximadamente 50.000 pb (variando las concentraciones de agarosa).

#### 1.4.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN. Durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada (McPherson & Møller, 2006).

En esta técnica son necesarios algunos elementos como el molde o molde (ADN o ADNc), la enzima (*Taq* polimerasa), los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) el ión magnesio (Mg<sup>+</sup>), el buffer y el H<sub>2</sub>O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión.

Al iniciar la reacción es importante que las moléculas de ADN molde se encuentren en forma de cadena simple, esto se consigue en la primera etapa de desnaturalización. En este paso es necesario subir la temperatura para ello es necesario que produzca la ruptura de la cadena molde. En la etapa hibridación se disminuye la temperatura de la reacción hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que pueda producir la hibridación específica de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se desea amplificar. Finalmente, en la fase de extensión, la *Taq* polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizado como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada (McPherson & Møller, 2006).

El equipo donde se realiza la reacción de PCR es el termociclador, el cual está diseñado para establecer un sistema homogéneo de temperatura y tiempo en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar el éxito de la reacción (Tamay *et al.*, 2013).

#### 1.4.4 Marcadores moleculares

En 1996, Ferreira y Grattapaglia definen a los marcadores moleculares como cualquier fenotipo molecular originado de la expresión de un gen o un segmento específico de ADN que sirve para realizar análisis sobre diversidad génica. Actualmente existe un gran número de marcadores moleculares, que permiten obtener gran cantidad de información genética (Singh *et al.*, 2008) en estudios de taxonomía, fisiología, embriología, ingeniería genética, genética poblacional, mapeo, genotipos, entre otros (Chia Wong, 2009).

Los marcadores de ADN son cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés, y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (Eckert & Kunkel, 1990).

Los marcadores moleculares son ampliamente usados en la variación genética de una población, en la que consiste se examinar el polimorfismo genético. Por esta razón, se tiene una amplia gama de marcadores moleculares que nos permiten el análisis de las variaciones genéticas en los organismos. Entre los principales tipos de marcadores moleculares podemos mencionar los siguientes (Karp *et al.*, 1997; Spooner *et al.*, 2005; Chia, 2009):

- Hibridación de ADN: RFLP y VNTR.
- Basados en PCR :
  - a) Marcadores con iniciadores arbitrarios o semiarbitrarios, RAPD, DAF, ISSR, AFLP, etc.
  - b) Marcadores con iniciadores específicos, STS, SSR, SCAR, CAPS, etc.
  - c) Sitios específicos y detección por desnaturalización del ADN: SSCP, DGGE, TGGE.
  - d) Sitios específicos y secuenciación del ADN: SNP, EST, etc.

Estos marcadores pueden detectar en capacidad de amplificación genómica, nivel de polimorfismo, especificidad de locus, reproducibilidad, requerimientos técnicos, grado de inversión financiera y laboriosidad.

La elección del tipo de marcador molecular dependerá de la disponibilidad de tiempo y fondos para la investigación. Se debe tomar en cuenta además limitaciones en el equipamiento, nivel de polimorfismo en la población a estudiar entre otros. (Spooner *et al.*, 2005).

#### 1.4.4.1 ISSR

Los marcadores tipo ISSR son secuencias internas repetitivas desarrollados por Zietkewicz y sus colaboradores en 1994. Estos marcadores genéticos nos permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT) $n$  ó (CA) $n$ , (Aguirre & Gonzalez, 2004).

Los ISSR son interpretados como marcadores dominantes, es decir, que la presencia de la banda amplificada incluye tanto al homocigoto dominante como al heterocigoto, considerando como la banda ausente el carácter homocigoto recesivo (Karp *et.al.*, 1997). Esto trae la desventaja de observarse un bajo contenido de información genética por locus y por consiguiente dificulta determinar algunos parámetros genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

El uso de los ISSRs no requiere el conocimiento previo de las secuencias del genoma. Estos marcadores implican la amplificación del ADN de repetición entre secuencias utilizando un solo primer de 14 pb o más, el cual es complementario a dos microsatélites cercanos presentes en el genoma. La amplificación ocurre cuando hay un correcto alineamiento de los iniciadores y la distancia entre éstos sea de 100 a 2500 pb o más. Por otro lado, la región no será amplificada si existe divergencia entre los sitios de unión y los iniciadores, si uno de los sitios de unión no existe y/o existen rearrreglos estructurales genómicos o cromosómicos (Chia Wong, 2009).

Existen dos clases de iniciadores ISSRs denominados anclados y no anclados. Los primeros poseen secuencias complementarias al microsatélite, pero no poseen nucleótidos diferentes a éste (Figura 4).





### 1.4.5 Análisis de datos

La limitación de los marcadores dominantes (ISSR) hace que el análisis de genética de poblaciones no sea tan certero como el de los marcadores codominantes. Sin embargo, una ventaja relevante es que los marcadores dominantes pueden presentar un gran número de polimorfismos en todo el genoma, el cual será representado en los fragmentos amplificados (Hollingsworth & Ennos, 2004; Satovic *et al.*, 2004)

Los fragmentos de ADN amplificados se visualizan como bandas de diferentes pesos moleculares. La presencia o ausencia de éstas pueden ser compartidas entre los genotipos y por lo tanto se consideran caracteres fenotípicos distintos e independiente de los demás. Los valores utilizados en este tipo de análisis son 1 y 0 del método binario, para representar el valor de presencia o ausencia respectivamente (Chia Wong, 2009).

El poder de resolución determina la capacidad de un primer para poder distinguir apropiadamente entre genotipos. Por tal razón, estará en función de la cantidad de bandas que genere y de la calidad de las mismas. El poder de resolución proporcionará datos cuantitativos que permitan realizar comparaciones entre primers, inclusive distinguir entre los genotipos evaluados (Venkatachalam *et al.*, 2008; Ochoa, 2008, Salinas, 2010).

Para inferir las estructuras poblacionales y patrones de agrupamiento, se aplican diversos métodos estadísticos multivariados. La información obtenida permite calcular las distancias genéticas y generar representaciones gráficas. Además, es posible lograr la ordenación de los datos en dos o tres dimensiones y una mejor visualización de las relaciones entre ellas (Crisci & López 1983; De Vicente *et al.*, 2004). A continuación se detallan los análisis de los distintos coeficientes de distancias genéticas que estiman semejanzas taxonómicas.

### 1.4.5.1 Coeficientes de similitud

El propósito de este análisis es determinar el grado de similitud entre los individuos en estudio (Sneath y Sokal, 1973). Es así que, el empleo de marcadores genéticos moleculares pueden examinar un grupo de individuos o poblaciones para estimar medidas de diversidad y distancias genéticas. El resultado logrará inferir estructuras poblacionales y patrones de agrupamiento, comprobando los equilibrios de Hardy Weinberg y de multiloci (Yeh *et al.*, 1999; Rohlf, 2000; Excoffier *et al.*, 2005).

Adicionalmente podemos utilizar las distancias genéticas entre pares de poblaciones para reconstruir las genealogías de poblaciones, ya sea mediante métodos de agrupamiento como UPGMA o Neighbor-joining.

#### 1.4.5.1.1 Coeficiente de Nei

La medida de distancia genética más usada es la distancia de Nei (1973, 1977), el cual pretende estimar el número de mutaciones acumuladas a nivel nucleotídico. El número de mutaciones se pueden acumular en las secuencias de dos linajes, esto a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original. En 1973 Nei plantea, que los diferentes alelos identificados por la presencia o ausencia de los loci es originada gracias a que un codón o una base nucleotídicas es distinta (Piñero *et al.*, 2008).

#### 1.4.5.1.2 Coeficiente de Jaccard

Este coeficiente de Jaccard es una expresión matemática muy simple para expresar la semejanza entre comunidades. Este índice establece la relación de presencia o ausencia entre el número de especies comunes en dos áreas (o comunidades) y en el número total de especies (Kent & Coker, 1992).

Este coeficiente se expresa de la siguiente manera:

$$ISJ = [c / (a + b + c)]100,$$

Donde

$ISJ$  = Índice de Semejanza de Jaccard

$a$  = Número de especies exclusivas de la comunidad A

$b$  = Número de especies exclusivas de la comunidad B

$c$  = Número de especies comunes para ambas comunidades

### 1.4.5.2 AMOVA

Los datos moleculares no solo revelan la comparación de la frecuencia de los marcadores moleculares, sino también brindan información sobre la cantidad de diferentes mutaciones entre diferentes genes (Ochoa, 2008). Es por esta razón que se generalizó el método de F de Wrigth en el Análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual tiene menos requerimientos estadísticos y resulta menos sesgado que una estimación de  $F_{st}$  normal. Este método puede estimar a varios niveles y es especialmente útil para datos dominantes (Excoffier *et al.*, 2005)

El AMOVA es equivalente a un ANOVA anidado. Un ANOVA anidado difiere de un ANOVA simple en que los datos se encuentren arreglados jerárquicamente y los cuadrados conocidos son calculados para grupos en todos los niveles jerárquicos. Esto permite probar hipótesis de diferencias entre grupos y dentro de grupos en muchos niveles jerárquicos.

## 1.5 Hipótesis de investigación

La muestras Babaco *ex vitro* e *in vitro* presenta una baja diversidad genética.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Participantes

La presente investigación la realizó la señorita Shirley Monserrat Brito Cabezas. El estudio se inició con la revisión bibliográfica de marcadores moleculares en *Vasconcellea x heilbornii*, para luego continuar con el trabajo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Los colaboradores científicos del trabajo de titulación, previo a la obtención del título de ingeniera en biotecnología en la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, fueron Karina Proaño Ph.D como directora del trabajo, Claudia Segovia Salcedo Ph.D y MS.c Mónica Jadán como colaboradoras científicas y apoyo en la asesoría técnica.

### 2.2 Zona de estudio

#### 2.2.1 Fase de recolección

Las plantas madre élite de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo) fueron recolectadas en el Sector del Triunfo (Baños) en la Provincia de Tungurahua a 2600 m.s.n.m para posteriormente ser analizadas en los laboratorios de biotecnología.

#### 2.2.2 Fase de Laboratorio

La fase de laboratorio se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología Vegetal de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicados en el campus politécnico Sangolquí, cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha.

### 2.3 Período de investigación

La presente investigación fue iniciada en el mes de enero del año 2017 y culminada en el mes de agosto del 2017.

### 2.4 Diseño

El presente trabajo constituye la fase inicial de un estudio experimental, en donde no se dispone de información sobre variabilidad genética de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo). Para el diseño se plantea como unidad experimental a los métodos de propagación analizados. Estos métodos son propagación por estaca (*ex vitro*), propagación por organogénesis directa de ápice (*in vitro*) y propagación por organogénesis directa de hoja (*in vitro*).

Para responder a la hipótesis de investigación es necesario plantear una variable de respuesta, por lo que en esta investigación este parámetro son los diferentes primers que identifican la presencia de polimorfismos de las muestras de babaco (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Lista de primers utilizados en el análisis molecular, empleados como una variable de respuesta.*

N°	PRIMER
1	844A
2	844B
3	17898A
4	17898B
5	17899A
6	HB9
7	HB11
8	HB12

El diseño experimental propuesto es un esquema en estratos y tratamientos. Los estratos son la variable de respuesta (primer), mientras que los tratamientos son las unidades experimentales (métodos de propagación). Adicionalmente, por cada tratamiento se realizó dos replicaciones por cada unidad experimental. El diseño experimental planteado se refleja en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Esquema del diseño experimental propuesto en el estudio de variabilidad genética de clones de babaco.*

PRIMER					
ESTACA		Organogénesis directa ápice		Organogénesis directa hoja	
<b>1</b>	1	1 <sup>a</sup>	1A	1B	1B
<b>2</b>	2	2 <sup>a</sup>	2A	2B	2B
<b>3</b>	3	3 <sup>a</sup>	3A	3B	3B
<b>4</b>	4	4 <sup>a</sup>	4A	4B	4B
<b>5</b>	5	5 <sup>a</sup>	5A	5B	5B
<b>6</b>	6	6 <sup>a</sup>	6A	6B	6B
<b>7</b>	7	7A	7A	7B	7B
<b>8</b>	8	8A	8A	8B	8B
<b>9</b>	9	9A	9 <sup>a</sup>	9B	9B
<b>10</b>	10	10A	10 <sup>a</sup>	10B	10B

## 2.5 Procedimientos

### 2.5.1 Recolección de las muestras vegetales

Las muestras vegetales fueron recolectadas del invernadero del laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, a partir de las plantas madres provenientes de la provincia de Tungurahua. El material vegetal se propagó primero por estacas (*ex vitro*) y posteriormente por cultivo *in vitro*, manteniendo siempre condiciones controladas.

Se realizaron seis subcultivos *in vitro* (organogénesis directa de hoja y ápice) que posteriormente se aclimataron bajo condiciones de invernadero. En el invernadero se realizaron riegos dos veces por semana manteniendo una temperatura entre 15-23°C

con una humedad relativa de 40-50%. Además se aplicó el fungicida Carbendacin (0,5% v/v) y el bioestimulante (GERMO-TB01 1 ml/L) para obtener mayor número de brotes.

Se seleccionaron diez plantas madre propagadas mediante estaca con sus respectivas plantas hijas aclimatadas, correspondientes a la sexta generación. Cada planta se la codificó para su posterior identificación, tomando en cuenta el tipo de propagación (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Muestras vegetales recolectas de babaco con sus codificaciones de los diferentes tipos de propagación.*

<b>Propagación</b>		
<b>Estaca (<i>ex vitro</i>)</b>	<b>Organogénesis directa de ápice (<i>in vitro</i>)</b>	<b>Organogénesis directa de hoja (<i>in vitro</i>)</b>
<b>1</b>	1A	1B
<b>2</b>	2A	2B
<b>3</b>	3A	3B
<b>4</b>	4A	4B
<b>5</b>	5A	5B
<b>6</b>	6A	6B
<b>7</b>	7A	7B
<b>8</b>	8A	8B
<b>9</b>	9A	9B
<b>10</b>	10A	10B

Cada muestra consistió en aproximadamente 4 hojas jóvenes. Las hojas fueron cortadas con herramientas previamente esterilizadas y colocadas en tubos falcon de 15 ml. Posteriormente, los tubos fueron sumergidos en nitrógeno líquido para mantener las muestras congeladas.



