



**Caracterización molecular de accesiones de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de  
la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP**

Vélez de la Cruz, María Belén

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

Segovia Salcedo, María Claudia PhD.

28 de agosto de 2023



## TESIS VELEZ PARA COPYLEAKS (1).docx

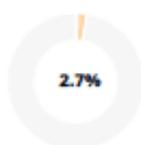
### Scan details

Scan time:  
August 20th, 2023 at 3:35 UTC

Total Pages:  
40

Total Words:  
9988

### Plagiarism Detection



Types of plagiarism	Words	Percentage
Identical	28	0.3%
Minor Changes	19	0.2%
Paraphrased	222	2.2%
Omitted Words	0	0%

### AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

### 🔍 Plagiarism Results: (10)

📄 T-ESPE-O50897.pdf 1.8%

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/26782/1/t-e...>

Andres Reyes

1 Caracterización molecular de variedades de arroz adaptadas a la provincia de Loja utilizando marcadores microsatélites (SSRs) Reyes S...

📄 0717-9200-bosque-42-03-371.pdf 0.3%

<https://www.scielo.cl/vpdf/bosque/v42n3/0717-9200-bosque-...>

BOSQUE 42(3): 371-382, 2021 BOSQUE 42(3): 371-382, 2021 Diversidad y diferenciación genética de poblaciones de Prosopis chilensis DOI: ...

📄 Método modificado de obtención de adn genómico ... 0.3%

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s1316-...](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1316-...)

Servicios Personalizados Revista SciELO Analytics Google Scholar HSM5 ...





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “Caracterización molecular de accesiones de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP” fue realizado por la señorita Vélez de la Cruz, María Belén; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 de agosto de 2023



Segovia Salcedo, María Claudia, Ph. D

C. C. 1709055998



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Vélez de la Cruz, María Belén**, con cédula de ciudadanía n° 1720103439, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Caracterización molecular de accesiones de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 20 de agosto de 2023

Vélez de la Cruz, María Belén

C.C.: 1720103439



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **Vélez de la Cruz, María Belén**, con cédula de ciudadanía n° 1720103439, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Caracterización molecular de accesiones de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 20 de agosto de 2023**

**Vélez de la Cruz, María Belén**

C.C.: 1720103439

### **Dedicatoria**

A mis amores eternos: mi abuelita Georgina, Mamá Charito, y mi adorada abuelita Carmelita. Ustedes han caminado de mi mano guiando cada paso de mi vida y mi carrera. Mi corazón puede sentir su presencia siempre.

A mis amados padres por todo su amor, sus consejos y enseñanzas. Ustedes papitos se merecen lo mejor del mundo y lo mejor de mí. Son lo que más amo en la vida.

A mis hermanitos Guisi y Chini, ustedes siempre han sido mi motivación, mi fuerza para no rendirme en el camino, me llevo siempre lo mejor de ustedes. Los amo con todo el corazón.

A todas las personas que saben lo mucho que me ha costado llegar hasta aquí, y siempre me han brindado su ayuda, apoyo, amor y compañía.

Y finalmente a la persona que siempre creyó en mí, y en mi capacidad para finalizar mi carrera. Hubiera deseado que tus ojitos no se cierren antes de verme graduar. Este logro va directo al cielo, para ti mi Papito Marco.

## Agradecimiento

A Dios, por ser mi guía, mi mejor amigo, mi refugio en los momentos difíciles. Gracias por las bendiciones. Es la razón por la que he podido llegar hasta donde estoy.

A mi amada familia:

- *Mamita de mi corazón y mi Gordito horroroso.* Ustedes han sido mis primeros animadores, y mi sostén en todo momento bueno y malo. Gracias por ser mi fortaleza y mi apoyo incondicional. Que nunca me falten sus consejos, su apoyo y su amor.
- *Mis adorados hermanos y hermanas Chini, Stefy, Guisi, Cary, y mi pequeñita Melody.* Gracias por ayudarme a conseguir mis sueños, por su ánimo, su amor, por ser mis acólitos y mis compañeros de experiencias en la vida.
- *Mi tía linda Margui y tío Byron sin miedo.* Gracias porque ustedes son la única familia que tengo a la que se les puede entregar y recibir mucho amor sincero.
- *Mis queridos padrinos Germancito y Sandrita.* No importa el tiempo que pase, ustedes siempre serán como otros padres para mí.

Gracias por ser mi soporte, por sus palabras de apoyo durante la realización de este trabajo, por su amor incondicional. Mi mayor bendición es tenerlos a todos ustedes conmigo.

A la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP, por dejarme hacer uso de sus instalaciones para el desarrollo de mi tesis.

Al Ing. Iván Garzón, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, gracias por abrirme las puertas, por toda su ayuda, y dejarme ser parte del equipo del Departamento de Biotecnología. Le agradezco también a la Sra. Teresita Casanova por juntos tratarme como parte de su

familia, haciendo amena y satisfactoria mi estadía en la Estación durante el desarrollo de mi tesis.

*A Andrés Reyes* por ser mi guía en este trabajo, gracias por tu apertura a enseñarme lo que sabes. Sin tu ayuda no hubiera cumplido mi objetivo.

*A la Dra. Claudia Segovia* por ser mi tutora de tesis. Gracias por toda su ayuda en este largo proceso. Necesitamos más docentes entregadas y excepcionales como usted.

A la familia que me ha regalado la vida y la ESPE:

⇒ *Naty*, mi hermana, gracias por tu amistad y por los mejores momentos que vivimos juntas en la Universidad. Eres el mejor regalo que me dejó tercera matrícula.

⇒ *Mis cachorras: Cecy, May y Kim*. Gracias por ser mi grupo de risas, de lágrimas, de estrés, de estudio. Estoy muy segura de que sin ustedes el camino hubiera sido más difícil y menos divertido.

⇒ *JAMASI*, mi hermano. Gracias por tus sabios consejos, tu apoyo, y por todos los momentos compartidos. Me hiciste probar las mejores galletas de chocolate navideñas.

⇒ *A mis colegas* Bryancito (amigos como tú solo tú), y Fer. Se retiraron al comienzo del camino, pero siempre estuvieron presentes, pendientes de mí, dándome su apoyo y amistad a pesar de la distancia. Lo mejor que me dejó el recorrido de prepo y mi mejor regalo de Física.

⇒ *A mis amigos incondicionales*: Kevin C. (mejor amigo), Mauri el travieso, Negrito, Manolito y Kathycita. Gracias por ser ánimo y fuerza, especialmente al final de mi

carrera para conseguir mi meta. Ustedes 5 son la combinación perfecta de felicidad en mi vida. No pude haber pedido mejores amigos en la vida.

Cada uno de ustedes tiene un lugar muy especial en mi corazón. A todos los conocí a diferentes tiempos, pero siempre sentí que los conocía de toda la vida. Su amistad no solo es una curita para mi corazón, su ayuda, y su amor, son la fuerza que me motiva a salir adelante.

Finalmente, a las personas que fueron parte fundamental en este largo camino universitario para lograr este triunfo y que, a pesar de ya no ser parte de mi vida, llevo su recuerdo y toda la ayuda que me dieron en mi corazón siempre. Gracias por llegar, por enseñarme que soy capaz de conseguir lo que me proponga, por las mejores experiencias, por las risas interminables. *“Lo más terrible se aprende enseguida, y lo hermoso nos cuesta la vida”*

## Índice de Contenido

Dedicatoria.....	6
Agradecimiento.....	7
Índice de Contenido .....	10
Índice de tablas.....	13
Índice de figuras .....	15
Listado de Abreviaturas.....	16
Resumen .....	18
Abstract.....	19
Capítulo 1: Introducción .....	20
Planteamiento del problema.....	20
Justificación del problema.....	21
Objetivos .....	22
<i>Objetivo general</i> .....	22
<i>Objetivos específicos</i> .....	23
Marco teórico.....	23
<i>Bixa orellana L. (achiote)</i> .....	23
<i>Características botánicas</i> .....	24
<i>Importancia del cultivo de achiote</i> .....	26
<i>Cultivo de Bixa orellana L. en Ecuador</i> .....	27

<i>Diversidad y variabilidad genética</i> .....	28
<i>Microsatélites (SSRs)</i> .....	33
<i>Genotipaje mediante la técnica de M13-tailing</i> .....	33
<i>Hipótesis</i> .....	35
<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos</b> .....	<b>35</b>
Localización del estudio .....	35
Material vegetal .....	35
Toma de muestras .....	35
Extracción de ADN.....	36
Cuantificación del ADN por espectrofotometría .....	38
Prueba de validación de ADN y microsatélites .....	38
Prueba múltiple para genotipaje en LI-COR 4300S.....	40
Genotipaje de las muestras en LI-COR 4300S Biosciences® .....	44
Análisis de diversidad genética .....	45
Análisis de estructura genética.....	45
Análisis Molecular de Varianza y estadísticos F.....	45
<b>Capítulo 3: Resultados</b> .....	<b>46</b>
Extracción de ADN y cuantificación por espectrofotometría .....	46
Prueba de validación de ADN y microsatélites .....	48
Prueba múltiple para genotipaje en LI-COR 4300S.....	49
Genotipaje de las muestras en LI-COR 4300S Biosciences® .....	50