## **2.5.2 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se realizó una búsqueda bibliográfica de protocolos usados en plantas con concentraciones altas de metabolitos secundarios. Se trabajó con dos protocolos en función de la cantidad y calidad de ADN que presentaron en trabajos anteriores.

### **2.5.2.1 Protocolo de extracción de ADN de CYMMIT (2006)**

En este protocolo se pesó alrededor de 2 g de hojas limpias sin nervio, para posteriormente triturar con nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino. Se colocó aproximadamente 200 mg de tejido molido en un microtubo de 1,5 ml con 1200µl de la solución amortiguadora CTAB (Tris HCl 1M, NaCl 5M 0.5 EDTA pH 8, CTAB 1 % (p/p) y β-Mercaptoetanol 0.2% (v/v)). Se homogenizó la solución por inversión durante 20 segundos (con suavidad) y se lo llevó a incubación a 65°C en baño maría durante 1h, agitando el tubo cada 10 min.

Luego de enfriar el tubo por 4 – 5 min se añadió 600 µl de cloroformo alcohol isoamílico (CIA 24:1) y se lo homogenizó por inversión durante 5 min. El tubo se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se transfirió la capa acuosa superior a otro microtubo al que se le agregó 1.5 µl de ARNasa A (20 mg/ml). La muestra se incubó durante 30 min a 37°C con agitación y se centrifugó a 6000 rpm por 2 min. Se retiró el sobrenadante y se agregó 300 µl de T.E (Tris HCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0.5 M pH 8). Finalmente se homogenizó por inversión y se incubó toda la noche a 4°C.

Transcurrida la noche se agregó 130 µl de fenol cloroformo 1:1 y se lo centrifugó a 6000 rpm por 10 min. Posteriormente se transfirió la capa acuosa a otro tubo y se colocó 130µl de cloroformo: alcohol isoamílico, se homogenizó y nuevamente se centrifugó la muestra por 10 min a 6000 rpm. Se transfirió la capa acuosa nuevamente

a un nuevo tubo y se precipitó el ADN agregando 50  $\mu$ l de NaCl y 130 $\mu$ l de EtOH absoluto. Se centrifugó el tubo a 10000 rpm durante 6 min (en este paso se precipita y forma el pellet) y se añadió 1 ml del Lavado 1 (76% Etanol, 0.2M NaOAc) para luego incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Se descartó el exceso del lavado y se procedió a colocar 1 ml de la solución del Lavado 2 (76% Etanol, 10mM NH<sub>4</sub>OAc) durante 10 min. Finalmente se descartó el lavado 2 y se secó a temperatura ambiente. Al pellet seco se le añadió 2 ml con TE 1x (Tris HCl 1M, NaCl 5M, EDTA 0.5 M pH 8).

#### **2.5.2.2 Protocolo de extracción de ADN de Khanuja, Shasany, Darokar & Kumar (1999)**

En este protocolo se tomó 200 mg de muestra foliar y se trituró en el mortero con nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino. Se transfirió el material molido a microtubos estériles de 1,5 ml con 1200  $\mu$ l de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8.0; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8.0; CTAB 0 2.5%, 2b-mercaptoetanol 0,2% (v/v)) y se lo incubó a baño maría a 65°C por 2 horas con agitación leve cada 20 min.

Terminada la lisis los tubos se enfriaron por 5 minutos, seguido de esto se añadió un volumen de 300  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico CIA (24:1), se agita por inversión y se centrifugó a 6000 rpm por 20 min a TA (22°C). Se trasladó el sobrenadante a un tubo estéril y se añadió 300  $\mu$ l de NaCl 5M invirtiendo suavemente. Posteriormente se colocó 600  $\mu$ l de etanol puro a -20°C y se dejó reposar por al menos 30 min a -20°C. Transcurrido el tiempo de incubación a -20°C se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 20 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 150  $\mu$ l de etanol al 80% a -20°C. En este paso se deja que se seque el pellet al ambiente y adicionalmente se colocó 150  $\mu$ l de TE (Tris HCl 10mM, NaCl 1M, EDTA 1mM pH 8) alto en sales y se almacenó toda la noche a 4°C.

Una vez transcurrida la noche se añadió 1,5  $\mu$ l de RNAsa y se incubó a 37°C en baño maría por 1 hora, y luego se colocó 75  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico (CIA

24:1). Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 min y se transfirió cuidadosamente la capa acuosa a un tubo nuevo, a esto se añadió 450µl de etanol al 95% a -20°C y se dejó en reposo por 30 min. Se centrifugó nuevamente y se dejó secar al ambiente, en este paso para el último lavado se añadió 150µl de etanol al 80% a -20°C, se eliminó el etanol, se deja secar y se centrifugó por última vez a 14000 rpm por 5 min para finalmente resuspenderlo en 150µL de TE.

### **2.5.3 Cuantificación y pureza del ADN**

Las soluciones de ADN obtenidas se cuantificaron por espectrofotometría en el NanoDrop® Thermo Scientific 2000 y electroforesis en geles de agarosa. Estos métodos proporcionan una estimación simple y precisa de la concentración la muestra (SGIKER, 2008). En la cuantificación por espectrofotometría los valores de concentración y valores de relación 260/280 (ADN/Proteínas) y 260/230 (ADN y solventes orgánicos) aportaron información sobre la pureza del producto (Thermo Fisher Scientific Inc, 2009). Los datos obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa nos indican la pureza, el grado de degradación y la cuantificación por la intensidad de la banda (Khanuja, Kumar, Shasany, & Darokar, 1999).

### **2.5.4 Electroforesis**

La electroforesis del ADN se llevó a cabo empleando gel de agarosa al 1% (p/v) preparado con TBE 1X, en un proceso de calentamiento y agitación continua hasta que la disolución total de la agarosa. Cuando la temperatura de la solución se encontró alrededor de los 40°C se colocó SYBR SAFE (0,035µl por cada ml de solución). Finalmente se vertió el contenido en la cubeta de la cámara de electroforesis (con la peineta de los posillos) y se esperó hasta que se gelifique en su totalidad.

El gel se colocó en la cámara de electroforesis y en cada posillo se cargó 8µl de ADN con 2µl de loading Buffer Blue Juice 10X INVITROGEN®. Además, se cargó 5µl de un marcador de peso molecular High DNA Mass Ladder INVITROGEN® para cuantificar el ADN mediante la comparación de la intensidad de las bandas. La corrida electroforética se realizó con la fuente de poder a 120 V 300mA durante una hora y su posterior visualización de las bandas y almacenamiento de la información se realizó en el fotodocumentador *BioDoc-IT System*.

### 2.5.5 Amplificación de fragmentos de ADN mediante primers ISSR

En la amplificación de fragmentos de ADN se aplicaron los primers ISSR descritos en la Tabla 6 (Ochoa *et al.*, 2008). Estos primers presentaron buenos resultados en previas investigaciones de variabilidad (McCauley & Ballard, 2002 Shen *et al.*, 2006).

**Tabla 6**

*Lista de Primers utilizados en el análisis molecular y sus respectivas secuencias*

N°	PRIMER	SECUENCIAS 5' a 3'
1	844A	5' ctctctctctctctac 3'
2	844B	5' ctctctctctctctgc 3'
3	17898A	5' cacacacacacaac 3'
4	17898B	5' cacacacacacagt3'
5	17899A	5' cacacacacacaag 3'
6	HB9	5' gtgtgtgtgtgtgg 3'
7	HB11	5' gtgtgtgtgtgtcc 3'
8	HB12	5' caccaccacgc 3'

Fuente: (Ochoa *et al.*, 2008; McCauley & Ballard, 2002)

El ensamblaje de las soluciones se lo realizó en la cámara de flujo laminar tipo II CSB 120 con reactivos INVITROGEN®. El ensayo se realizó en dupletas con un control negativo, el cual nos permite determinar si existe contaminación de los reactivos (Basha & Sujatha, 2009). Este control presenta todos los reactivos para ejecutar una PCR exceptuando la solución de ADN. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador TECHNE-TC-512.

Para las condiciones de temperatura y concentración de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) se verificaron las condiciones establecidas por Ochoa *et al.* (2008). En la Tabla 7 se muestran las concentraciones iniciales y finales de los reactivos para la ejecución de la PCR.

**Tabla 7**

*Lista de Primers utilizados en el análisis molecular y sus respectivas secuencias*

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Final (µl)
Buffer	10X	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1,5mM	0,75
dNTP's	10mM	0,15mM	0,375
Primer	10uM	0,8uM	2
Taq-polimerasa	5 U/ul	1U/ul	0,4
Agua	-	-	18,021
DNA	262,1	10 ng/ul	0,954
<b>TOTAL</b>			25 µl

La Tabla 8 indica las temperaturas utilizadas en la programación del termociclador (denaturación inicial, denaturación por ciclo, alineamiento y extensión).

**Tabla 8**

Condiciones de temperatura y tiempo para la amplificación de secuencias de ISSR's en la PCR.

Fases		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<b>Denaturación Inicial</b>		94	2
<b>40 Ciclos</b>	Denaturación	94	0,5
	Alineamiento	*	0,75
	Extensión	72	2
<b>Extensión Final</b>		72	7

\*Condiciones dependiente del primer.

La temperatura de alineamiento teórica es específica de cada primer y depende del número y tipo de las bases nitrogenadas de las cuales está formado, es por ello que se tiene que calcular mediante la siguiente fórmula:


$$T_m = 2(A + T) + 4(C+G)$$

$$T_a = T_m - 4$$

La tabla 9 muestra las temperaturas (melting y alineamiento) calculadas de los primer y los rangos establecidos para analizar la temperatura a la cual los productos amplificados presentan mejor calidad. Los ensayos para los 8 primers fueron independientes. Se elaboró un programa en el termociclador de gradiente *Techne- TC-512* para cada uno de ellos.

**Tabla 9**

Temperatura calculada de melting y temperatura teórica alineamiento para cada primer y rangos de temperaturas ensayadas.

Primer	Tm calculada	Ta teórica [°C]	Rangos de Ta para los ensayos [°C]
<b>844A</b>	54	50	49, 52, 53, 55
<b>844B</b>	56	52	51, 52, 53, 54
<b>17898A</b>	42	38	38, 40, 42, 46
<b>17898B</b>	42	38	40, 41, 42, 43
<b>17899A</b>	42	38	38, 40, 42, 44
			<b>CONTINUA</b> 

<b>HB9</b>	44	40	43, 46, 47, 48
<b>HB11</b>	44	40	44, 45, 46, 47
<b>HB12</b>	38	34	35, 36, 38, 40

Una vez que se establecieron las temperaturas óptimas para cada primer se procedió a la estandarización de las concentraciones del MgCl<sub>2</sub> para cada uno de los marcadores moleculares ISSR. Cabe destacar que las concentraciones de los reactivos de la Tabla 2.5 se mantuvieron constantes. Las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> probadas durante los ensayos fueron de 1,25 mM; 1,5 mM; 1,8 mM. La solución madre para todas las reacciones se generaron con reactivos INVITROGEN® y su ensamblaje se lo desarrolló dentro de una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120.

Finalmente, cuando se estandarizaron las concentraciones y las temperaturas óptimas de cada marcador se procedió a trabajar con cada ADN de las diferentes muestras (*ex vitro* e *in vitro*). Es importante tomar en cuenta que para cada muestra las concentraciones de ADN varían, por lo que el ensamblaje de la solución madre va a depender del primer con el que se va a trabajar, la concentración de MgCl<sub>2</sub> y la concentración del ADN.

Por tanto para el análisis de todos los individuos fueron necesarias aproximadamente 60 reacciones de PCR, independientemente de las reacciones para la estandarización de las condiciones de amplificación.

### 2.5.6 Visualización de productos amplificados

El análisis de los productos amplificados se realizó a través de la elaboración de geles de agarosa al 1.5% (Shobhana *et al.*, 2012) en tampón TBE 1X. Además se colocó en el último posillo 5 µl del marcador molecular Low Mass Ladder para conocer el tamaño de las bandas amplificadas.

La corrida electroforética se fijó en 120 V y 300 mA durante una hora (hasta que la marca del Blue Juice recorrió tres cuartas partes del gel). En la visualización de las bandas y el almacenamiento de la información se utilizó en el fotodocumentador BioDoc-IT System

### 2.5.7 Registro de datos

Los perfiles de bandas generados por los ISSR se compilaron en una matriz binaria de datos basada en la presencia (1) o la ausencia (0) de la banda seleccionada (Shobhana *et al.*, 2012). La matriz que se encuentra detallada en el ANEXO A. Esta contiene todos los loci analizados por cada primer y para cada población del estudio. Posteriormente, la matriz fue ingresada en el formato del programa GenAlex 6.1. Las bandas fueron marcadas como presentes solo si se encontraron presentes en las dos réplicas de cada muestra. La matriz es la base para el análisis en los programas bioestadísticos para el estudio de genética poblacional.

### 2.5.8 Análisis de variedad

La información de variedad que se mostró en los primers fue a través del cálculo del porcentaje de bandas polimórficas (PPB) y su poder de resolución (Prevost & Wilkinson 1999; Salhi-Hannachi *et al.*, 2005) para ISSR según el método descrito por Gilbert *et al.* (1999):

$$Rp = \sum Ib ; Ib = 1 - (2 | 0.5 - p |)$$

$p$  = Proporción de accesiones que contienen una banda I

Dentro de este análisis también se realizó el cálculo de las frecuencias de presencias ( $p$ ) para cada loci. Se dividió la cantidad de fragmentos amplificados (1) entre el total de individuos mientras que la frecuencia de ausencias ( $q$ ) se obtuvo restando 1 menos el valor de  $p$ . Los loci con una frecuencia de presencia de banda  $p$ )



menores a 0.05 se consideraron alelos raros. Los loci con una frecuencia de presencia de banda ( $p$ ) igual a 1.0 son considerados monomórficos. Para conocer la utilidad de los marcadores moleculares, se calculó el *Polymorphic Index Content* (PIC) para cada locus con la siguiente fórmula:

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

$f_i$  = Frecuencia de la banda presente

Finalmente, se sumaron todos los valores PIC para cada iniciador ISSR, generando sus respectivos índices informativos ISSR (basado en Ghislain *et al.*, 1999)

#### **2.5.8.1 Cálculo de distancias genéticas**

Los índices de distancias genéticas se calcularon entre las poblaciones establecidas, en las cuales se muestran el grado de diferencia genética entre las tres poblaciones. Los coeficientes de similitud en el emparejamiento de las bandas incorporan sólo bandas que están presentes usando los coeficientes como Jaccard y Nei (1973, 1977). Estos coeficientes comparan las bandas compartidas entre individuos o poblaciones. Estos índices son una ventaja, ya que la ausencia de las bandas puede ser excluida del análisis puesto que se asume el equilibrio Hardy-Weinberg (Lynch & Milligan, 1994; Gonz & Aguirre, 2000).