<b>Análisis de diversidad genética .....</b>	<b>51</b>
<b>Análisis de estructura genética.....</b>	<b>56</b>
<b>Análisis Molecular de Varianza y estadísticos F.....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo 4: Discusión .....</b>	<b>67</b>
<b>Capítulo 5: Conclusiones.....</b>	<b>78</b>
<b>Capítulo 6: Recomendaciones .....</b>	<b>78</b>
<b>Capítulo 7: Bibliografía .....</b>	<b>79</b>
<b>Capítulo 8: Apéndices .....</b>	<b>87</b>

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del achiote ( <b>Bixa orellana L.</b> ) .....	25
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los marcadores moleculares basados hibridación y PCR .....	31
<b>Tabla 3.</b> Composición de buffer sorbitol para lavado de muestras de achiote previa la extracción de ADN .....	36
<b>Tabla 4.</b> Composición del buffer de lavado .....	37
<b>Tabla 5.</b> Programa de amplificación PCR para validación de cebadores microsatélites de <b>Bixa orellana L.</b> .....	38
<b>Tabla 6.</b> Master mix estandarizado de amplificación PCR para pruebas de validación de ADN y cebadores microsatélites .....	39
<b>Tabla 7.</b> Microsatélites (SSRs) utilizados para amplificación y genotipaje de <b>Bixa orellana L.</b> 40	
<b>Tabla 8.</b> Programa de amplificación PCR con M13-tailing para prueba multiplex de microsatélites de <b>Bixa orellana L.</b> .....	41
<b>Tabla 9.</b> Master mix MONOPLEX de amplificación PCR con M13-tailing .....	42
<b>Tabla 10.</b> Combinaciones dúplex para genotipaje .....	43
<b>Tabla 11.</b> Master mix DÚPLEX de amplificación PCR con M13-tailing .....	43
<b>Tabla 12.</b> Concentraciones de ADN y radio de absorbancia A260/A280 de muestras de achiote ( <b>B. orellana L.</b> ) .....	47
<b>Tabla 13.</b> Análisis de diversidad genética de 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> .....	52
<b>Tabla 14.</b> Datos informativos de heterocigosidad e índice de Shannon de 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> por SSR .....	52
<b>Tabla 15.</b> Datos de alelos privados por marcador encontrados en el análisis de diversidad genética de <b>Bixa orellana L.</b> .....	53
<b>Tabla 16.</b> Frecuencias alélicas observadas en cada marcador molecular de los 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> .....	54
<b>Tabla 17.</b> Datos de K para asignación de poblaciones de <b>Bixa orellana L.</b> .....	58

<b>Tabla 18.</b> Equilibrio de Hardy-Weinberg calculado por poblaciones para cada SSR de <b>Bixa orellana L.</b> .....	61
<b>Tabla 19.</b> Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> y 8 SSR.....	63
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para <b>Bixa orellana L.</b> incluyendo análisis de individuos.....	64
<b>Tabla 21.</b> Estadísticos estimados de F-Wright para cada SSR .....	65

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Integridad de ADN extraído de muestras de achiote ( <b>B. orellana L.</b> ) .....	46
<b>Figura 2.</b> Prueba de validación de los 8 microsatélites respectivos para achiote ( <b>B. orellana L.</b> ) .....	48
<b>Figura 3.</b> Validación de muestras de ADN de achiote con SSR BorC12 .....	49
<b>Figura 4.</b> Prueba múltiple con 8 SSR de achiote en LI-COR 4300S .....	49
<b>Figura 5.</b> Gel digital de muestras de achiote genotipado en el software SAGA-GT .....	51
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético de 371 individuos de <b>Bixa orellana L</b> .....	57
<b>Figura 7.</b> Estimación de poblaciones asignadas para los 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> ..	59
<b>Figura 8.</b> Grupo de poblaciones asignados (K2) para los 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> ..	59
<b>Figura 9.</b> Dendrograma UPGMA de los 371 individuos de <b>Bixa orellana L.</b> .....	60
<b>Figura 10.</b> Gráfico de pastel del porcentaje de varianza molecular de poblaciones.....	63
<b>Figura 11.</b> Gráfico de pastel del porcentaje de varianza molecular incluyendo análisis de individuos .....	64
<b>Figura 12.</b> Gráfico de dispersión de coordenadas principales (PCoA) para dos poblaciones de <b>Bixa orellana L.</b> .....	66
<b>Figura 13.</b> Valores críticos de chi cuadrado a un nivel de significancia de 0.05.....	73

**Listado de Abreviaturas**

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AMOVA</b>	Análisis de Varianza Molecular
<b>BCE</b>	Banco Central del Ecuador
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadecil-trimetilamonio
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetraacético
<b>EETP</b>	Estación Experimental Tropical Pichilingue
<b>He</b>	Heterocigosidad Esperada
<b>Ho</b>	Heterocigosidad Observada
<b>INEN</b>	Servicio Ecuatoriano de Normalización
<b>INIAP</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
<b>MAG</b>	Ministerio de Agricultura y Ganadería
<b>MCMC</b>	Método de Monte Carlo basado en cadenas de Markov
<b>mL</b>	Mililitros
<b>NJ</b>	Neighbor Joining
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>PIC</b>	Contenido de Información Polimórfica
<b>PCoA</b>	Análisis de Coordenadas Principales
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona

<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>SIPA</b>	Sistema de Información Pública Agropecuaria
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeats
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
<b>μL</b>	Microlitros

## Resumen

*Bixa orellana* L. (achiote, urucú, annatto) es una planta conocida por el característico color rojo-naranja que presentan las semillas de sus frutos, las cuales han servido para ser utilizadas principalmente como colorante natural alimenticio. Sin embargo, los beneficios que ofrece esta planta son más amplios y de gran importancia en el área farmacológica. Este trabajo de investigación tiene el objetivo de analizar la diversidad a nivel molecular que existe en la colección *ex situ* de achiote que se encuentra en la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP para mejorar la conservación de las accesiones, y tener un mejor conocimiento de la riqueza genética de la planta. Se realizó un genotipaje con 9 marcadores microsatélites (SSR) y un total de 371 muestras correspondientes a 191 accesiones. Con esta metodología se observó un total de 44 alelos, siendo todos los marcadores moleculares utilizados de carácter polimórfico. Sin embargo, se obtuvo un déficit de heterocigosidad en todos los marcadores y solamente cuatro (BorA2, BorB4, BorB10, BorB12) mostraron la presencia de alelos privados. Se obtuvo un agrupamiento de dos poblaciones conformadas por 220 y 151 individuos, evidenciando con el análisis de varianza molecular AMOVA que la mayor variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y entre individuos. Los dendrogramas realizados mostraron que de muy pocas accesiones se agruparon sus dos individuos en el mismo clado, por lo que se confirma que la colección de achiote del banco de germoplasma de la EETP cuenta con una amplia diversidad y que se debería clasificar de mejor manera sus individuos para tener una mejor preservación de los mismos.

*Palabras clave:* achiote, microsatélites, M13-tailing, genotipaje, diversidad genética

### Abstract

*Bixa orellana* L. (achiote, urucú, annatto) is a plant known for the characteristic red-orange color of the seeds of its fruits, which have been used mainly as a natural food coloring. However, the benefits offered by this plant are broader and of great importance in the pharmacological area. This research work has the objective of analyzing the diversity at the molecular level that exists in the *ex-situ* collection of achiote that is located in the Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP to improve the conservation of the accessions and have a better knowledge of the genetic richness of the plant. Genotyping was performed with 9 microsatellite markers (SSR) and a total of 371 samples corresponding to 191 accessions. With this methodology, a total of 44 alleles were observed, with all the molecular markers used being polymorphic. However, a heterozygosity deficit was obtained in all markers and only four (BorA2, BorB4, BorB10, BorB12) showed the presence of private alleles. A grouping of two populations made up of 220 and 151 individuals was obtained, evidencing with the AMOVA molecular analysis of variance that the greatest genetic variation is found within populations and among individuals. The dendrograms carried out showed that the two individuals of very few accessions were grouped in the same clade, thus confirming that the achiote collection of the EETP germplasm bank has a wide diversity and that its species should be classified in a better way to have a better preservation of them.

*Keywords:* annatto, microsatellites, M13-tailing, genotyping, genetic diversity

## Capítulo 1: Introducción

### Planteamiento del problema

Existen plantas que destacan gracias a su composición rica en pigmentos naturales, ya que juegan un rol importante tanto en el área alimenticia, como culturalmente en diferentes países. *Bixa orellana* L. (achiote o árbol de lápiz labial) es una planta de hábito arbustivo o arbóreo que se determina según su altura, y su distribución es extensa en varios países tropicales debido a su adaptabilidad a las condiciones ambientales que presentan éstos. Posee un fruto dehiscente tipo cápsula con pubescencia en su exterior, y la característica matiz distintiva rojo-naranja presente en las semillas se debe a la bixina, constituyente que abarca el 80% de los colorantes presentes (Vilar et al., 2014).

Los beneficios proporcionados por la planta de achiote han sido ampliamente aprovechados por comunidades indígenas en diferentes regiones, como los Asheninka, Awajún y Caral en Perú; los Tsáchilas, Waorani y Sarayaku en Ecuador; los Guambianos en Colombia; y los Arikapu y Kokama en Brasil, entre otros. Sus semillas han sido utilizadas principalmente como tinte para el cabello, lo que no solo tiene un significado cultural, sino que también ha servido como protección contra la radiación solar y picaduras de insectos, aplicándose el colorante sobre la piel. Además, las hojas de la planta han demostrado utilidad en la elaboración de infusiones para aliviar diversos malestares e inflamaciones (INIA, 2009).

Dada la creciente demanda global de sustituir los colorantes artificiales por alternativas naturales, la necesidad de estos ha aumentado de forma significativa. Adicionalmente, gracias a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha aprobado los colorantes naturales principalmente de especies vegetales como compuestos seguros y no tóxicos (Rivera-Madrid et al., 2006), el achiote presenta una oportunidad prometedora como cultivo económicamente viable debido a su alto contenido de carotenoides (CEPROBOL et al., 2004). Aunque su uso

predominante en la actualidad radica en su empleo como condimento alimentario, también es de utilidad en la tintura de textiles, pinturas y productos cosméticos.

Se debe enfatizar que Perú ocupa la posición principal como productor de semillas de achiote, generando aproximadamente 14.500 toneladas que se exportan con un valor de USD 700 por tonelada (López et al., 2018). En contraste con Ecuador que, a pesar de poseer las condiciones ambientales adecuadas para una amplia producción que podría elevarlo a un nivel de mayor comercialización e incluso exportación, la información actual sobre la producción y venta es limitada. Solamente en 2017, un artículo de El Diario Ecuador reportó que el achiote alcanzó su precio más alto, vendiéndose a USD 165 por quintal a fábricas nacionales como La Fabril y Ales. A pesar de estos avances, esta planta aún no ha recibido la atención y el reconocimiento que merece en otros aspectos comerciales.

### **Justificación del problema**

*Bixa orellana* L. más conocida como achiote o annatto, es una especie que exhibe una amplia diversidad genética fenotípica. Esto se evidencia en estudios llevados a cabo sobre la colección y mantenimiento de germoplasma de achiote en diferentes países de la región. No obstante, en comparación con Ecuador, no se han realizado estudios que aborden la diversidad y variabilidad genética existente de la especie tanto del único banco de germoplasma presente en la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP (EETP) que dispone de 191 accesiones y 615 individuos de achiote (*Bixa orellana* L.), como de especies silvestres. Así mismo, no existen registros de estudios genotípicos exhaustivos en el país, siendo el único enfoque un estudio morfológico realizado por Quishpe, (2022) que abarcó 92 de las 191 accesiones.

El objetivo principal de los estudios de diversidad genética radica en controlar efectivamente la erosión genética, abarcando, por ende, dos disciplinas: a) diversidad de recursos genéticos, b) domesticación y mejora genética que implica la introducción de algo

nuevo mediante modificaciones en el genotipo (Rimieri, 2017). Es importante que la agricultura se apoye de los bancos de germoplasma, ya que su diversidad y adaptabilidad al mercado puede beneficiar a un país tanto en su ámbito interno como en términos de comercialización internacional. Estos bancos desempeñan un papel crucial al conservar el material vegetal en condiciones *ex situ* de las especies más resistentes y con características destacadas, contribuyendo a la prevención de pérdida de diversidad genética de las especies (Caruso et al., 2015).

Vale la pena destacar que, la diversidad genética existente en las diversas especies vegetales ha sido crucial para su evolución, sin importar si son cultivadas o silvestres, ya que constituye el componente básico de la biodiversidad. Por esta razón, es necesario identificar los genotipos y la distribución genética presente en las diferentes accesiones de achiote, para optimizar la gestión de sus recursos genéticos, a pesar de que fenotípicamente expresan distintas morfologías (Caruso et al., 2015).

El presente trabajo de investigación se realizará con el objetivo de analizar la diversidad a nivel molecular existente en la colección *ex situ* de achiote que se encuentra en la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP, para aportar con información de interés que favorezca al desarrollo de una planificación correcta e integral de conservación, así como al conocimiento sobre la riqueza genética de la planta.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Caracterizar molecularmente 191 accesiones de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP

### **Objetivos específicos**

- Genotipar 191 accesiones de achiote (*Bixa orellana* L.) mediante la tecnología SSR-M13 *tailing*.
- Realizar un análisis de diversidad y estructura genética del material en estudio.
- Determinar la relación genética y el parentesco de los individuos de la colección del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP mediante un árbol filogenético.

### **Marco teórico**

#### ***Bixa orellana* L. (achiote)**

*Bixa orellana* L. originaria de la Amazonía de Brasil, presenta una amplia distribución en diversos países tropicales. Por consiguiente, se adapta adecuadamente a climas cálidos-húmedos, semicálidos y templados, principalmente en suelos húmedos y bien drenados. Estas condiciones climáticas proporcionan capacidad a la planta para tolerar temperaturas anuales medias entre 20-26°C, y precipitaciones anuales medias de 1250-2000 mm (Lim, 2012). En cuanto a su floración, no se produce de manera sincronizada, sino que generalmente ocurre en estaciones húmedas o invernales, con una duración aproximada de 3 a 4 meses. Y finalmente en su fructificación, la planta produce cápsulas dehiscentes que contienen alrededor de 20-55 semillas, variando según el tamaño del fruto (Coronel Coronel, 2020).

Desde una perspectiva genética, se estima que *Bixa orellana* L. presenta uno de los valores más bajos en términos de cantidad de ADN entre las angiospermas ( $4C = 0,78$  pg). Su cariotipo está compuesto por  $2n = 14$  cromosomas, aunque se han reportado recuentos de  $2n = 16$  en ciertas ocasiones (Rivera-Madrid et al., 2006). El achiote es una especie que se caracteriza por el color particular que exhiben las semillas de su fruto. Esta coloración se debe a pigmentos visibles de color rojo anaranjado producidos gracias a la presencia de

carotenoides, principalmente de apocarotenos como la bixina, norbixina e isobixina. Estas propiedades han permitido que actualmente exista un interés comercial de esta planta por sus colorantes (Vilar et al., 2014).

### **Características botánicas**

El achiote es una planta hermafrodita y alógama, cuya polinización se da por insectos, es de tipo arbóreo o arbustivo dependiendo su tamaño, ya que puede ir de los 2 a los 10 m de altura. Tiene un tronco cilíndrico de hasta 10 cm de diámetro, de corteza externa café claro con fisuras que podrían desprenderse, y corteza interna de color amarillo-anaranjada pegajosa; las ramas son delgadas y de color café claro similar al tronco. La copa es redondeada pero abundante de hojas alternas, simples, grandes, y ovaladas, tienen forma acorazonada en su base, y un envés de color marrón.

Posee de 8-50 flores fragantes en panículas ramificadas terminales de color blanco, rosado, o morado. Su cáliz y corola tienen 5 sépalos y pétalos anchos respectivamente. Por otro lado, sus frutos son generalmente dehiscentes, ovalados, y en forma de globo, ya que abarca en su interior a sus características semillas rojizas-anaranjadas. Los frutos se diferencian unos de otros por la presencia de pubescencia larga, corta, gruesa, o delgada, o de ausencia de esta. Finalmente, sus semillas son casi triangulares, pequeñas, con una cobertura pulposa de color rojo naranja brillante (Lim, 2012).

Pertenece a la familia Bixaceae siendo el único ejemplar del género *Bixa*, pero se han reconocido 5 especies y se distinguen por su tipo de crecimiento: *Bixa orellana* L. (arbusto), *B. arborea* Huber (árbol), *B. excelsa* Gleason & Krukoff (árbol), *B. platycarpa* Ruiz & Pav. ex G. Don (árbol), y *B. urucurana* Willd (arbusto). Se conoce que la única especie cultivada y explotada comercialmente es el arbusto de hoja perenne *Bixa orellana* L. (Gabriel Dequigiovanni et al., 2018a).

La información sobre su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica del achiote (Bixa orellana L.)*

<b>Clasificación</b>	<b>Nombre</b>
<b>Nombre común</b>	Achiote
<b>Otros nombres</b>	Achiotillo, Anatto, Achote, Carayarú, Colorado, Urucum
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>Superdivisión</b>	Embriofita
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisión</b>	Spermatophytina
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Superorden</b>	Rosanae
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Bixaceae
<b>Género</b>	<i>Bixa</i>
<b>Especie</b>	<i>Bixa orellana</i> L.

*Nota.* Datos adaptados de ITIS, (n.d.)

### ***Importancia del cultivo de achiote***

En la escala internacional el achiote es un producto cuya demanda en el mercado es alta, principalmente para ser utilizado como producto culinario y especia. Adicionalmente, gracias a la utilización del achiote desde hace varios años en culturas nativas de países sudamericanos, se conoce también que sus semillas, hojas y raíces tienen características para dar tratamientos antipiréticos, cardiotónicos, antidiarreicos, como repelente de insectos, laxante, para quemaduras, mordeduras de serpiente, hepatitis, diabetes, insecticida, diurético, gonorrea, expectorante, entre otros (Raddatz-Mota et al., 2017).

No obstante, estas características han llevado a estudios relacionados a conocer la composición fitoquímica de la planta, y en el ámbito de la biotecnología, la planta está desencadenando un importante impacto a través de investigaciones nuevas, innovadoras y novedosas, dirigidas a abordar diversas enfermedades. Shahid-ul-Islam et al., (2016) menciona que toda la planta está compuesta por carotenoides, apocarotenoides, terpenos, terpenoides, esteroides y compuestos alifáticos, siendo gracias a esto que presenta una amplia utilidad en el área farmacológica.