Los coeficientes de similaridad se calcularon para cada población a partir de la matriz binaria en los programas bioestadísticos POPGENE 1.32 y GenAlex 6.0 que nos permitieron los cálculos con datos cualitativos. Tanto POPGENE 1.32 como GenAlex 6.0 generan una matriz cuadrática de similaridad y desimilaridad a partir de la cual se elabora en Excel una matriz de contingencia triangular para cada coeficiente.

Con los datos obtenidos se graficó un dendograma o árbol fenético y una gráfica de análisis de componentes. Para ello se utilizó ambos coeficientes de asociación mencionados, este tipo de representación permite apreciar claramente las

relaciones de agrupación entre los datos e incluso entre grupos de ellos aunque no las relaciones de similitud o cercanía entre categorías.

#### **2.5.8.2 Análisis de la diferenciación genética**

Con la finalidad de entender la diversidad molecular entre todos los miembros de la colección estudiada, se realizó un análisis multivariado de los 55 loci con el método de AMOVA (Análisis de la varianza molecular). Este análisis admite los datos generados por marcadores ISSR. El Análisis de Varianza Molecular se realizó con datos en una matriz de distancia calculados previamente.

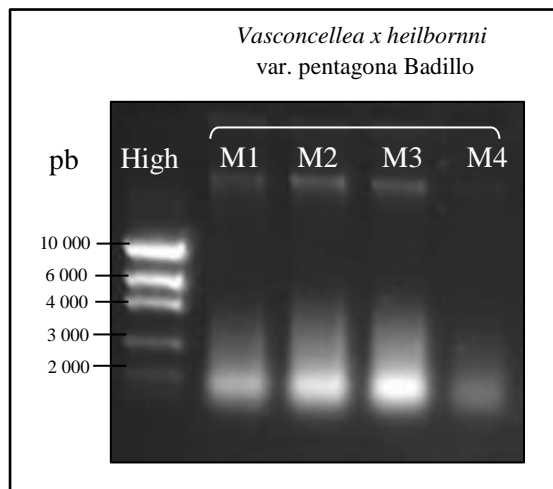
La diferenciación genética se examinó con un análisis jerárquico de varianza molecular AMOVA, usando programas estadísticos como Alerquín 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) y GenAlex 6.0

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Extracción y cuantificación de ADN

Las extracciones de ADN con los dos protocolos planteados en esta investigación fueron analizadas mediante la intensidad de las bandas en el gel agarosa al 1%.

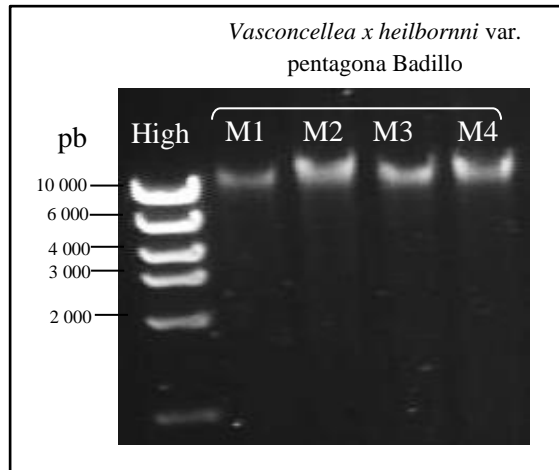
En la figura 6 se presenta la corrida electroforética de la extracción de ADN de babaco con el protocolo CYMMIT (2006). En esta figura se puede observar bandas tenues sobre los 10000 pb con una concentración de 40-60 ng/μl aproximadamente, parámetros de acuerdo con el marcador de alto peso molecular utilizado (Cat N° 10496-016). Así mismo, se visualizó señales de degradación en las muestras debido a la presencia de ADN degradado a lo largo del gel.



**Figura 6** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de CYMMIT (2006). En el gel se encuentra el marcador High DNA Mass Ladder y las soluciones de ADN de las muestras vegetales de babaco (M1, M2, M3, M4).

En cambio, las extracciones de ADN realizadas con el protocolo de Khanuja, Shasany, Darokar & Kumar (1999), mostraron bandas definidas de ADN. En figura 7

se puede observar las bandas sobre los 10000 pb con una concentración de 120-200 ng/ $\mu$ l aproximadamente según al marcador de peso molecular utilizado.



**Figura 7** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Khanujan et al. (1999). En el gel se encuentra el marcador High DNA Mass Ladder y las soluciones de ADN de 4 muestras (M1, M2, M3, M4) vegetales de babaco

Según los datos obtenidos, el protocolo que mostró mejores resultados fue el protocolo propuesto por Khanujan y colaboradores en 1999. Debido a la mayor concentración y poca degradación de ADN que presentó este protocolo fue el que se empleó en las extracciones de las 30 muestras analizadas en la presente investigación. La medición de la concentración y pureza (relación 260/280 y 260/230) de ADN de todas las muestras vegetales (*ex vitro* e *in vitro*) se realizó mediante espectrofotometría en el Nanodrop (Thermo Scientific 2000). Los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10**

Valores de concentración y pureza realizadas en el Nanodrop Thermo Scientific 2000 de cada muestra vegetal en estudio.

Codificación de la Muestra	Concentración ng/ $\mu$ l	Pureza	
		260/280	230/260
1	437,2	1,89	1,46
1A	333,4	1,90	1,21
1B	16,1	1,80	1,90
CONTINÚA		➔	

<b>2</b>	550,0	2,09	2,04
<b>2A</b>	76,4	2,06	1,79
<b>2B</b>	75,4	2,05	1,49
<b>3</b>	66,9	1,77	0,92
<b>3A</b>	886,9	1,90	1,60
<b>3B</b>	2277,4	2,05	2,01
<b>4</b>	68	1,79	0,93
<b>4A</b>	488,7	2,03	1,89
<b>4B</b>	478,0	2,00	1,78
<b>5</b>	195	1,86	1,43
<b>5A</b>	253,2	2,03	1,70
<b>5B</b>	677,9	2,06	1,92
<b>6</b>	45,1	1,85	1,76
<b>6A</b>	629,9	2,08	2,04
<b>6B</b>	251,0	2,05	1,86
<b>7</b>	366,8	2,04	1,86
<b>7A</b>	763,8	2,09	2,06
<b>7B</b>	463,8	2,11	2,11
<b>8</b>	273,3	1,98	2,04
<b>8A</b>	601,6	2,08	2,14
<b>8B</b>	848,8	2,09	2,01
<b>9</b>	166,0	2,01	1,53
<b>9A</b>	629,9	2,08	2,06
<b>9B</b>	234,8	1,95	1,46
<b>10</b>	75,3	2,04	1,77
<b>10A</b>	324,1	2,03	1,89
<b>10B</b>	691,4	2,11	2,14

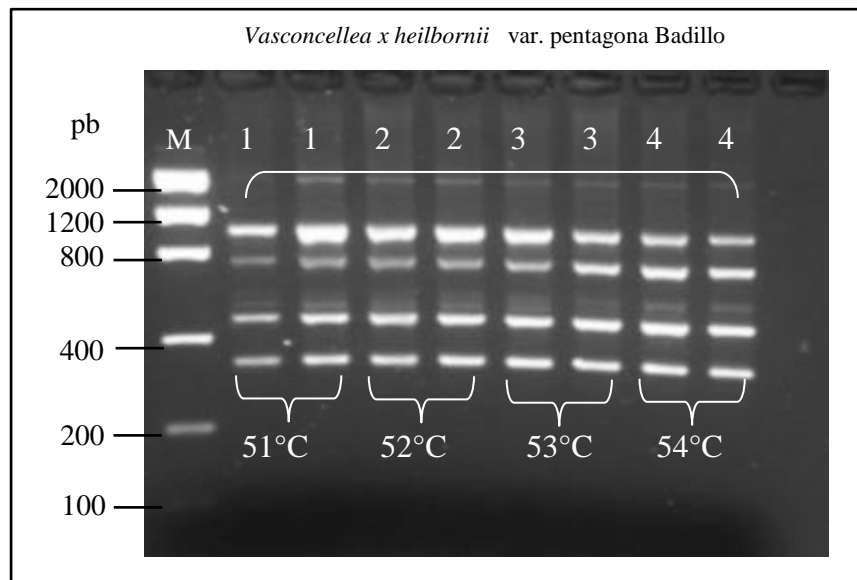
Estos resultados mostraron una buena concentración y pureza del ADN extraído, lo cual permitió realizar los ensayos con los marcadores moleculares.

## 3.2 Estandarización de las condiciones de temperatura y $MgCl_2$ para la amplificación de ISSR

### 3.2.1 Estandarización de la temperatura de alineamiento

La temperatura es un parámetro importante en la amplificación de los ISSRs mediante PCR. Las temperaturas para la amplificación de los ISSR se mantuvieron según lo descrito en la Tabla 2.6 de *Materiales y Métodos*, a excepción de la temperatura de alineamiento que se optimizó en este ensayo para cada uno de uno de los primers utilizados.

Los ensayos para determinar la temperatura de alineamiento se realizaron en relación a las temperaturas teóricas calculadas de la (Tabla 2,7 de *Materiales y métodos*). Como ejemplo tenemos al ensayo realizado con el primer 844A. Este primer presenta una temperatura calculada de 52°C por lo que en los ensayos se sometió al primer a temperaturas de entre 51°C a 54°C con variación de 1°C. En la figura 8 se puede observar las bandas obtenidas a partir de la amplificación de este primer.



**Figura 8** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ensayo de pruebas de temperaturas del primer 844B. Se utilizó un solo individuo con dos repeticiones cada uno y marcador molecular Low Mass Ladder

En la figura se puede visualizar que todas las temperaturas ensayadas amplificaron siete bandas a lo largo del gel. Sin embargo, a los 51°C las bandas se muestran tenues a comparación de las muestras que se amplificaron a 54°C. Es así, que la temperatura óptima de alineamiento que se definió para el primer 844B fue de 54°C, ya que a esta temperatura se logran definir completamente las bandas entre los 1000 y 180 pb.

A partir de la estandarización de temperaturas de cada uno los primers, se desarrolló la Tabla 11, en la cual se resumen las temperaturas de alineamiento estandarizadas para los ocho primers. El patrón con el mayor número de bandas definidas, fue el parámetro que ayudó en la definición de la temperatura óptima de alineamiento.

**Tabla 11**

*Temperaturas de alineamiento estandarizadas para los 8 primers de estudio.*

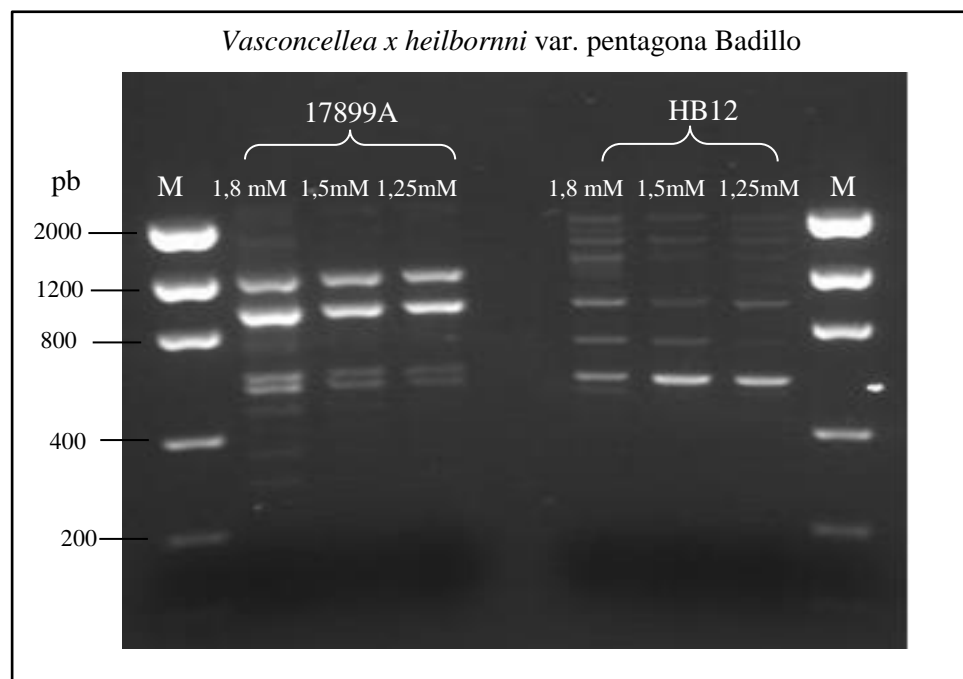
Primer	Secuencia	Ta estandarizada
<b>844A</b>	<b>5' ctctctctctctctac 3'</b>	52
<b>844B</b>	<b>5' ctctctctctctctgc 3'</b>	54
<b>17898A</b>	<b>5' cacacacacacaac 3'</b>	42
<b>17898B</b>	<b>5' cacacacacacagt 3'</b>	42
<b>17899A</b>	<b>5' cacacacacacaag 3'</b>	40
<b>HB9</b>	<b>5' gtgtgtgtgtgtgg 3'</b>	47
<b>HB11</b>	<b>5' gtgtgtgtgtgtcc 3'</b>	45
<b>HB12</b>	<b>5' caccaccacgc 3'</b>	40

La estandarización de temperaturas de alineamiento para cada uno de los primers, sirvió para estandarizar la concentración de MgCl<sub>2</sub>, ya que este es otro factor importante en la amplificación de productos mediante PCR.