Desde un enfoque comercial a nivel global, no se encuentran especificaciones públicas detalladas sobre los requisitos de las semillas o los derivados de achiote. Esto se debe a que en gran medida está sujeto a los estándares internos de cada país, que incluyen las exigencias de calidad, así como los protocolos de envasado y etiquetado. Sin embargo, en todos los casos, se presta especial atención a la calidad de humedad de las semillas, la cual no debe exceder el 10%. Asimismo, se establece que el extracto de bixina debe contener un porcentaje que oscile entre el 2.5% y el 3.5% (CEPROBOL et al., 2004). Y en cuanto al ámbito nacional, la única utilización que se le otorga a la planta radica en la comercialización exclusiva de sus semillas hacia la industria dedicada a la producción de aceite de achiote.

### ***Cultivo de Bixa orellana L. en Ecuador***

En términos generales el achiote es una planta que se cultiva principalmente en zonas donde sus condiciones climáticas favorecen su producción, como son de la zona del litoral: Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Los Ríos; y en la Amazonía: Napo y Zamora Chinchipe (Artieda, 2010).

El cultivo de achiote se incentivó en el Valle de Jamboé, ya que nació como un emprendimiento para mejorar los ingresos familiares, como se indica en el artículo publicado por El Productor, (2016). Varias familias de la parroquia Timbara del cantón Zamora aprendieron sobre el cultivo de achiote para vender el producto a la Industria Lojana de Especerías (ILE) que elabora condimentos, llegando a sembrar alrededor de 5 hectáreas. Los productores aseguraban que se vendía absolutamente toda la producción, y que sería un ingreso seguro por 15 o 20 años más.

No obstante, ese mismo año un artículo publicado por Diario La Hora, (2016), informó que varios agricultores de la región costa bajaron el cultivo de achiote debido a su largo tiempo de espera para cosechar. Su cultivo fue reemplazado por plantas de ciclo corto para que les dé una mejor rentabilidad. Además, se mencionaba que, para obtener 1 libra de pasta de achiote, necesitaban aproximadamente 20 libras de semilla, representando un trabajo laborioso con un resultado no muy satisfactorio.

Por otro lado, LA FABRIL es una de las industrias que más compra achiote debido a que su marca de aceites Criollo elabora aceite vegetal de achiote. La Fabril, (2017) menciona que varios agricultores de Manabí buscan la manera de darle un valor agregado al achiote. Por esta razón han trabajado en conjunto con el Gobierno Provincial y el Ministerio de Agricultura para capacitar a los productores con el fin de mejorar su calidad de vida mediante la producción mejorada de achiote. Hasta ese momento se producían 30 quintales por hectárea, y si se lograba duplicar la producción, la empresa estaba dispuesta a pagar entre USD 85 y USD 90.

En el año 2017 también se señala en el artículo publicado por El Diario Ecuador, (2017) que el Gobierno Provincial de Manabí entregó alrededor de 50.000 plantas de achiote a la Asociación de achioteros, para que se distribuyan en los cantones: 24 de Mayo, Paján, Jipijapa y Olmedo. Con el fin de aumentar las hectáreas de cultivo y con esto producir mayor cantidad de achiote para mejorar la producción y, por lo tanto, las ventas a las industrias ecuatorianas La Fabril y Ales.

Sin embargo, hay que recalcar que si se busca esta información directamente de fuentes oficiales como el Sistema de Información Pública Agropecuaria (SIPA), Servicio Ecuatoriano de Normalización INEN, o el Banco Central del Ecuador (BCE), no se encuentran datos disponibles sobre el cultivo y venta de achiote macro ni microeconómicamente. Si revisamos las cifras territoriales por provincias en la página oficial del SIPA, podemos observar que ninguna de las provincias que cultivan achiote, lo producen o venden como producto agrícola, su sector económico concierne a otro tipo de productos.

Es importante destacar que el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), en el año 2020 inició un taller para enseñar a la parroquia Sarayaku la siembra y el tratamiento del cultivo de achiote, con el fin de mejorar su estado socioeconómico mediante la comercialización de la producción que se obtenga de estas. Ya que es una comunidad que se encuentra en una zona rural de la provincia de Pastaza donde resulta un poco difícil su accesibilidad (MAG, 2020).

### ***Diversidad y variabilidad genética***

La biodiversidad abarca la amplia gama de formas de vida que se encuentran en nuestro planeta. Esta riqueza implica la diversidad y variabilidad presentes entre todos los organismos vivos y los ecosistemas en los que interactúan. En esencia, la biodiversidad comprende la totalidad de las especies y la combinación de genes, especies y hábitats. A raíz de esta complejidad, la biodiversidad se estructura en tres niveles fundamentales: la diversidad

genética, la diversidad de especies y la diversidad de ecosistemas (Madan Mohan Malaviya Univ. of Technology Gorakhpur, 2020).

La diversidad genética constituye el componente vital de la variabilidad biológica que debe ser conservado, ya que produce variaciones que permiten a las poblaciones adaptarse a su entorno. Este término alude a las diferencias en el material hereditario entre organismos, manifestándose a nivel de nucleótidos, genes, cromosomas o genomas y abarca toda la variabilidad que ocurre entre genotipos (Domínguez et al., 2019). A pesar de ser considerado sinónimo de variabilidad genética, es crucial destacar que estos dos términos encapsulan estrategias y conceptos distintos. La variabilidad genética, por otro lado, se refiere a la variación de alelos de los genes y se manifiesta de formas diferentes en el fenotipo (Bhandari et al., 2017).

Existen diferentes formas de preservar la variabilidad genética, la más importante radica en la creación de bancos de germoplasma, ya que van a ser la base para obtener nuevas variedades con mejores beneficios. Los estudios de diversidad genética junto a la creación de variedades con mayor potencial son la clave para controlar efectivamente la erosión genética, es decir, evitar la pérdida acelerada de la diversidad genética en plantas de cultivo debido a actividades antropogénicas (Demey, 2008).

Hay que considerar que, si una especie se extingue pierde su genoma, y con ella la variación genética. Según Caruso et al., (2015), “Los programas que se basan en la colección, conservación, y caracterización de los recursos genéticos en plantas de cultivo, son importantes para mantener la diversidad genética dentro de las especies y la mejora genética” (p. 4). El estudio de la diversidad genética es importante para conocer el potencial de respuesta de las plantas en cuanto a su supervivencia y adaptación, así como de proveer estabilidad y seguridad en los sistemas agrícolas.

### **Marcadores moleculares**

Un marcador genético o molecular se refiere a un gen o a una secuencia de ADN cuyo tamaño o peso molecular es conocido, y se puede definir como una variación que puede surgir debido a mutaciones o alteraciones en los loci genómicos que se pueden observar (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015). Estos marcadores moleculares vinculan un gen específico que contiene variaciones con el propósito de identificar polimorfismos a nivel de ADN entre poblaciones o grupos de genes. Se consideran como herramientas altamente valiosas para la exploración de la genética en animales y seres humanos, el mejoramiento de plantas, así como la caracterización y gestión del germoplasma (Azofeifa, 2006). Un marcador se puede considerar ideal según Karlik & Tombuloğlu, (2016), "cuando cumplen con características tales como alto grado de polimorfismo, distribución uniforme en el genoma, expresión codominante, claras y distintivas características alélicas, copia única sin efectos pleiotrópicos, costos bajos, detección sencilla y disponibilidad alta y específica para una naturaleza" (p. 138).

Los marcadores moleculares se identifican por presentar diferentes características adecuadas para diferentes propósitos. Estos se pueden clasificar en:

1. Basados en PCR y basados en hibridación (Kordrostami & Rahimi, 2015).
2. Métodos que detectan objetivos específicos, clonados y secuenciados en el genoma, y métodos que utilizan cebadores conservados o generales que se amplifican desde muchos sitios a lo largo del genoma (Schulman, 2007).
3. Marcadores neutros, de genes y funcionales según su actividad y expresión (Bhandari et al., 2017).

En la Tabla 2 se presentan los diferentes tipos de marcadores moleculares.

Tabla 2

*Clasificación de los marcadores moleculares basados hibridación y PCR*

<b>Clasificación</b>	<b>Nombre del Marcador (ES)</b>	<b>Nombre del Marcador (ENG)</b>	<b>Acrónimo</b>
<b>Basados en hibridación</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción	Restriction Fragment Length Polymorphism	RFLP
	ADN polimórfico amplificado aleatorio	Random Amplified Polymorphic DNAs	RAPD
<b>Basados en PCR</b>	Polimorfismo de longitud de amplificación	Amplification Length Polymorphism	ALP
	Repetición de secuencia simple (Microsatélites)	Simple Sequence Repeat	SSRs
	Repeticiones cortas en tándem (Microsatélites)	Micro-satellites or Short Tandem Repeats	STRs
	Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado	Amplified Fragment Length Polymorphism	AFLP
	Regiones amplificadas caracterizadas por secuencia	Sequence Characterized Amplified Regions	SCARs
	Sitios etiquetados con secuencia	Sequence Tagged Sites	STS

<b>Clasificación</b>	<b>Nombre del Marcador (ES)</b>	<b>Nombre del Marcador (ENG)</b>	<b>Acrónimo</b>
<b>Basados en PCR</b>	Amplificación polimórfica única	Single Polymorphic Amplification Test	SPLAT
	Número variable de repeticiones en tandom	Variable Number of Tandom Repeats	VNTR
	Huellas dactilares de amplificación de ADN	DNA Amplification Fingerprinting	DAF
	Polimorfismo de nucleótido único	Single Nucleotide Polymorphism	SNPs
	Genotipado por secuenciación	Genotyping by sequencing	GBS
	Polimorfismo de conformación de cadena única	Single Strand Conformation Polymorphism	SSCP
	Repetición de secuencia interna simple	Intern-simple sequence repeat	ISSRs
	Polimorfismo de análogos de genes de resistencia	Resistance Gene Analogue Polymorphism	RGAP
	Tecnología de arreglos de diversidad	Diversity Arrays Technology	DArT

*Nota.* Datos adaptados de Grover & Sharma, (2016) & Kordrostami & Rahimi, (2015)

### ***Microsatélites (SSRs)***

Los microsatélites se conocen como repeticiones de secuencia simple (por sus siglas en inglés SSRs), son un tipo de ADN repetitivo que se encuentra en regiones codificantes y no codificantes, generalmente a elevadas concentraciones. Este tipo de marcadores tienen una longitud variable que oscila entre 5 – 40 repeticiones, e incluso tándems más largos debido a mutaciones frecuentes, o deslizamiento de errores de corrección durante la replicación del ADN (Onysk & Boczkowska, 2017).