### 3.2.2 Estandarización del MgCl<sub>2</sub>

La concentración de MgCl<sub>2</sub> es otro factor crucial que interviene como reactivo en el coctel empleado en la PCR para la amplificación de los ISSRs. Las concentraciones de los reactivos empleados para esta estandarización se detallan en la Tabla 2.5 de *Materiales y métodos*. En la optimización de MgCl<sub>2</sub>, se tomó en cuenta el patrón de bandas usado en la selección de las temperaturas de alineamiento para los ocho primers.

En este experimento se probaron concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de 1,25 mM; 1,5 mM; 1,8mM con diferentes primers. Es importante recalcar que en todos los ensayos se observó un menor número de bandas o un patrón de bandas tenue en la concentración de 1,25mM. A manera de ejemplo en la figura 9 se muestra el ensayo con los primers 17899A y HB12. Así, en la figura se puede divisar que para los primers 17899A y HB12 la concentración a la que amplifican mayor número de bandas definidas fue de 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub>.



**Figura 9** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ensayo de pruebas de concentraciones de MgCl<sub>2</sub> de los primer 17899A y HB12. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y marcador molecular Low Mass Ladder.



En la Tabla 12 se resume las concentraciones de  $MgCl_2$  estandarizadas para cada primer. EL criterio de la selección para la concentración fue número, intensidad y definición de las bandas amplificadas.

**Tabla 12**

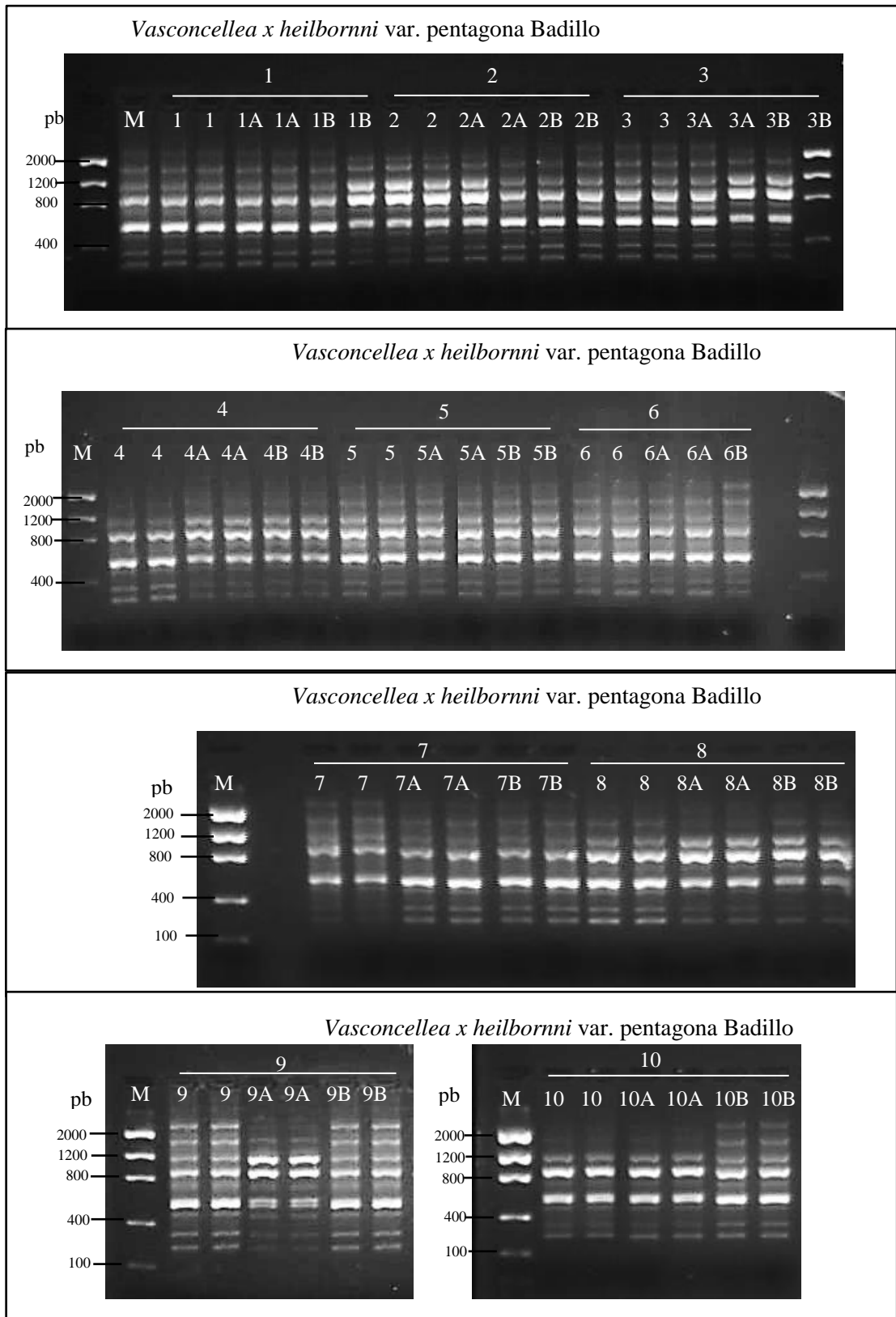
*Concentraciones de  $MgCl_2$  a la cual logran visualizarse mejor las bandas para cada uno de los ocho primer*

Primer	Concentraciones de $MgCl_2$
<b>844A</b>	1,5 mM
<b>844B</b>	1,5 mM
<b>17898A</b>	1,8 mM
<b>17898B</b>	1,8 mM
<b>17899A</b>	1,8 mM
<b>HB9</b>	1,8 mM
<b>HB11</b>	1,5 mM
<b>HB12</b>	1,8 mM

La temperatura de alineamiento junto con la concentración  $MgCl_2$  son elementos imprescindibles en amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR.

### 3.3 Amplificación de fragmentos de ADN mediante primers ISSRs

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se utilizaron ocho marcadores moleculares ISSR. Los productos de amplificación en todas las muestras presentaron patrones de bandas similares con todos los diferentes primers analizados (ANEXO B). En la figura 10 se puede visualizar como ejemplo el ensayo realizado con el primer 17898B en geles de agarosa al 1.5%, donde el patrón de bandas es similar en un rango de tamaño de 420 a 2000pb, en todas las muestras vegetales analizadas tanto de estaca como de organogénesis directa de ápice y organogénesis directa de hoja. El uso del marcador molecular Low Mass Ladder facilitó la aproximación del tamaño de las bandas en los diferentes geles.



**Figura 10** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 17898B de las tres poblaciones (1-10= Estaca, 1A-10A= Organogénesis directa de ápice, 1B-10B=Organogénesis directa de hoja).

La notable similitud entre los distintos grupos es relevante, los patrones de amplificación con los ocho primers, es repetitivo en las 3 poblaciones. La amplificación de las muestras con los ocho diferentes primers se muestran en los ANEXOS B - H

La amplificación de los productos de PCR con el primer 17899A mostró un total de 10 bandas (ANEXO B). En algunos de los individuos las bandas se encontraron tenues o muy cercanas entre sí (1, 5, 5A, 5B), lo que dificultó la visualización exacta de los patrones para marcar dentro de la matriz binaria. El rango de tamaño de bandas, comparas con el marcador Low Mass Ladder fue de 350- 2000pb.

La amplificación con el primer 844A, presentó dos bandas definidas para las poblaciones con un tamaño aproximado de 800-700 pb (ANEXO C). Sin embargo los individuos 2A y 9 no presentaron una de las bandas, por lo que fueron marcadas como 0 dentro de la matriz.

Para el primer 844B se amplificaron un total de seis bandas, excepto para las muestras 4B y 6 en las que se observa ausencia de una banda (ANEXO D). Se observó bandas tenues en los individuos 3,3A y 3B. El rango aproximado de bandas fue de 350 a 2000pb.

En el ANEXO E, se observa el primer 17898A donde el patrón de bandas fue similar entre todos los individuos de las poblaciones. Se observó un total de 7 bandas con un rango de tamaño de 500- 2000 aproximadamente.

El primer HB9 se visualiza en el ANEXO F. En este ensayo se logró la amplificación de 8 bandas con un tamaño aproximado de 400 a 1200 pb. Las bandas menos definidas se encontraban en el individuo 4.

El ensayo con el primer HB11, se obtuvo la amplificación de seis bandas definidas con un tamaño de 480 a 2000 pb (ANEXO G). Sin embargo, para los individuos 3,3A y 3B el patrón de bandas fue tenue a comparación del resto. Finalmente con el primer HB12 se obtuvo un total de 8 bandas con un tamaño aproximado de 400 a 2000 pb.

La Tabla 13 resume el total de bandas amplificadas y sus respectivos tamaños para cada uno de los primers.

**Tabla 13**

*Tabla resumen del total de bandas amplificadas por cada primer y el rango del tamaño en pares de bases*

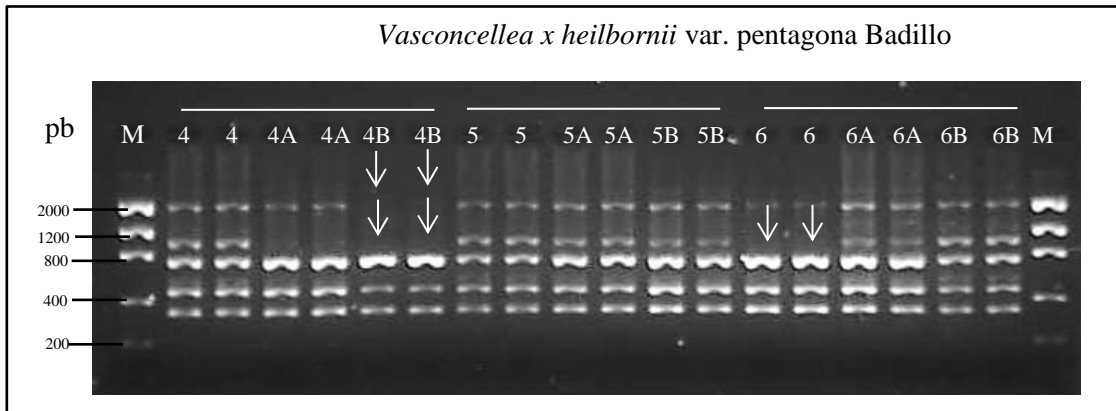
<b>PRIMER</b>	<b>Número de bandas</b>	<b>Rango del Tamaño de bandas (pb)</b>
<b>844A</b>	2	800-700
<b>844B</b>	6	350-2000
<b>17898A</b>	7	500-2000
<b>17898B</b>	8	420 -3000
<b>17899A</b>	10	350-2000
<b>HB9</b>	8	400-1200
<b>HB11</b>	6	480 - 2000
<b>HB12</b>	8	405- 2000
<b>Total</b>	55	

En el estudio se determinó un total de 55 bandas generadas que fueron introducidas dentro de la matriz binaria para el posterior análisis de la variedad genética.

### **3.4 Análisis de variabilidad**

Con el objeto de determinar la variabilidad de las muestras se analizó el porcentaje de polimorfismo de toda la población y entre poblaciones, el poder de resolución de cada primer ( $R_p$ ) y el índice de contenido polimórfico (PIC).

Al calcular el porcentaje de polimorfismo en la amplificación de los 30 individuos del estudio con los ocho primer, se obtuvieron 55 bandas con un promedio aproximado de 7 bandas por primer. De las 55 bandas generadas, 41 fueron monomórficas y 14 polimórficas lo que equivale a un 74,55% y 25.45% respectivamente. En el cálculo de bandas polimórficas se tomó en cuenta las bandas que mostraron ausencia en al menos uno de los 30 individuos, que representaron un total de 14 bandas no amplificadas. En la figura 11 se observa como ejemplo la amplificación con el primer 844B, donde la ausencia de banda en las muestras 4A, 4B y 6 mostró un patrón de ausencias en la matriz binaria (ANEXO A), dando como resultado un total de 25.45% de bandas polimórficas.



**Figura 11** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados con el primer 844B. Las flechas indican la ausencia de bandas las que fueron marcadas dentro de la matriz binaria.

El porcentaje de polimorfismo de las tres poblaciones estudiadas (estaca, organogénesis directa de ápice y organogénesis directa de hoja), utilizando el programa bioinformático GenAlex 6.1 determinó un porcentaje promedio de 16,36% de polimorfismo. El mayor porcentaje de polimorfismo encontrado fue en el grupo de muestras vegetales provenientes de la propagación por organogénesis directa de hoja con un 23.64%. En la Tabla 14 se presenta los porcentajes de polimorfismo de cada población analizada.

**Tabla 14**

*Porcentaje de polimorfismo de las poblaciones estudiadas: estaca, organogénesis indirecta de ápice y organogénesis directa de hoja*

Población	Porcentaje de polimorfismo
Estaca ( <i>ex vitro</i> )	14,55%
Organogénesis directa ápice ( <i>in vitro</i> )	10,91%
Organogénesis directa hoja ( <i>in vitro</i> )	23,64%
Promedio	16,36%
SE	3,78%

Se analizó además el polimorfismo entre poblaciones, es decir de los 10 individuos en estudio, obteniendo un porcentaje promedio de polimorfismo de 4.55%.

Se pudo observar que el valor más alto de polimorfismo fue para los individuos del primer grupo (1, 1A y 1B) con 9,09% posiblemente a la presencia de alteraciones dentro de su estructura génica que provocaría mutaciones puntuales. La Tabla 15 indican los porcentajes de polimorfismos de cada individuo analizado.

**Tabla 15**  
*Porcentaje de polimorfismo cada uno de los 10 individuos analizados en el estudio.*

Individuos	Porcentaje de polimorfismo
1	9,09%
2	1,82%
3	5,45%
4	5,45%
5	7,27%
6	3,64%
7	1,82%
8	1,82%
9	5,45%
10	3,64%
<b>Promedio</b>	4,55%
<b>SE</b>	0,78%

En contraste en la tabla 16 los individuos 2, 7, y 8 muestran un bajo porcentaje de polimorfismo de 1.82% posiblemente se debe a que son los que menos variaciones presentaron en su amplificación y son los individuos más cercanos genéticamente se encuentran.