Una de las grandes ventajas de estos marcadores, según Diniz et al., (2007), “es que son fácilmente detectables mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que un locus de microsatélites se encuentra cercado por secuencias únicas de ADN que se conservan dentro de la especie, o entre especies relacionadas”. Gracias a esto se pueden diseñar primers específicos para producir resultados altamente reproducibles. Estos marcadores han sido ampliamente utilizados en estudios genéticos de ligamiento en familias, estudios en plantas por su naturaleza hipervariable y codominante, diagnóstico biomédico de enfermedades, mapeo del genoma, investigaciones ecológicas, mejoramiento vegetal, estudios de diversidad poblacional. Cabe recalcar que la información obtenida por estos marcadores es en función del número de loci y diversidad alélica, ayudando a aumentar su precisión y éxito en las estimaciones genéticas (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015; Diniz et al., 2007).

### ***Genotipaje mediante la técnica de M13-tailing***

Se conoce como genotipado o genotipaje a la técnica mediante la cual se pueden detectar variaciones de ADN entre individuos de la misma especie, ya que revelan alelos específicos heredados por el individuo (Benítez et al., 2020). El genotipado mediante la utilización de marcadores genéticos, ayuda a identificar características genéticas de un organismo para poder diferenciarlo de otros individuos de la misma especie (OTRI, 2018).

La tecnología M-13 tailing se basa en un primer marcado con fluorescencia (M-13), que consiste en una secuencia obtenida de un vector bacteriano, utilizada para realizar genotipado en secuenciación de alto rendimiento. La función de este cebador consiste en acoplarse a la cola complementaria (5') de los primers SSR directos, para que se ejecute la hibridación del cebador fluorescente con los productos PCR que se generan en cada ciclo (Lorenz et al., 2001). Según Onysk & Boczkowska, (2017) la tecnología M-13 tailing con SSR requiere del uso de 3 cebadores:

1. Cebador universal M-13 marcado con fluorescencia;
2. Cebador específico directo con una secuencia adaptadora M-13 en 5' final;
3. Cebador inverso específico

Esto sirve para que, en los ciclos iniciales de PCR, los cebadores directos e inversos de la cola M-13, amplifiquen un locus de microsatélite y que, en las etapas finales donde acaba el cebador directo, se pueda hibridar M-13 universal en lugar del directo, incorporando a los productos de PCR del locus de microsatélite.

Realizar un genotipado con SSR ha demostrado ser de gran ayuda para establecer el perfil genético entre accesiones, y de esta forma estimar el nivel de fijación genética que posee cada accesión. En el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) se utiliza esta técnica aplicada al DNA Analyzer LI-COR 4300S, que consiste en el marcaje de uno de los iniciadores o primers con la fluorescencia M-13 en 700 u 800 nm, con el fin de caracterizar la diversidad genética de varias colecciones de germoplasma, especialmente en cultivos nativos (Aguilar et al., 2010).

### **Hipótesis**

H<sub>0</sub>: La colección de *Bixa orellana* L. del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP presenta diversidad genética suficiente para estructurar los taxones en clados.

H<sub>1</sub>: La colección de *Bixa orellana* L. del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue INIAP no presenta diversidad genética suficiente para estructurar los taxones en clados.

## **Capítulo 2: Materiales y Métodos**

### **Localización del estudio**

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP Km. 5 vía Quevedo-El Empalme, Cantón Mocache, Provincia de los Ríos, con Latitud Sur 01° 06' y Longitud Oeste de 79° 28'.

### **Material vegetal**

Los materiales genéticos utilizados en la presente investigación corresponden a la colección *ex situ* de achiote (*Bixa orellana* L.) que mantiene el Departamento de Recursos Fitogenéticos de la EET Pichilingue del INIAP. Según registros de campo, la colección constaba de 202 accesiones, pero al momento de tomar las muestras, 11 de ellas se encontraron muertas; por lo que el trabajo constituyó de un total de 191 accesiones.

### **Toma de muestras**

Se utilizaron un total de 371 muestras, correspondientes de 1 a 2 individuos por cada accesión. Para esto se recolectaron alrededor 3 hojas jóvenes fotosintéticamente activas (coloración verde), sin ningún tipo de lesión interna ni externamente. Posteriormente las hojas

se colocaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas, y se llevaron inmediatamente al laboratorio.

### **Extracción de ADN**

Las hojas se maceraron con la utilización de nitrógeno líquido, y el ADN se extrajo siguiendo el protocolo de extracción establecido por (Doyle & Doyle, 1991), con modificaciones por la autora, y basándose en el protocolo de Cerda-Granados & Díaz, (2013).

El tejido vegetal macerado se colocó en un tubo de 2 mL y previo al procedimiento de extracción, se realizaron dos lavados con buffer sorbitol que se detalla en la Tabla 3. A la muestra macerada se agregaron 1000  $\mu$ L del buffer sorbitol, se centrifugó por 8 min a 5700 r.p.m y se descartó el sobrenadante sin perder la muestra precipitada.

**Tabla 3**

*Composición de buffer sorbitol para lavado de muestras foliares de achote previa la extracción de ADN*

<b>REACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD PARA 50 mL</b>
Tris-HCl 1M pH 8	5 mL
Sorbitol	0.32 g
EDTA 0.5M	0.5 mL
PVP	0.5 g
2-mercaptoetanol	500 $\mu$ L
Agua destilada autoclavada	Aforar a 50 mL

Posteriormente se agregaron 1000  $\mu$ L del buffer de extracción CTAB precalentado a 65°C que fue previamente preparado con: 6 mL de CTAB al 7%, 1.5 mL de Tris HCl 1M pH 8, 4

mL de NaCl 5M, 0.6 mL de EDTA 0.5M, 0.15 g de PVP, 30  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol y se aforó a 15 mL. A continuación, se agregaron 5  $\mu$ L de proteinasa K y las muestras se incubaron a 65°C por 30 min agitando constantemente.

Los tubos se centrifugaron a 13.300 r.p.m por 5 min, y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregaron 700  $\mu$ L de cloroformo alcohol-isoamílico (CIA) en proporción 24:1 junto a 55  $\mu$ L de CTAB 7%. Se homogenizaron los tubos para formar una emulsión y se llevó a centrifugación por 16 min a 13.300 r.p.m. Se repitió este proceso una vez más utilizando solamente 700  $\mu$ L de CIA.

El sobrenadante se pasó a tubos nuevos de 1.5 mL, y se agregó 700  $\mu$ L de isopropanol frío. Se llevó a congelación -20°C overnight, y se centrifugó a 12.000 r.p.m por 5 min.

Después de la centrifugación se descartó con cuidado el isopropanol y se agregaron 1000  $\mu$ L de buffer de lavado que se detalla en la Tabla 4. Se centrifugó a 12.000 r.p.m por 5 min, y nuevamente se descartó el sobrenadante repitiendo el proceso con buffer de lavado.

#### **Tabla 4**

##### *Composición del buffer de lavado*

<b>REACTIVOS</b>	<b>CANTIDAD PARA 30 mL</b>
Acetato de amonio 0.01M	0.6 mL
Etanol 76%	23.75 mL
Agua destilada autoclavada	Aforar a 30 mL

*Nota.* Recuperado del artículo realizado por Cerda-Granados & Díaz, (2013)

Se eliminó el sobrenadante, y se secó el precipitado por 30 min. El pellet se resuspendió en 100  $\mu$ L de tampón Tris-EDTA (TE) y se agregaron 3  $\mu$ L de RNAsa A. Las

suspensiones se incubaron a 37°C por 30 min. Finalmente, las muestras se guardaron a -20°C para su conservación.

### Cuantificación del ADN por espectrofotometría

Para cuantificar las muestras obtenidas se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop LITE PLUS de Thermo Scientific, donde se midió la absorbancia a longitudes de 260 y 280 nm obteniendo los valores de concentración y pureza de ADN. Para saber la integridad del ADN, se corrieron las muestras totales en un gel de agarosa al 1% por 30 min a 100 V.

### Prueba de validación de ADN y microsatélites

Para comprobar la efectividad del ADN y la adecuada función de los 8 microsatélites se ejecutó primero una amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 8 muestras con cada cebador, siguiendo el programa de validación que se muestra en la Tabla 5. Se utilizó un Master mix de volumen 7.5 µL que es estandarizado para estas pruebas de validación en la EETP (Tabla 6), para esto el ADN total se diluyó a una concentración final de 10 ng/µL.

**Tabla 5**

*Programa de amplificación PCR para validación de cebadores microsatélites de **Bixa orellana** L.*

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Desnaturalización inicial	94	5 min
Desnaturalización	94	45 s
Anillamiento	TA	1 min
Elongación	72	2 min
Elongación final	72	7 min

<b>ETAPA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TIEMPO</b>
Etapa final	10	5 min

*Nota.* TA: Temperatura de annealing correspondiente a cada cebador

**Tabla 6**

*Master mix estandarizado de amplificación PCR para pruebas de validación de ADN y cebadores microsatélites*

<b>REACTIVOS</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>		<b>VOLUMEN 1 RX</b>
	<b>INICIAL</b>	<b>FINAL</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>
Agua ultrapura	--	--	2.18
Green Buffer PCR (X)	5	1.0	1.50
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2.0	0.60
dNTP's (mM)	5	0.3	0.38
Primer Forward ( $\mu$ M)	10	0.5	0.38
Primer Reverse ( $\mu$ M)	10	0.5	0.38
Taq Polymerase (U/ $\mu$ L)	5	0.1	0.10
Muestra ADN (ng/ $\mu$ L)	--	10	2.00
<b>Volumen total</b>			<b>7.5 <math>\mu</math>L</b>

Una vez verificada la validez de los cebadores con las 8 muestras de ADN de achiote, se escogió el cebador que mostró una banda más intensa para validar todas las muestras de ADN extraídas, con el fin de obtener bandas de amplificación de buena intensidad que se puedan observar en el equipo LI-COR 4300S.

### Prueba múltiple para genotipaje en LI-COR 4300S

Se utilizaron 9 microsatélites (Tabla 7) los cuales según Dequigiovanni et al., (2014) demostraron ser los más polimórficos. Para esta prueba fue necesario realizar una amplificación PCR con el fragmento M13-tailing (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') para que se adjunte a los cebadores forward y se pueda visualizar en el equipo LI-COR 4300S. Se utilizó el protocolo descrito por Morillo & Miño, (2011), cuyo programa de PCR se presenta en la Tabla 8, y el master mix para prueba monoplex en la Tabla 9.

**Tabla 7**

*Microsatélites (SSRs) utilizados para amplificación y genotipaje de **Bixa orellana L.***

SSRs	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Ta (°C)	Allele size (bp)
BorA2	(AC) <sub>7</sub>	F: CGAGGGGATGTGAAATTAGG R: CTGTTAGGGGACATTTTCATTG	65-55	228
BorB4	(GA) <sub>16</sub>	F: GCATCATCTCTGTGGGATCA R: ACGAGAAAATGAACGAGCTG	60-50	218
BorB10	(AG) <sub>14</sub>	F: CATGCCTCCTCTCGATCTCT R: ATCATTTCCTTGCCCAACTG	56	178
BorB12	(TG) <sub>14</sub> (AG) <sub>19</sub>	F: CACATGCCCTTTGATGGTTA R: TCATGTTCCGATCCTATGTGA	56	172
BorC12	(CAT) <sub>4</sub>	F: GAGATTGTCGTGCATGGGTA R: AGGAGGAAGGAAAGGAGGTG	60-50	194
BorF1	(TG) <sub>6</sub> (CT) <sub>17</sub>	F: CGTTCGTCCTGAAAATCTG R: CATTTCAGTGCAAGACC	60-50	154

SSRs	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Ta (°C)	Allele size (bp)
BorF9	(TATT) <sub>3</sub>	F: TCAACACACCACCACAATGA R: AGCTATGCCCAGAAAAAGGA	55-45	122
BorG4	(CA) <sub>16</sub>	F: TCCCTTTGTTTTCCATTGCT R: TATCCACCAGCAACATTGAC	55-45	209
BorG3	(GT) <sub>7</sub>	F: GTGTCACCCACAGAACACAA R: TGTTTCCAAGAAGCTAATGCAG	60-50	175

*Nota.* Datos recuperados del estudio realizado por Dequigiovanni et al., (2014)

**Tabla 8**

*Programa de amplificación PCR con M13-tailing para prueba múltiple de microsatélites de **Bixa orellana L.***

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
Desnaturalización inicial	94	2 min
Desnaturalización	95	4 min
Desnaturalización cíclica	95	1 min
Anillamiento	TA	2 min
Elongación	72	2 min
Elongación final	72	10 min
Estabilización	4	10 min

*Nota.* TA: Temperatura de annealing correspondiente a cada cebador; Datos recuperados del protocolo descrito por Morillo & Miño, (2011)

**Tabla 9**

*Master mix MONOPLEX de amplificación PCR con M13-tailing*

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN		VOLUMEN 1 RX ( $\mu$ L)
	INICIAL	FINAL	
Agua ultrapura	--	--	0.32
Buffer PCR colorless (X)	5	1	1.00
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2.5	0.50
dNTP's (mM)	5	0.2	0.20
M13 700/800	1	0.16	0.80
Primer Forward ( $\mu$ M)	1	0.01	0.05
Primer Reverse ( $\mu$ M)	10	0.16	0.08
Taq Polymerase (U/uL)	5	0.05	0.05
Muestra ADN (ng/ $\mu$ L)	5	2	2.00
<b>Volumen total</b>			<b>5 <math>\mu</math>L</b>

*Nota.* Datos recuperados del protocolo descrito por Morillo & Miño, (2011)

Se realizó un gel de poliacrilamida al 3.5% para visualizar el resultado del fluoróforo en el equipo LI-COR 4300S a una longitud de onda de 700 nm.

Se obtuvieron 4 combinaciones correspondientes a 4 dúplex que se muestran en la Tabla 10, y un monoplex solo para el marcador BorG3. Para realizar la prueba dúplex se utilizó el mismo programa de amplificación de la Tabla 8, y se utilizó otro Master mix presentado en la Tabla 11. Se visualizó en el mismo gel de poliacrilamida al 3.5% a una longitud de onda de 800nm.

**Tabla 10***Combinaciones dúplex para genotipaje*

Combinaciones	SSRs	Allele size
		(bp)
DÚPLEX 1	BorA2	228
	BorB10	178
DÚPLEX 2	BorB4	218
	BorB12	172
DÚPLEX 3	BorC12	194
	BorF9	122
DÚPLEX 4	BorF1	154
	BorG4	209

**Tabla 11***Master mix DÚPLEX de amplificación PCR con M13-tailing*

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	CONCENTRACIÓN	VOLUMEN 1 RX
	INICIAL	FINAL	( $\mu$ L)
Agua ultrapura	--	--	0.32
Buffer PCR colorless (X)	5	1	1.00
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	2.5	0.50
dNTP's (mM)	5	0.2	0.20
M13 700/800	1	0.16	0.80
Primer Forward 1 ( $\mu$ M)	1	0.01	0.05
Primer Reverse 1 ( $\mu$ M)	10	0.16	0.08

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	VOLUMEN 1 RX ( $\mu$ L)
Primer Forward 2 ( $\mu$ M)	1	0.01	0.05
Primer Reverse 2 ( $\mu$ M)	10	0.16	0.08
Taq Polymerase (U/ $\mu$ L)	5	0.05	0.05
Muestra ADN (ng/ $\mu$ L)	5	2	2.00
<b>Volumen total</b>			<b>5 <math>\mu</math>L</b>

*Nota.* Datos recuperados del protocolo descrito por Morillo & Miño, (2011)

### Genotipaje de las muestras en LI-COR 4300S Biosciences®

El genotipaje se realizó primero con una amplificación PCR de M13-tailing de las muestras con las combinaciones antes mencionadas, el master mix y el programa del termociclador correspondientes para dúplex. Los productos de amplificación se protegieron de la luz con papel aluminio para evitar la degradación del fluoróforo M13. Se añadieron 7  $\mu$ L de solución Blue Stop (compuesto por: EDTA, formamida y azul de bromofenol) con una micropipeta multicanal.

Se centrifugó la placa 1 min y se desnaturalizó primero colocando la placa en un termobloque a 95°C por 3 min, y pasando inmediatamente a hielo. Al gel de poliacrilamida al 3.5% ubicado verticalmente en el equipo LI-COR 4300S se le colocó con una pipeta de microjeringa Hamilton aproximadamente 0.8  $\mu$ L de muestra en cada pocillo. Se dispensó 0.5  $\mu$ L del marcador de talla IRDye 800 con una micropipeta, y se realizó la corrida electroforética por 1 hora y media a 1500 voltios.

Posteriormente se realizó un análisis del resultado obtenido en cada gel (ver Anexo A) en el software SAGA-GT. En este programa se insertaron los datos de las muestras con las que se trabajó en cada placa como la ubicación y el nombre, el tamaño en pares de bases (bp) del marcador de talla, los datos de cada SSR como el tamaño esperado del alelo, las

combinaciones o dúplex, y la imagen del gel descargada como .tif del programa respectivo de LI-COR.

Con la ayuda del software se obtuvo un gel digital donde se realizó el genotipaje. En este gel se marcó la ubicación de cada muestra, y los alelos correspondientes de cada una.