El poder de resolución (Rp) es un análisis indica la capacidad que tiene cada primer para dividir a todos los genotipos en dos grupos (Salinas, 2010). Para conocer el Rp de los ocho primers se calculó el índice de banda (Ib), donde se determina la proporción de todos los individuos que contienen las bandas analizadas. Los datos obtenidos en la tabla 3.7 reflejan bajos valores Rp, lo que se puede deber a que los

individuos son clones de una planta madre y no presentan una diferenciación significativa entre genotipos. La tabla 16 además contiene los valores calculados PIC que también establecen la robustez de un primer.

**Tabla 16**

*Valores de resolución de primer (Rp) y PIC para los ocho primers utilizados en el estudio.*

Primer ISSR	Resolución del primer (Rp)	PIC
844A	0,26	0,23
844B	0,53	0,45
17898A	0,47	0,41
17898B	0,66	0,06
17899A	0,13	0,13
HB9	0,66	0,57
HB11	0,13	0,13
HB12	0,47	0,42

El cálculo del PIC se realiza a través de la aplicación de la fórmula  $PIC_i = 2fi(1 - fi)$  el cual está representado por la probabilidad de que el marcador esté presente o ausente en dos individuos aleatorios de la población (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000). En este análisis se observó los valores calculados de PIC, van desde 0,13 a 0,57 con un promedio de 0,30. Se puede decir que el poder informativo de los primers es bajo al presentar un valor de PIC menor a 0,5 ya que las muestras son provenientes de propagación clonal *ex vitro* e *in vitro*.

### 3.5 Distancias genéticas

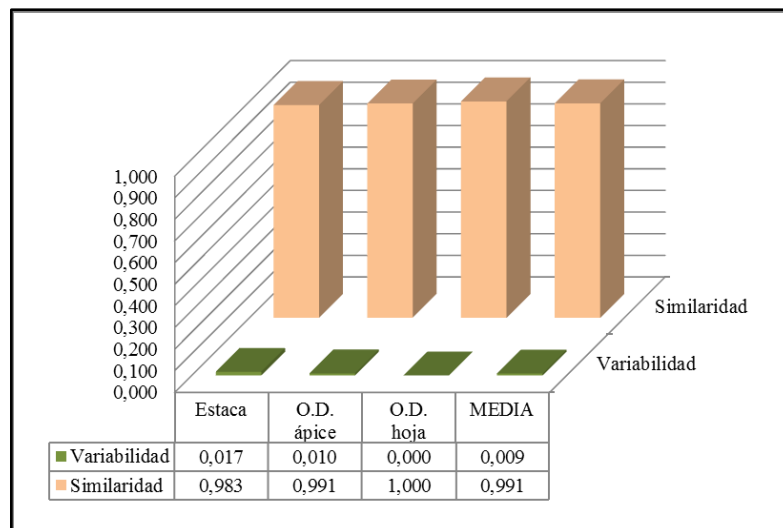
Los datos generados en la matriz binaria (ANEXO A) fueron utilizados para calcular los diferentes parámetros de distancias como la variabilidad y similaridad. Los coeficientes de Nei fueron medidos tanto para las poblaciones como para los individuos mediante programas bioinformáticos. En la figura 12 se observa el resultado de las

matrices de contingencia triangular de variabilidad y similitud de las tres poblaciones que nos proporcionan información sobre las distancias genéticas entre las tres poblaciones.

Variabilidad			
Estaca	O.D. ápice	O.D. hoja	
0,000			Estaca
0,019	0,000		O.D. ápice
0,031	0,019	0,000	O.D. hoja
Similitud			
Estaca	O.D. ápice	O.D. hoja	
1,000			Estaca
0,981	1,000		O.D. ápice
0,970	0,981	1,000	O.D. hoja

**Figura 12** Matriz de contingencia triangular en base al coeficiente de disimilaridad de Nei de las tres poblaciones. Estaca, Organogénesis directa de ápice (O.D.ápice), Organogénesis directa de hoja (O.D. hoja).

Al promediar estos datos se obtuvo una media para diversidad genética de 0,009 y una media de similitud 0,991 entre las poblaciones de estaca, organogénesis directa de ápice y organogénesis directa de hoja. Al representar gráficamente estos datos se puede observar en la figura 13 que entre las tres poblaciones la variabilidad no es significativa.



**Figura 13** Representación gráfica de los valores de variabilidad y similitud promediados a partir del coeficiente de similitud de Nei. Comparación entre Estaca, Organogénesis directa de ápice (O.D. ápice), Organogénesis directa de hoja (O.D. hoja).

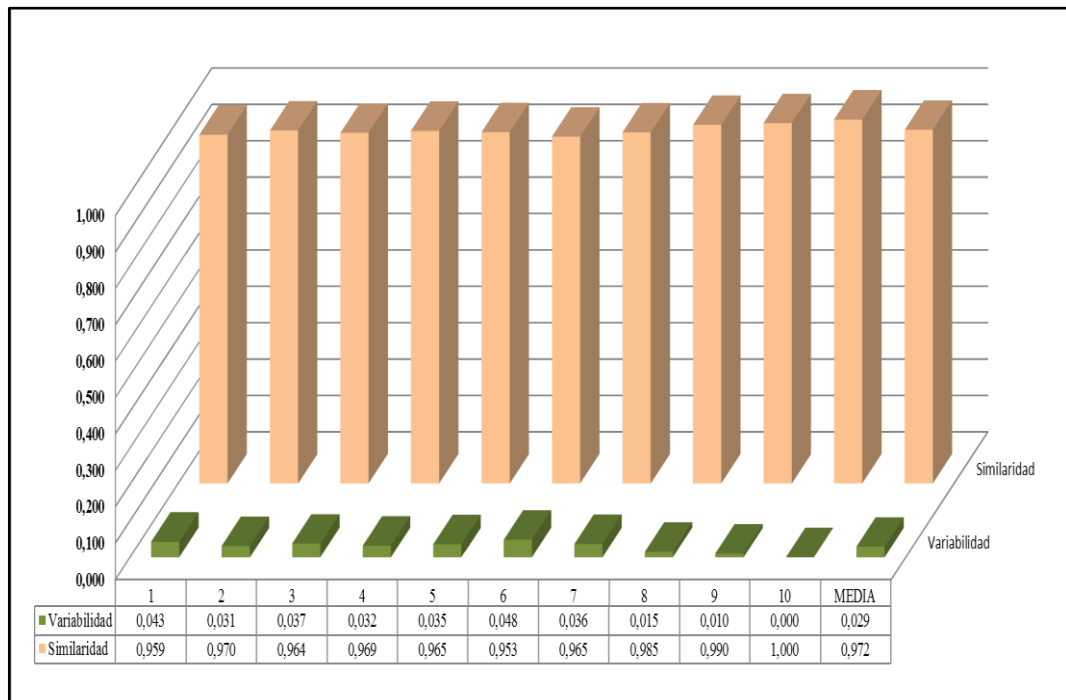


De igual forma, a partir de la matriz binaria (ANEXO A) se realizó el cálculo del índice de Nei para cada individuo, en la cual en la figura 14 se puede observar matrices de similitud y disimilitud obtenidas. Estas matrices proporcionan información sobre las distancias genéticas entre los individuos en estudio.

Variabilidad										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0,000										1
0,044	0,000									2
0,052	0,031	0,000								3
0,052	0,031	0,025	0,000							4
0,058	0,038	0,045	0,019	0,000						5
0,085	0,045	0,071	0,057	0,042	0,000					6
0,064	0,044	0,050	0,050	0,057	0,051	0,000				7
0,026	0,025	0,031	0,031	0,038	0,063	0,044	0,000			8
0,026	0,038	0,044	0,032	0,038	0,064	0,057	0,038	0,000		9
0,019	0,025	0,031	0,031	0,038	0,064	0,044	0,007	0,020	0,000	10
Similitud										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1,000										1
0,957	1,000									2
0,950	0,969	1,000								3
0,950	0,969	0,975	1,000							4
0,943	0,963	0,956	0,981	1,000						5
0,919	0,956	0,932	0,944	0,959	1,000					6
0,938	0,957	0,951	0,951	0,944	0,950	1,000				7
0,974	0,976	0,969	0,969	0,963	0,939	0,957	1,000			8
0,974	0,963	0,956	0,969	0,963	0,938	0,945	0,963	1,000		9
0,981	0,975	0,969	0,969	0,963	0,938	0,957	0,993	0,980	1,000	10

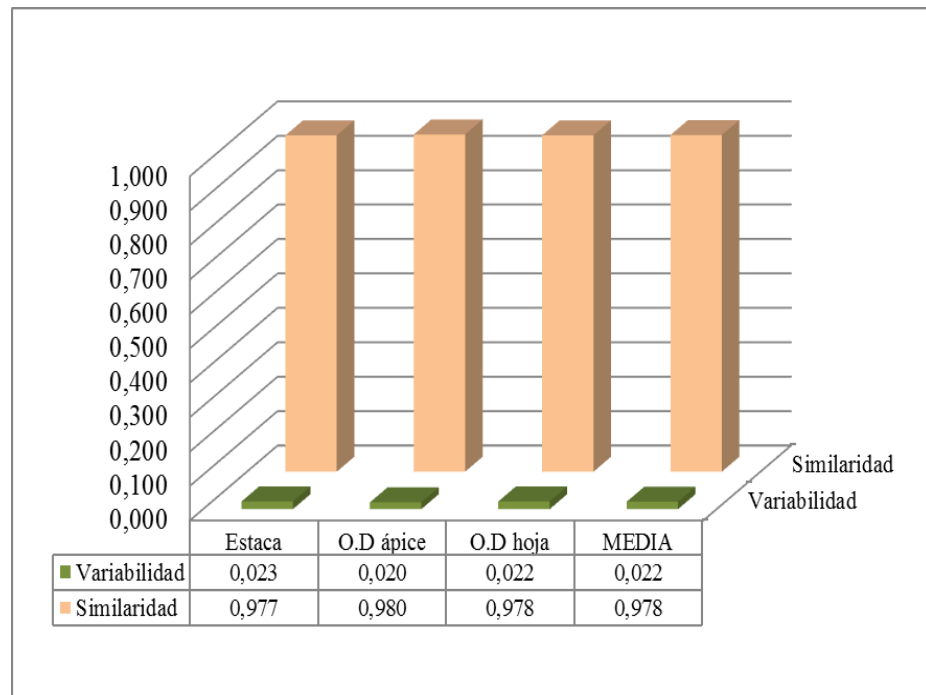
**Figura 14** Matrices de contingencia triangular de variabilidad y similitud en base al coeficiente de Nei calculado para los individuos.

Al realizar la representación gráfica la figura 15, muestra la media de variabilidad entre los individuos en las que se puede observar valores de es de 0,029 y el valor de similitud es de 0,972. Podemos decir que los valores de diversidad a nivel de individuos no son valores significativos.



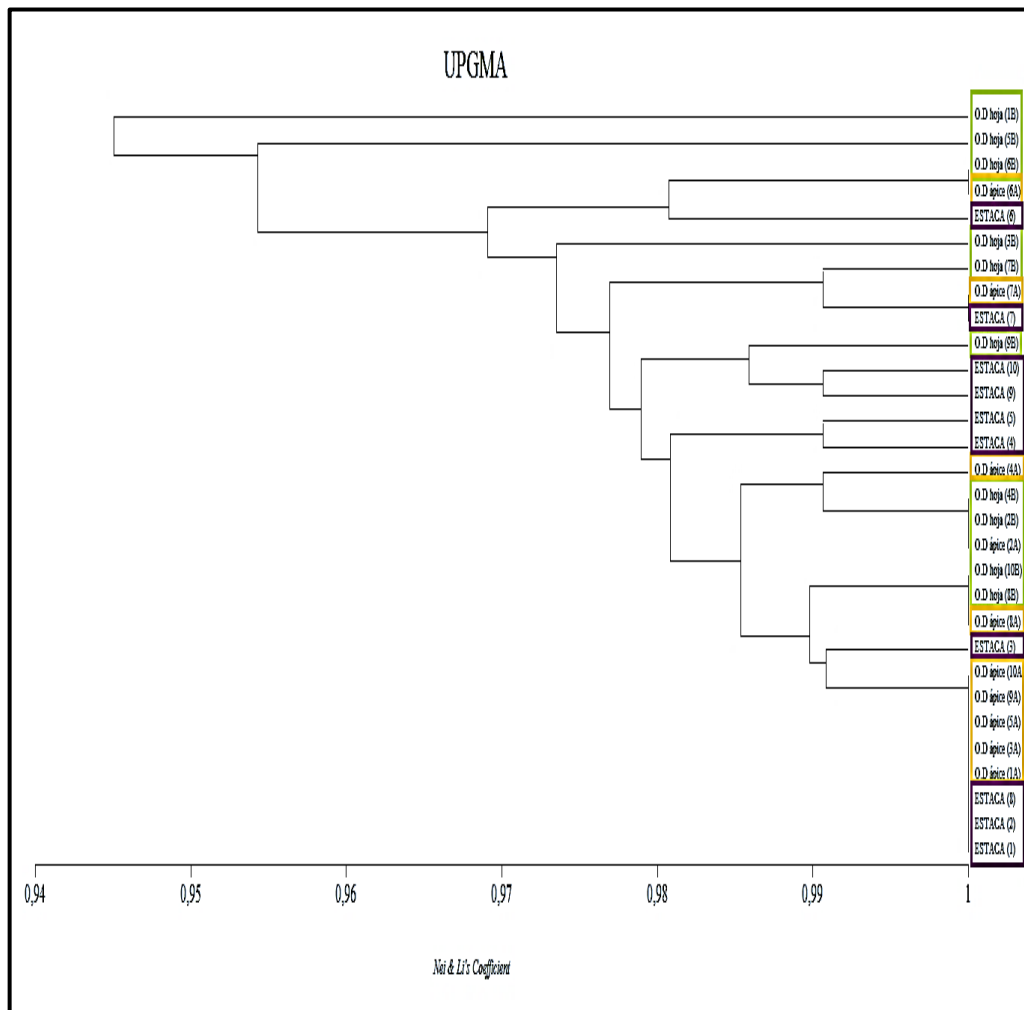
**Figura 15** Representación gráfica de los valores de variabilidad y similitud promediados a partir del coeficiente de similitud de Nei. Comparación entre los individuos en estudio (1-10).

Los resultados de diversidad y similitud entre las poblaciones e individuos, generó un matriz de contingencia triangular que presenta una comparación entre las tres poblaciones y los 30 individuos (ANEXO H). En la figura 16 se muestra los valores de similitud y diversidad comparando las tres poblaciones y los 30 individuos, presentando un valor total de variabilidad de 0,021 y una similitud de 0,976. De acuerdo con la hipótesis planteada en el estudio, no se observó diferencia significativa en cuanto a la diversidad entre poblaciones e individuos.



**Figura 16** Representación gráfica de variabilidad y similitud promediados a partir del coeficiente de similitud de Nei donde se comparan en conjunto poblaciones e individuos

A partir de las medidas de distancia del índice de Nei se realizó un análisis de agrupamiento (UPGMA), el cual agrupa a los individuos en forma jerárquica y aglomerativa en base a los promedios de similitud (Salinas, 2008). En el dendograma de la figura 17 se puede divisar la formación de dos grupos con una tendencia de agrupamiento indistinta de la población a la que pertenecen. Podemos decir que no existe diferencia significativa, ya que a partir de un coeficiente de similitud de 0,945 empieza la división de los grupos, lo que significa una variabilidad de 0,05 entre los dos grupos formados. Se pueden observar además valores altos de similitud de 0,99 en las tres poblaciones, tal esquema se pudo haber generado posiblemente a que las muestras vegetales son clones de una misma planta madre. De esta manera podemos afirmar que los tres grupos se encuentran relacionados entre sí, lo que corrobora la hipótesis planteada de esta investigación.

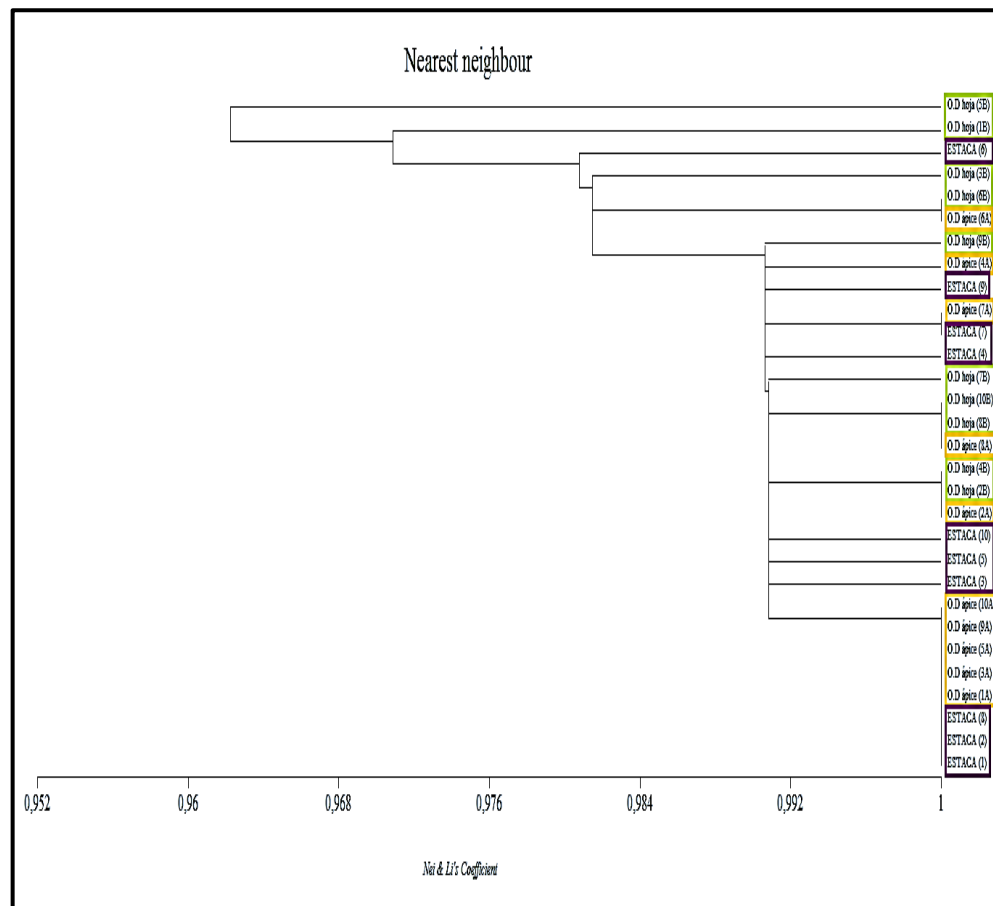


**Figura 17** Dendrograma obtenido con el agrupamiento UPGMA utilizando el índice de similaridad de Nei. Los individuos de las tres poblaciones se encuentran agrupados entre sí pues los colores verde, naranja y lila no forman grupos específicos sino que se mezclan con los otros grupos.

A partir de la matriz de similaridad generada con el coeficiente de Nei, se desarrolló el dendrograma mediante el método del vecino más cercano (Nearest neighbour). Este dendrograma (figura 18) nos permite determinar a los individuos que se encuentran más y menos relacionados entre sí dependiendo de las distancias de similitud y variabilidad.

En la Figura 3.13 destaca al individuo 5B de la población de Organogénesis directa de hoja, el cual es el más distante del resto de los individuos con un índice de 0,965. A pesar de ver que este individuo es el que se encuentra más distante, el valor de diversidad de 0,035 no representa una

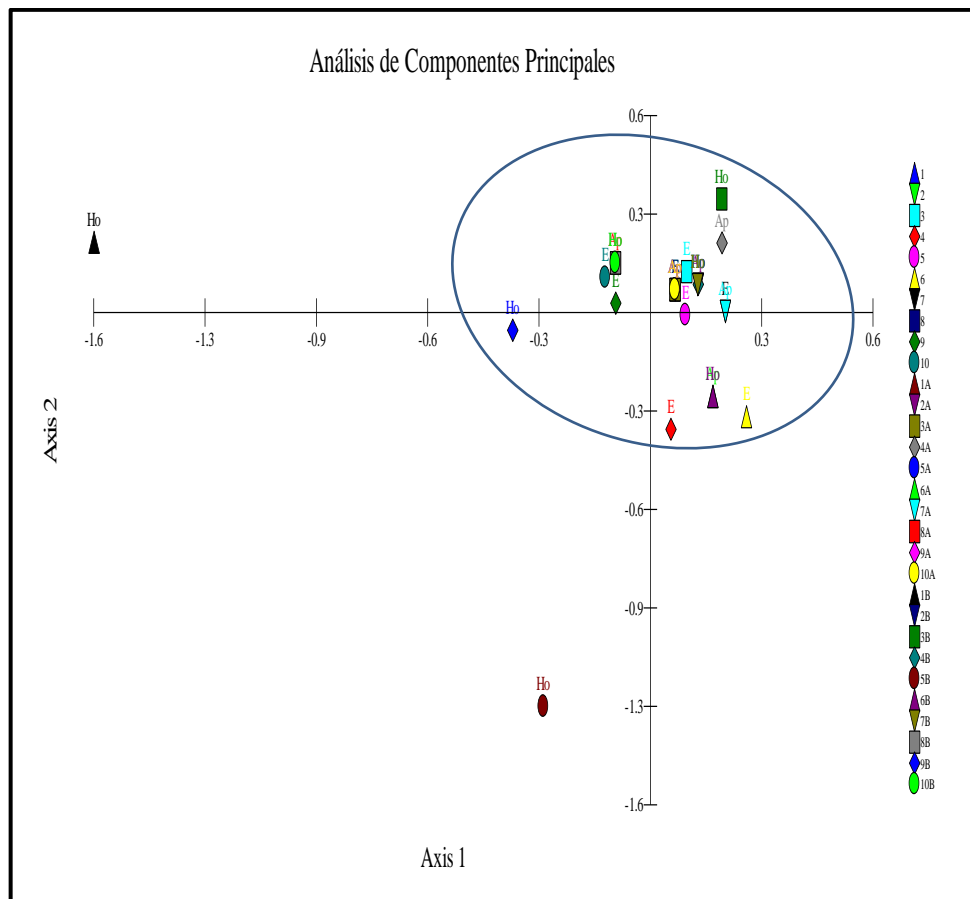
gran variedad genética significativa. No obstante los individuos propagados por estaca (1,2,3,5,8 y 10), por organogénesis directa de ápice (1A, 3A, 5A , 9A , 10A) y organogénesis directa de hoja (7B,8B, 10B,8A,4B,2B,2A ) se encuentran sumamente cercanos con un valor de 0,99, lo que sugiera que las tres poblaciones son cercanas entre sí.



**Figura 18** Dendrograma obtenido con el agrupamiento del vecino cercano (Nearest Neighbour) utilizando el índice de similitud de Nei. Los individuos de las tres poblaciones se encuentran agrupados entre sí pues los colores verde, naranja y lila no forman grupos específicos

Finalmente se elaboró el análisis de componentes principales (PCA) a partir de las similitud obtenidas con el coeficiente de Nei, lo que nos permite conocer la agrupación bidimensional que tiene los individuos. En el análisis de los componentes de la figura 19 se puede notar claramente la formación de un grupo en el que se superponen los individuos de las distintas poblaciones. Se debe tomar en cuenta que los

dos individuo 1A y 5B de la población de propagación por organogénesis directa de hoja se encuentran ligeramente alejados del único grupo formado, posiblemente esto se debe a un error del operador.



**Figura 19** Análisis de los componentes principales de los treinta individuos objeto de estudio y las distintas poblaciones (E: Estaca, Ho: Organogénesis directa de hoja, Ap: Organogénesis de ápice).

Las figuras de agrupamiento (Figura 3.12, Figura 3.13 y Figura 3.14) de este estudio muestran que existe una fuerte similitud entre las poblaciones estudiadas, lo sugiere que pertenecen a un mismo grupo.

### 3.6 Análisis de la diferenciación genética

Con el fin de conocer si existe o no diferencia significativa entre las poblaciones se aplicó un AMOVA. La significancia se la valoró con una p (probabilidad estadística) del 1% lo que demuestra que en un 99% los resultados no son producto al azar. Para ello se estableció que el número de individuos es 30, el número de poblaciones es tres y el número de regiones es 1. Los cálculos se realizaron con un número de permutaciones 9999.

Se estimó los componentes de varianza con el objeto de observar los factores de variabilidad que contribuye más a la diversidad génica como la varianza entre grupos y la varianza dentro del grupo.

**Tabla 17**

*Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).*

Fuente de variación	Df	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Est. Var	Porcentaje de variación %	$\phi_{st}$
<b>Entre poblaciones</b>	2	2.67	1.33	0.018	2%	0.24
<b>Dentro de poblaciones</b>	27	31.2	1.16	1.16	98%	
<b>Total</b>	29	33.867		1.17	100%	

En la Tabla 17, el análisis de AMOVA refleja que los componentes de varianza entre grupos fueron bajos de aproximadamente 2% con un  $\phi_{st}$  de 0,024. Este valor indica que el origen genético de variación es atribuible al origen proveniente de los individuos lo que posiblemente aporta ligeramente a la diversidad genética en cualquier tipo de polimorfismo.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

El presente estudio se centró en identificar la variabilidad genética con el uso de marcadores moleculares ISSR en muestras vegetales de babaco propagadas por cultivo *in vitro*. El objetivo de la aplicación de técnicas molecular es que sirvan como apoyo en los procesos de propagación de cultivo de tejidos.

El determinar la variabilidad en los procesos de propagación mediante técnicas moleculares beneficiará en la selección de las mejores progenies obtenidas por cultivo *in vitro*, lo que ayudará a satisfacer las demandas del mercado que exigen el desarrollo de cultivares con productividad estable.

### 4.1 Extracción de ADN

Los protocolos de extracción y purificación de ácidos nucleicos son el paso inicial para diversos estudios en Biología molecular (Orozco-santos, 2016). Un factor importante para obtener un ADN genómico de alto peso molecular y elevada pureza, es que se encuentre libre de moléculas contaminantes (Khanuja *et al.*, 1999).

En esta investigación se empleó como material vegetal a la planta de babaco perteneciente a la familia de las *Caricaceae*, la cual produce un látex amargo en las nervaduras de las hojas. Michiels y sus colaboradores en el 2003 mencionan que este látex es un conjugado de guaianolida sesquiterpén lactona y lactucina que se producen constitutivamente como metabolito. Los metabolitos dificultan la extracción de ADN actuando como molécula contaminante (Khanuja *et al.* 1999; Orozco-Santos, 2016).

Al analizar los resultados de los protocolos empleados en la extracción de ADN (apartado 3.1 de *Resultados*), se determinó que el protocolo de Khanujan *et al.* (1999) es el que permitió obtener la mayor concentración y calidad del ADN de babaco.

Este protocolo emplea un buffer de extracción que contiene que contiene PVP (polivinilpirrolidona) al 1% y una concentración de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (2006). El PVP es utilizado en protocolos de extracción de



ADN en plantas por su capacidad de enlace del hidrógeno con los derivados fenólicos, sustancias químicas sintetizadas por los metabolitos (Michiels *et al.*, 2003). Por otro lado el CTAB es un reactivo que procesa tejidos con una alta concentración de polisacáridos y polifenoles (Alejos *et al.*, 2008). El CTAB como el PVP en conjunto ayudan en la remoción de contaminantes, como resultado se obtiene ADN de alta concentración y pureza (Michiels *et al.*, 2003).