### **Análisis de diversidad genética**

Este análisis se realizó con la ayuda del programa bioinformático Power Marker V3.25 desarrollado por Liu & Muse, (2005), donde se obtuvo un resumen estadístico con información sobre el número de observaciones, frecuencias alélicas, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada, y contenido de información polimórfica (PIC).

### **Análisis de estructura genética**

Para la evaluación de la estructura genética se trabajó con el programa STRUCTURE 2.3.4, donde se obtuvo una matriz de disimilaridad y la asignación de genotipos a poblaciones, es decir, el número de grupos (K). Para esto se utilizaron las siguientes condiciones: periodo de quemado de 100.000, número de repeticiones Método de Monte Carlo basado en cadenas de Markov (MCMC) después del quemado de 1.000.000, con modelo Admixture, K del 1 al 10, y 10 iteraciones por cada K.

Se realizó un árbol filogenético con la ayuda del programa DARWIN 6.0.21 a partir de una matriz de disimilaridad y con el método del vecino más cercano (Neighbor Joining); y un dendrograma con el programa PHYTON utilizando el método UPGMA.

### **Análisis Molecular de Varianza y estadísticos F**

Con Genetic Analysis in Excel 6.5 (GenAlex 6.5) se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), se obtuvieron los estadísticos F, el análisis de coordenadas principales (ACoP) y de conglomerados (AC), para determinar la diferenciación genética entre los grupos formados.

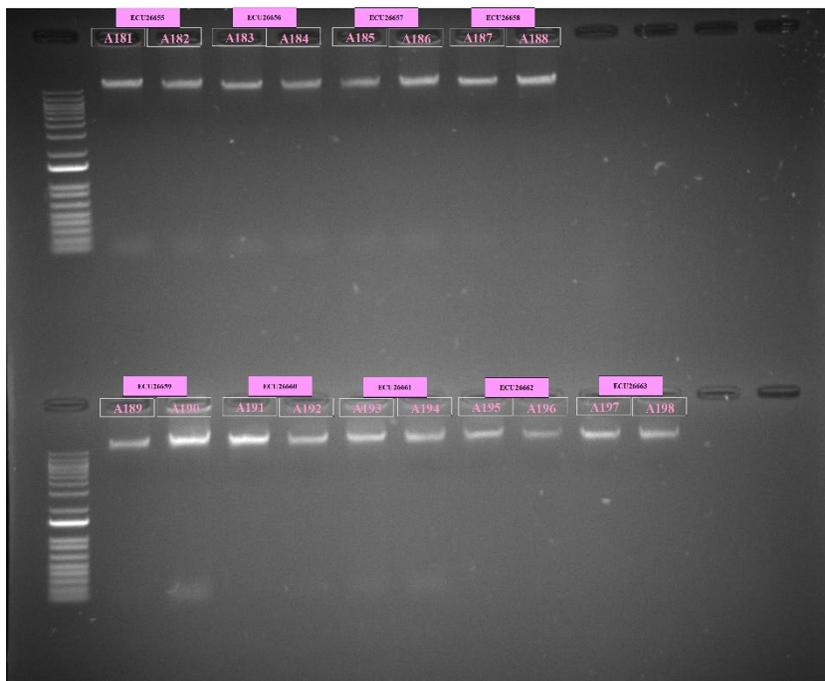
### Capítulo 3: Resultados

#### Extracción de ADN y cuantificación por espectrofotometría

Las modificaciones implementadas en el proceso de extracción se llevaron a cabo en dos etapas. En primer lugar, se realizó un lavado con buffer de sorbitol antes de aplicar el protocolo de extracción de ADN. Además, se introdujo una modificación adicional que comprendió el empleo de un buffer de lavado para el pellet, que contenía etanol al 76% y acetato de amonio. Como resultado de estas adaptaciones, se logró obtener ADN con una integridad notable (Figura 1) y concentraciones superiores a 100 ng/ $\mu$ L. Además, el índice de absorbancia 260/280 se mantuvo en el rango óptimo de 1.8-2 (Tabla 12).

#### Figura 1

*Integridad de ADN extraído de muestras de achote (B. orellana L.)*



*Nota.* La figura muestra la integridad del ADN que se obtuvo de la extracción con el protocolo Doyle & Doyle modificado.

Tabla 12

Concentraciones de ADN y radio de absorbancia A260/A280 de muestras de *achiote* (*B. orellana* L.)

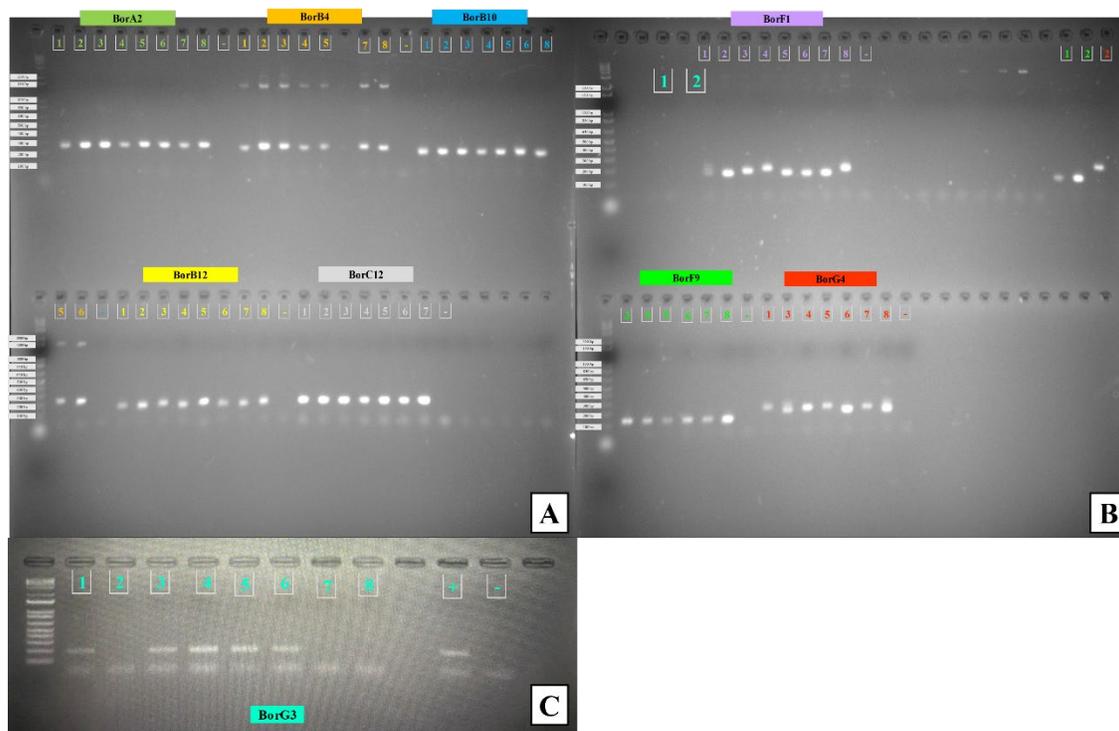
ID	NOMBRE ACCESIÓN	MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ng/ $\mu$ L)	A260/A280
A181	ECU26655	655.1	394.691	2.04
A182		655.2	403.301	2.011
A183	ECU26656	656.1	374.91	2.023
A184		656.2	337.19	2.027
A185	ECU26657	657.1	424.255	2.01
A186		657.2	394.627	2.006
A187	ECU26658	658.1	273.291	2.062
A188		658.2	443.075	1.964
A189	ECU26659	659.1	269.52	1.932
A190		659.2	839.205	1.99
A191	ECU26660	660.2	441.212	1.95
A192		660.3	493.743	1.969
A193	ECU26661	661.1	579.916	1.993
A194		661.2	381.209	2.003
A195	ECU26662	662.1	283.823	1.898
A196		662.2	283.043	1.882
A197	ECU26663	663.1	279.61	1.855
A198		663.2	328.019	1.913

## Prueba de validación de ADN y microsatélites

Como resultado de la validación de microsatélites se obtuvieron bandas de buena intensidad, con el tamaño correspondiente a cada SSR (Figura 2). En cuanto a la validación de ADN que se realizó con el SSR BorC12, todas las muestras presentaron bandas de intensidad similar, y de aproximadamente 190bp (Figura 3).

### Figura 2

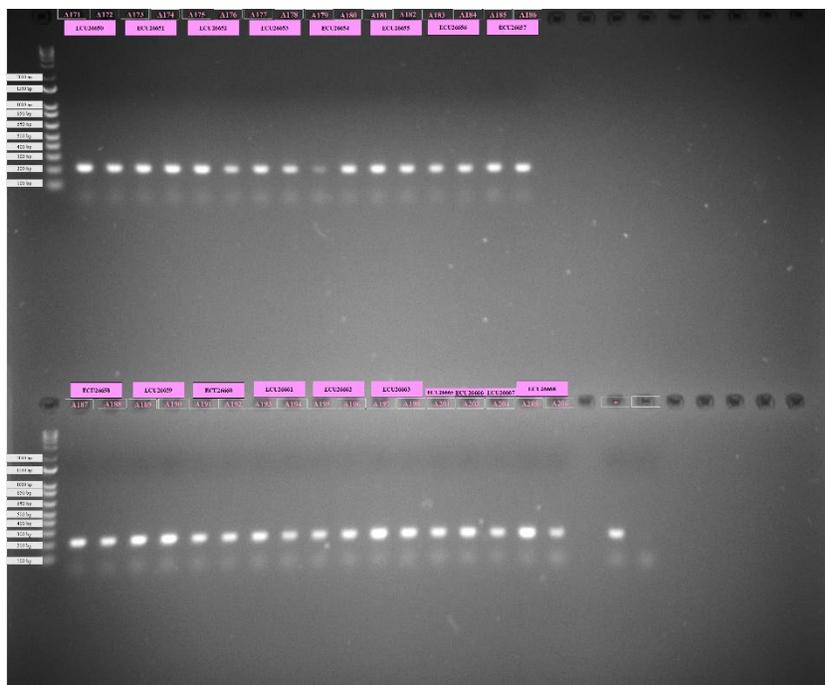
*Prueba de validación de los 8 microsatélites respectivos para achote (*B. orellana* L.)*



*Nota.* La imagen A presenta el resultado de la amplificación con los 5 primeros microsatélites. En la imagen B se observa la amplificación de los 3 microsatélites restantes, y en la imagen C la amplificación de BorG3. Todos presentan bandas intensas con el tamaño del alelo aproximado a lo reportado por Dequigiovanni et al., (2014).