En relación a los valores de pureza obtenidos a través de la medición en el Nanodrop Thermo Scientific 2000, se pueden mencionar que los rangos de 1,77 a 2,00 se encuentran dentro de los parámetros aceptados para realizar el proceso de amplificación. De la misma manera en los estudios de Kanupriya en el 2011, con material vegetal de papaya (*Carica papaya*) y babaco (*Vasconcellea sp.*) se obtuvieron buenos resultados con rangos de pureza mayores a 1,6 en la relación 260/280. La medición de espectrofotometría con el Nanodrop determina los radios de pureza 260/280, es así que valores con un radio de 1,6- 2,00 representan una muestra pura de ADN (Wilfinger *et al.*, 1997).

#### **4.2 Amplificación de fragmentos de ADN mediante marcadores moleculares ISSR**

En este estudio se determinó las condiciones óptimas de temperatura de alineamiento y concentraciones de  $MgCl_2$  (ver apartado 3.3 de *Resultados*) para la posterior amplificación de fragmentos de ADN mediante marcadores moleculares ISSRS. La amplificación de los primers se realizó bajo las condiciones de temperatura óptimas de alineamiento de cada ISSR, la cual se determinó entre 40-54°C (Tabla 11 de *Resultados*). Las temperaturas estandarizadas en los diferentes ensayos, varían de acuerdo a la naturaleza de cada primer (Shen *et al.*, 2006; Mccauley *et al.*, 2014; Ochoa, 2008).

Por otra parte la estandarización de  $MgCl_2$  dentro de la PCR es esencial ya que las bajas concentraciones puede inactivar la *Taq* polimerasa, por el contrario un exceso de concentración podría reducir la fidelidad de la enzima e incrementar las uniones inespecíficas (Eckert & Kunkel, 1990). En la presente investigación se estableció la

concentración de  $MgCl_2$  óptima para los ocho primer, las cuales oscilaron en valores de 1,5mM y 1,8mM en la amplificación de las secuencias con cada primer (Tabla 12 de *Resultados*), resultados similares a los obtenidos por Chia Wong, 2009; Fedrigo, Giacomini, Faria & Da-silva, 2016; Shen *et al.*, 2006; Mccauley *et al.*, 2014 y Shobhana *et al.*, 2012.

El análisis de variedad genética (somaclonal) de la presente investigación comienza con la amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR de las muestras vegetales (*ex vitro* e *in vitro*) con el empleo de marcadores moleculares ISSR, lo que permite la detección de variedad o polimorfismos dentro de los cultivos vegetales (Jondle, 1992; Smith, 1998). Según bibliografía se ha descrito que los marcadores tipo ISSR son útiles para detectar la variación somaclonal entre plantas micropropagadas, como es el caso de estudios realizados en especies *Achillea* por Wallner *et al.* (1996) y y café por Rani *et al.* (2000).

Los polimorfismos se representan a través de la cantidad de bandas amplificadas mediante la PCR. En el apartado 3.6 de *Resultados* se puede observar un patrón uniforme de bandas. Cabe señalar que al tratarse de plantas clonales o autofecundas la diferencia en el patrón de bandas es menor debido a la estabilidad genética que presentan como lo corroboran estudios de Rossetto y colaboradores en 1995. Es así, cuando la propagación vegetativa predomina, existe bajos nivel de variación genética en la población resultante, obteniendo una población genéticamente uniforme (Burden & Marshall, 1981).

### **4.3 Análisis de variabilidad genética**

Para el análisis de variabilidad (polimorfismo), es imprescindible determinar un patrón de bandas reproducibles que determinen el polimorfismo de la muestra en estudio. En esta investigación el empleo de los ISSRS mostró una alta reproducibilidad

(figura 3.4 de *Resultados*) al presentar el mismo número de bandas amplificadas y buena definición en las dupletas realizadas en los ensayos realizados. De acuerdo con Nagaoka (1997) una buena reproducibilidad depende de obtener los mismos patrones de bandas en los ensayos bajo las mismas condiciones.

Las bandas reproducibles en este estudio, dieron un total de 55 bandas generadas con todos los primers, de las cuales 14 bandas (25.45%) fueron polimórficas. En el 2002 Devarumath y sus colaboradores, emplearon ISSRS para evaluar la integridad genética en plantas de té (*Camellia sinensis*) propagadas de manera *in vitro*, presentando un total de 12.84% de bandas polimórficas de 119 bandas generadas. Si bien, los resultados de este estudio muestran una mayor variabilidad, se observó que la variación se da entre plantas madre, no así entre madre e hija. Esto confirma la fidelidad genética entre las plantas madre y las plantas hijas regeneradas de forma *in vitro*, lo que representa una población genética estable. Los sistemas de propagación definen la diversidad genética de las diferentes especies, siendo este un parámetro importante para determinar la estabilidad genética de una población (Hamrick & Godt, 1996).

Otro factor analizado en la selección de los primers en los estudios realizados por Ochoa (2008) y Salinas (2010) a tomar en cuenta es el  $R_p$ , este valor considera el cálculo directo del número de fragmentos polimórficos (Fedrigo *et al.*, 2016). En este estudio los valores bajos de  $R_p$  de 0,13- 0,66 (Tabla 16 *Resultados*), sugiere que el nivel de polimorfismo no es representativo. En cambio, estudios realizados por Ochoa (2008) y Salinas (2010) empleando los mismos primers muestran altos valores de  $R_p$  de 9,4 a 13,8 lo que indican elevados porcentajes de polimorfismo de alrededor del 95,7%. Prevost & Wilkinson (1999) mencionan que valores de  $R_p$  inferiores a 6.00, escasamente pueden diferenciar cultivares, lo que afirma la uniformidad de la muestra del cultivar en estudio.

#### **4.4 Distancias genéticas**

En base a los valores de similitud genética de Nei (1972) calculadas en este estudio, para las poblaciones con distintos métodos de propagación (*ex vitro* e *in vitro*) del babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo), se determinó una diversidad génica del 0,022 (Figura 3.11 *Resultados*) con un polimorfismo de 16,36%.

En el 2009 Carrasco y colaboradores emplearon ISSRs en la caracterización genética de una población de *Vasconcellea pubescens*, en la cual determinaron valores bajos de diversidad genética ( $0.01 \pm 6.80188E-05$ ) según el coeficiente de Nei. Los valores de variación determinados por Carrasco *et al.*, (2009) son resultado del análisis de las poblaciones estudiadas en diferentes puntos geográficos, los cuales que presentaron altos valores de loci polimórficos 62.3%. Esto refleja una situación interesante pues un alto polimorfismo no genera necesariamente una alta diversidad genética (Hamrick & Godt, 1989).

La variabilidad que presentan las poblaciones de este estudio no es significativa al ser plantas clones *in vitro* provenientes de una planta madre, manteniendo una estabilidad genética. Los hallazgos de este estudio son consistentes con los de Carrasco *et al.* (2009), la mínima diversidad génica encontrada en *V. pubescens* puede ser explicado por eventos fundadores es decir un ancestro en común. Al existir un ancestro en común sometido a propagación a nivel clonal, éste mantendrá una población genéticamente uniforme (Burden & Marshall, 1981).

A partir de las distancias genéticas de Nei calculadas, se logró desarrollar dendogramas que ayudan en la formación de grupos jerárquicos dependiendo de la similitud entre los individuos (apartado 3.6 *Resultados*). De acuerdo a los resultados obtenidos mediante los análisis de agrupamiento UPGMA (Fig 17) y *Nearest neighbour* (vecino más cercano) (Fig 18), se determinó que los individuos de las poblaciones clonales de babaco propagadas por estaca, organogénesis directa de ápice y organogénesis directa de hoja, se agruparon independientemente del método de propagación y son provenientes de un mismo ancestro. De igual forma, en el 2011 Kanupriya y sus colaboradores al realizar sus estudios sobre relación genética entre

papaya (*Carica papaya*) y babaco (*Vasconcellea species*) con ISSRS y al generar los dendogramas UPGMA dieron como resultado la formación de un solo grupo con valores de similitud altos en los que se encontraban únicamente las especies de *Vasconcellea*. Al comparar estos resultados, podemos decir que el origen de propagación del babaco es clonal (asexual), manteniendo un ancestro en común ya que la diversidad génica es mínima. En términos generales podemos sugerir que la estructura genética de poblaciones naturales se ve afectada principalmente por los sistemas de propagación (Nybon, 2004).

#### **4.5 Diferenciación genética**

La diferenciación genética se la realizó con el análisis estadístico AMOVA, el cual detectó 2% de variación genética entre las tres poblaciones en estudio. En este mismo contexto de propagación clonal, Chia Wong (2009) en su investigación determinó un bajo valor de variación genética entre poblaciones de cacao de aproximadamente 6%. Por lo cual, los datos obtenidos mediante AMOVA no representan una variación significativa entre las poblaciones, estableciendo que uno de los factores que influyen en los resultados es la deriva génica dentro de la cual se dan cuellos de botella y el efecto fundador (Culley *et al* 2007). Sin embargo aunque la variación sea mínima, ésta puede desencadenar variación somaclonal.

El AMOVA fraccionó la variación observada en componentes dentro y entre poblaciones usando distancias genéticas. El componente de varianza entre poblaciones es llamada  $\Phi_{st}$  y es un análogo de  $F_{st}$  y  $\theta$ . En esta investigación se obtuvo un valor  $\Phi_{st}$  de 0,024 que concuerda con el porcentaje de variación obtenido. En el 2004 De Vicente y colaboradores indican que las poblaciones pueden variar considerablemente cuando los valores  $\Phi_{st}$  se encuentren en un rango 0,15 a 0,25. Los valores de  $\Phi_{st}$  menores a 0.05 indican diferenciación genética no significativa (Dorak, 2009). La implicación de tener un bajo porcentaje de variación entre poblaciones confirma que la variación no se da entre los distintos métodos de propagación, sino que la variación reside en los diferentes individuos.

La variación del 2% que reside entre las poblaciones regeneradas *in vitro* en nuestro estudio, puede deberse a la variación somaclonal que se genera cuando se realiza la regeneración de plantas mediante el cultivo de tejidos. En el 2000, Rani y colaboradores obtuvieron un porcentaje de variación del 4.38% en embriones somáticos de *Coffea arabica*, definiendo a este porcentaje como producto de variación somaclonal. Este proceso solo puede ser empleada a través del cultivo de tejidos, el cual se genera cuando existen mutaciones puntuales, rearreglos génicos somáticos, elementos genéticos transponibles, amplificación y/o metilación del ADN y cambios en el ADN de los organelos (Larkin & Scowcroft, 1981).

La presente investigación se realizó a partir de muestras clones de plantas de babaco que fueron propagadas por distintos métodos, con lo que podemos afirmar que cuando existe una condición controlada de parámetros establecidos éstos ayudarán a que exista estabilidad genética. Según Salhi-Hannachi *et al.* (2005), la baja divergencia entre grupos puede explicarse mediante la aparición del origen común de las poblaciones. Con este trabajo podemos evidenciar que al realizar la propagación de plantas en forma clonal, éstas presentarán pérdida de la variabilidad genética asumiendo una deriva genética debida al efecto fundador. El efecto fundador se define como una falta de variación genética debido a una pequeña población de apareamiento (Ambrose, 1998).

Como resultado de nuestro estudio, éste confirma que la propagación clonal promueve la estabilidad genética hasta la sexta generación de babaco de los cultivos *in vitro* analizados. Por lo tanto, podemos afirmar que la utilización de marcadores moleculares tipo ISSR nos ayudan como herramienta para para detectar variación somaclonal de una manera más precisa y a nivel de ADN y así lograr la selección de las mejores progenies que desencadenan una productividad estable.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

El presente trabajo de variabilidad genética de clones de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo) a nivel *ex vitro* e *in vitro* es considerado pionero en el Ecuador, con la finalidad de dar soporte a propagación *in vitro* del babaco.

El protocolo de extracción de ADN con mayor efectividad en los parámetros de integridad, pureza y concentración en las muestras de *Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo es el establecido por Khanujan *et al.*(2009).

Los primers ISSR seleccionados (844A, 844B, 17898A, 17898B, 17899A, HB9, HB11) mostraron buena reproducibilidad al momento de la amplificación en PCR, presentando con un patrón de bandas similar bajo las mismas condiciones.

Se observó una fidelidad genética entre las plantas madre y las plantas hijas regeneradas de forma *in vitro* ya que de las 55 bandas generadas 41 fueron bandas monomórficas.

Los valores bajos de  $R_p$  (0,13- 0,66) de los primers ISSR en esta investigación, afirman que el nivel de polimorfismo presente no es representativo, mostrando uniformidad de la muestra propagadas mediante cultivo *in vitro* del babaco.

El coeficiente de Nei mostró estabilidad genética del cultivo del babaco hasta la sexta generación analizada, debido a que las muestras eran plantas clones *in vitro* provenientes de una planta madre.

Los valores de diversidad del 2% entre las poblaciones estudiadas mostraron una mínima diversidad genética de babaco lo que puede ser explicado por eventos fundadores o por un ancestro en común.

La variabilidad entre poblaciones es mínima al realizar AMOVA por lo que la diversidad génica podría deberse a diferencias entre individuos (plantas madre), posiblemente a la variación somaclonal que existe en los cultivo *in vitro*.

Finalmente se puede concluir que la propagación *in vitro* hasta la sexta generación de babaco propagada por organogénesis directa de ápice y por organogénesis directa de hoja se mantiene estable genéticamente, lo que puede ser utilizada en futuras investigaciones.



## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo), se recomienda:

Emplear un mayor número de primers dominantes (ISSR, RAPDs) y codominantes para la detección de variabilidad en los ensayos de amplificación de fragmentos de ADN para corroborar resultados.

Se recomienda el uso de geles de poliacrilamida para determinar con mayor precisión las bandas generadas, que serán útiles en la proporción de información.

Es importante analizar un mayor número de generaciones de plantas de babaco propagadas por cultivo *in vitro* que podrían ayudar en determinar el origen de variación somaclonal.

El empleo de marcadores moleculares en el área de cultivo *in vitro*, ya que éstos serán útiles en la evaluación de la homogeneidad genética que satisfacen las demandas de mercados internacionales que exigen una productividad estable del cultivo.

Serían interesante llevar a cabo un estudio extenso de diversidad genética a nivel de plantas madre de *Vasconcellea x heilbornii* para poder hacer los cultivos *in vitro* con diferentes patrones y obtener una planta que presente variedad.

Finalmente podemos sugerir el seguir empleando técnicas moleculares como apoyo al cultivo *in vitro* ya que son útiles para determinar la homogeneidad genética de los cultivares

## CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, X., & Gonzalez, A. (2004). Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y la conservación de dos especies mezcaleras. México: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Alejos, P., Aragón, C., Cornejo, A. (2008). Extracción y Purificación de ADN. 1-26
- Alvez, B., Menéndez, A., Oropeza, M., & Vargas, T. (2012). *Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Cultivo de Tejidos*. Retrieved from <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/andrea.menendez/archivos/Guia%20Cultivo%20de%20Tej%20Veg%20II%202012.pdf>
- Ambrose, S. H. (1998). Late Pleistocene human population bottlenecks , volcanic winter, and differentiation of modern humans.
- Badillo, V., Van den E., & Van Damme, P. (2000). *Carica palandesis* (*Caricaceae*), a New Species from Ecuador. *Novon* 10(1): 4-6.
- Basha, D. & Sujatha, M. (2009). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* L. using nuclear and organelle specific markers. *Euphytica* 168, 197-214.
- Bermúdez-Guzmán, M. d. (2016). Optimización de un protocolo para aislamiento de DNA de hojas de *Saccharum officinarum*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 897-910.
- Bornet, B & Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. Commentary. *Plant Molecular Biology Reporter*. Volumen 19: pp: 209–215.

- Burden, J.J., Marshall, D.R., 1981. Biological control and the reproductive mode of weeds. *J. Appl. Ecol.* 18, 649–658.
- Carrasco, B., Avila, P., Perez-Diaz, J., Muñoz, P., García, R., Lavandero, B., Caligari, P. D. S. (2009). Genetic structure of highland papayas (*Vasconcellea pubescens* (Lenné et C. Koch) Badillo) cultivated along a geographic gradient in Chile as revealed by Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(3), 331–337. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9367-1>
- Cevallos M, Ramos R (1990) Evaluación de tipos de estacas, sustratos y tres dosis de Rootone F (ácido naftalen acético e indol butírico), para propagación de Jigacho (*Carica stipulata*, B.). Tesis Ing Agr, Universidad Técnica de Ambato, Facultad de Ingeniería Agronómica, Ambato, Ecuador
- Chia Wong, J. A. (2009). Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María, 118.
- Clegg M, Khaler A, Weir B (eds) Plant population genetics breeding and genetic resources. Sinauer Press, Massachussets, USA, pp 43–63
- Cacioppo, O. (1987). Il babaco manuale pratico. Ed. Reda. Italia. 12-23p
- Cohen, D. y Cooper, P. (1982). Micropropagation of Babaco, a *Carica* hybrid from Ecuador. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue Cell Culture. Tokio.
- Cossio, F. (1987). Atti del 1° convegno nozionale sul babaco. Istituto Sperimentale di Frutticoltura Amministrazione Provinciale di Verona. 24, 26-28p
- Crisci, J. & López, M. (1983). Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Serie n°26 OEA Washington D.C.
- Culley, T., Sbita, S. & Wick, A. (2007). Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the perennial herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR marker. *Annals of Botany* 9, 1-10.

- Dorak, T. (2009). Basic Population Genetics. M Tefvik Dorak´s Website. Extraído el 15 de Agosto del 2017 del sitio web: <http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>.
- De Vicente, M., & Fulton, T. (2003). Using molecular marker technology effectively in plant diversity studies. Vol 1. Learning module. CD-ROM. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy and Institute for Genomic Diversity, Cornell University, Ithaca, NY, USA. <http://irc.igd.cornell.edu/MolecularMarkers/>
- Dicano, L. & G. Naranjo. (2014) Creación de producto, jugo de fruto exótico (Babaco) al mercado de Rusia. Tesis para optar el título de Ingenieras en Comercio y Finanzas Internacionales. Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.. 154 p
- Domínguez, C.A., C. Abarca, R. Cueva, F. Molina y L. E. Eguiarte. (2005). Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytologist* 166: 663-672.
- Dong, L., Lv, L.-B., & Lai, R. (2012). [*Molecular cloning of Tupaia belangeri chinensis neuropeptide Y and homology comparison with other analogues from primates*]. *Zool. Res.* (Vol. 33). <https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>
- Eguiarte, L., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología Molecular*. Mexico: Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Eckert, K. & Kunkel, T. (1990): High fidelity DNA synthesis by the *Thermusaquaticus* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* 18, 3739-3744.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Fabara J, Bermeo N, Berberán C (1985) *Manual del Cultivo del Babaco*. Grupo Esquina editores – diseñadores SA Impreseñal Cia Ltda, Ambato

- Fedrigo, K., Giacomini, R. M., Faria, C. M. D. R., Da-silva, P. R., & Da-silva, P. R. (2016). ISSR primers for analysis of genetic variability of *Stenocarpella maydis*. *Tropical Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0089-1>
- Ferreira, M., Grattapaglia, D. (1998). Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. 1ra Edición. EMBRAPA – CENARGEN Documento 20. Brasilia D.F. – Brasil.
- Freire, D.: Reproducción asexual del Babaco (*Vasconcellea x heilbornii* Cv.) sobre portainjertos de chamburo (*Vasconcellea cundinamarcaensis*) y toronche (*Vasconcellea stipulata*). Tesis para optar el título de Ingeniero Agropecuario. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador. 2015, 85 p
- Gao X, Yang D, Cao D, Ao M, Sui X, Wang Q, Kimatu JN, Wang L (2010) In vitro micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. *J Plant Growth Regul* 29: 257-267
- Ghislain, M., Zhang, D., Fajardo, D., Huaman, Z., y R. Hijmans (1999). Markerassisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 547-555. Holanda
- Gonz, A., & Aguirre, X. (2000). Inter Simple Sequence Repeats ( ISSRs ), 567–572.
- Hamrick, J. L., & Godt, M. W. (1990). Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources.*, 43-63
- Holsinger, K.E., y L.E. Wallace. (2004). Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: An example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 13 : 887-894.
- Hollingsworth, P & Ennos, R. (2004). Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92. 490-498

- Jadán, M., Basantez, K., Gómez, R., & Bermudez, I. (2016). Establecimiento in vitro de brotes de *Vasconcellea x helbornii* (Badillo) Badillo. *Biotecnología Vegetal* Vol. 16, 67-72.
- Karp, A., Kresovich S., Bhat, K., Ayad, W. & Hodgkin T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin N°2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 47 pp.
- Kent, M. & P. Coker (1992). *Vegetation Description and Analysis. A Practical Approach*. CRC Press. Florida, U.S.A. 363 pp.
- Khanuja, S., Kumar, S., Shasany, A., & Darokar, M. . (1999). Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of Plants Producing Large Amounts of Secondary Metabolites and Essential Oils, 1–7.
- Laboratorio de Genómica Viral y Humana. (2008). Preparación de Geles de Agarosa para Electroforesis, 3.
- Larkin, P. J., & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60(4), 197-214.
- Lewontin, R. (1972). The apportionment of human variation. *Evol. Biol.* 6: 381-398.
- Lim, T. (2012). *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 1, Fruits, 1*, 852. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7>
- Lynch, M., & Crease, T. (1990). The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution* 7 : 377-394.
- Mccauley, R. A., Ballard, H. E., Journal, S., Botanical, T., Dec, N. O., Mccauley, R. A., & Ballard, H. E. (2014). Inferring Nativity and Biogeographic Affinities of Central and Marginal Populations of *Inferring nativity and biogeographic affinities of central and marginal populations of *Froelichia**

- floridana ( Amaranthaceae ) from Inter-Simple Sequence Repeat ( ISSR ), *129*(4), 311–325.
- McPherson, M., & Møller, S. (2006). *PCR* (Elizabeth Owen). New York: Taylor & FrancisGroup
- Michiels, A., Van den Ende, W., Tucker, M., Van Riet, L & Van Laere, A. (2003). Extraction of High- quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry* 315, 85-89
- Ministerio de Agricultura y Ganaderia (MAG). (2001). Babaco Mountain Papaya (en línea). Quito, Ecuador. Consultado el 15 Abril. 2017. Disponible en: [www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco\\_mag.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Convenio%20MAG%20IICA/productos/babaco_mag.pdf)
- Ministerio del Comercio Exterior. (05 de Junio de 2017). Producción Ecuatoriana exportacion y PIB. Obtenido de <http://www.proecuador.gob.ec/guia-inversiones/>
- Ministerio de Previsión Social y Sanidad, (1965) (Spanish) Tabla de Composición de los Alimentos Ecuatorianos Quito Instituto Nacional de Nutrición
- Nagaoka, T. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers, 597–602.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283–292.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13:1143–1155
- Ochoa, V. (2008). Genética poblacional de *Polylepis incana* y *Polylepis pauta* en los páramos de papallacta y los Ilinizas. Tesis de pregrado. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Orozco-santos, M. (2016). Aislamiento de dna de hojas de *Saccharum*, (May).



- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, A., & Salas, R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital Natural de México, Vol. I: Co*, 415–435.
- Prevost, A., & Wilkinson, M. J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, 107–112.
- Rådström P., Knutsson R., Wolfs P., Lövenklev M., Löfström C. (2004) Pre-PCR Processing. *Molecular Biothechnology Vol2* 133:146.
- Rani V, Singh KP, Shiran M, Nandy S, Goel S, Devarumath RM, Sreenath HL, Raina SN (2000) Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high frequency somatic embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Rep* 19:1013–1020
- Reed, D. H., & R. Frankham. (2001). How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095–1103
- Robles-Carrión, A., Herrera, L., & Roldán, T. (2016). Principales agentes fitopatógenos y estrategias de control, *43(2)*, 83–92.
- Rohlf, F. (2000). NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. User Guide. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, NY.
- Salinas, N. (2010) Estudio de la variabilidad genética de tres poblaciones de Piñon (*Latropha curcas* L.) en la provincia de Manabí mediante la utilización de marcadores moleculares ISSR. Tesis de pregrado. Laboratorio de biotecnología Vegetal. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Salhi-Hannachi, A., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtar, T. (2005) Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA

and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genet. Resources Crop Evol.* 52:563–573.

Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. (2009). Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales, 135–151.

Satovic, Z., Roman, B., Alfaro, C., Rubiales, D., Cubero, J. & Pujadas, A. (2004). Overcoming limitations of dominant marker data : population structure of the parasitic plant *Cistanche phelypaea* inferred from RAPD markers. Genetic diversity of parasitic plants. Córdoba, España.

Scheldeman, X., Willems, L., d'Eeckenbrugge, G. C., Romeijn-Peters, E., Restrepo, M. T., Motoche, J. R., & Rodríguez, D. (2007). Distribution, diversity and environmental adaptation of highland papayas (*Vasconcellea spp.*) in tropical and subtropical America. *Biodiversity and Conservation*, 16(6), 1867-1884.

Shen, J. S., Ing, X. D., Lu, D. L., Ing, G. D., Jia, H. E., Xuexia, L. I., ... Hu, B. C. (2006). Intersimple Sequence Repeats ( ISSR ) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et M IGO, 29(3), 420–422.

Shobhana, M., Vasugi, C., Aswath, C., Radhika, V., Reddy, L., & Dinesh, M. R. (2012). Genetic relationship among papaya (*Carica papaya*) and wild papaya (*Vasconcellea species*) using RAPD and ISSR markers\*. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 82(4), 366–9.

Sierra, R. (2003). (*Populus tremula L.*) : bases para su cultivo, gestión y conservación. Mundi-Prensa .

Singh, R., Mishra, G., Kant, A., & Sashi, B. (2008). Molecular markers in Plants, (January 2008), 1–77.

Sinche, M. (2009). “Aislamiento, Purificación Parcial y Caracterización cinética de las proteases presentes en el latex de las frutas de una planta del género *Vasconcellea*”. Universidad Politécnica Nacional. Quito-Ecuador.

- SGIKER. (2008). *Purificación y Cuantificación de productos de PCR*. Euskadi: Universidad del País Vasco.
- Sneath, P., & Sokal, R. (1973). *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*, Freeman, San Francisco, Ca., XV, 573 pg.
- Soria, N. & Viteri, P. (1999). *Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador*. INIAP – COSUDE. Quito – Ecuador. 48 p.
- Spooner, D.; Van Treuren, R.; DE VICENTE, M.C. (2005). Molecular markers for Genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 136 pp.
- Tamay, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 70-78.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2009). NanoDrop 2000 / 2000c Spectrophotometer. Retrieved from [www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com)
- Universidad Nacional de Quilmes. (27 de Junio de 2012). *ibcmunq*. Recuperado el 9 de Abril de 2017, de <https://ibcmunq.wordpress.com/>
- Vaca, I. (2008) “Incremento del número de brotes de babaco (*Vasconcellea x heilbornii* cv BABACO) *in vitro* mediante la interacción de reguladores de crecimiento para la regeneración de plantas completas”. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Quito.
- Venkatachalam, L., Sreedhar, R. & Bhagyalakshmi, N. (2008). The use of genetic markers for detecting DNA polymorphisms, genotype identification and phylogenetic relationship among banana cultivars. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 974-985.
- Villareal, L. Dhuique, C. Dornier, M. Ruales, J. y Reynes, M. 2003©. *Évaluation de l'intérêt du babaco (*Carica pentagona* Heilb.)* (En francés) (en línea).

Cirad/EDP Sciences. Consultado el 13 Abril. 2017. Disponible en:  
[www.edpsciences.org/articles/fruits/pdf/2003/01/05.pdf](http://www.edpsciences.org/articles/fruits/pdf/2003/01/05.pdf)

Wallner E, Weising K, Rompf R, Kahl G, Kopp B (1996) Oligonucleotide and RAPD analysis of *Achillea* species: characterization and long-term monitoring of micropropagated clones. *Plant Cell Rep* 15:647–652

Wilfinger, W. W., Mackey, K., Chomczynski, P.(1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 22, 474-481

Yeh, F., Yang, R., Boyle, T. (1999). POPGENE v1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Canada.