### Figura 3

#### Validación de muestras de ADN de achote con SSR BorC12



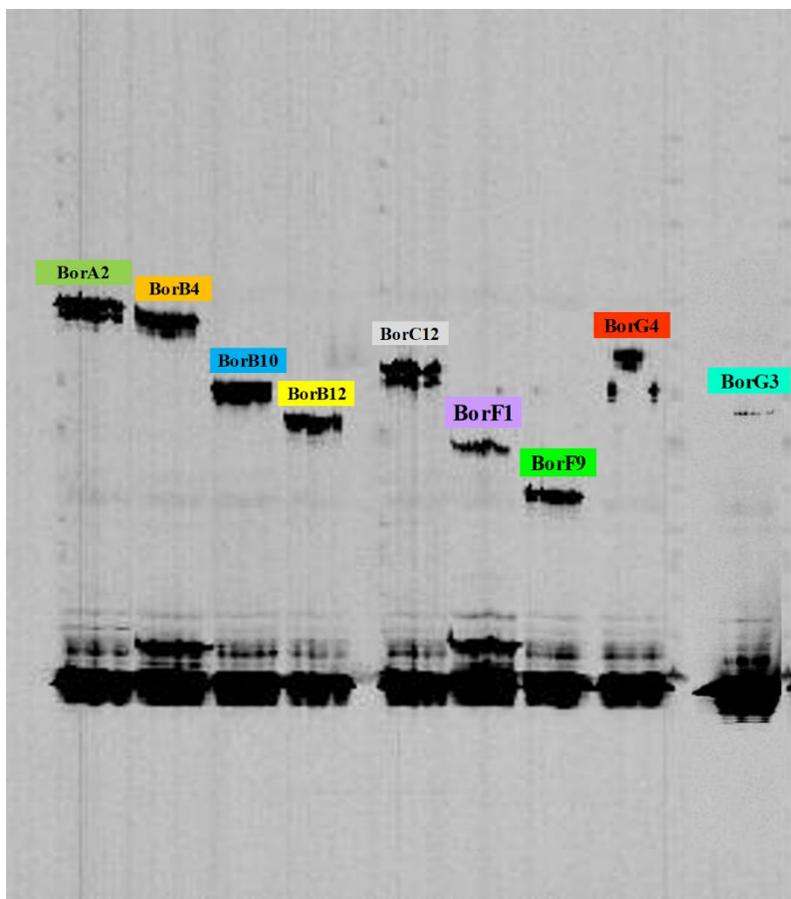
*Nota.* En esta figura se presenta la validación de algunas muestras de ADN de achote (*B. orellana* L.) con el SSR BorC12.

#### Prueba múltiple para genotipaje en LI-COR 4300S

Como resultado de la amplificación individual de cada SSR con M13 se obtuvo una diferencia significativa en el tamaño de los alelos, haciendo posible la combinación de marcadores para realizar 4 dúplex.

### Figura 4

#### Prueba múltiple con 8 SSR de achote en LI-COR 4300S



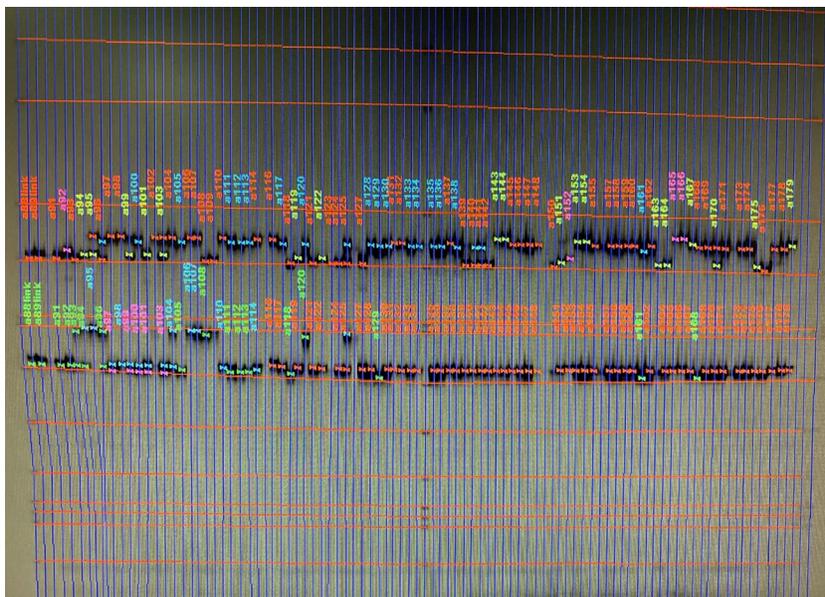
*Nota.* Las combinaciones se realizaron con los SSR que presentan una mayor diferencia en el tamaño de alelos entre ellos.

#### **Genotipaje de las muestras en LI-COR 4300S Biosciences®**

Con las 371 muestras se realizó la amplificación de 5 placas compuestas por: 89, 91, 91, 91, y 9+gaps muestras. Con cada placa se realizaron 5 amplificaciones con la tecnología M13-tailing, correspondientes a 4 dúplex y 1 monoplex, en total 25 reacciones PCR. El software SAGA-GT sirvió para analizar todas las amplificaciones en los respectivos geles digitales. En cada una se realizó el genotipaje manual como se observa en la Figura 5, y se obtuvo como resultado una matriz de Excel con el número y el tamaño de los alelos por cada muestra.

**Figura 5**

*Gel digital de muestras de achote genotipado en el software SAGA-GT*



*Nota.* En el gel digital se observan: líneas azules que corresponden a líneas guía de cada muestra; líneas rojas que son la guía del marcador de talla; y los nombres de cada muestra marcados por su respectivo alelo.

### **Análisis de diversidad genética**

Los 9 marcadores moleculares SSR mostraron resultados polimórficos, obteniendo un total de 44 alelos. La cantidad de alelos por locus varió de 3 (BorF9) a 7 (BorG4), obteniendo un promedio de  $4.8 \approx 5$  alelos por locus. También se pudo obtener el valor de Contenido de Información Polimórfica (PIC) de cada locus, con un promedio de 0.4637, un mínimo de 0.2173 (BorF9) y un máximo de 0.7127 (BorG3) (Tabla 13).

Se obtuvo un valor de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) promedio de 0.5175, que variaba de 0.2322 a 0.75, mientras que la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), tuvo un promedio de 0.0824, y su rango variaba de 0 a 0.2764 (Tabla 13). Se evidenció una deficiencia de heterocigotos en todos los loci de 0 a 27%.

**Tabla 13**

*Análisis de diversidad genética de 371 individuos de **Bixa orellana L.***

<b>Marcador</b>	<b>Mayor frecuencia alélica</b>	<b>No. de genotipos</b>	<b>No. de observaciones</b>	<b>No. de alelos</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>PIC</b>
<b>BorA2</b>	0.7008	7.0000	371	5	0.4568	0.0863	0.4051
<b>BorB4</b>	0.4933	8.0000	371	5	0.6438	0.0539	0.5825
<b>BorB10</b>	0.7278	9.0000	371	5	0.4432	0.0997	0.4139
<b>BorB12</b>	0.6779	8.0000	371	4	0.4726	0.0377	0.4098
<b>BorC12</b>	0.5431	8.0000	371	4	0.5447	0.1482	0.4493
<b>BorF1</b>	0.6201	13.0000	333	6	0.5594	0.0390	0.5147
<b>BorF9</b>	0.8706	3.0000	371	3	0.2322	0.0000	0.2173
<b>BorG4</b>	0.3794	19.0000	369	7	0.7500	0.2764	0.7127
<b>BorG3</b>	0.5514	5.0000	185	5	0.5544	0.0000	0.4677
<b>Media</b>	0.6183	8.8889	345.8889	4.8889	0.5175	0.0824	0.4637

*Nota.* Se puede encontrar en esta tabla los datos obtenidos por el programa bioinformático

Power Marker. He es la Heterocigosidad esperada, Ho heterocigosidad observada, PIC es el Contenido de Información Polimórfica.

El índice de diversidad de Shannon (IS) tuvo una media de 0,933, con un rango de 0,475 a 1,388 (Tabla 14). Se calculó una estimación de diversidad genética de las 371 muestras, de las cuales aproximadamente 26 presentaron alelos privados solamente en cuatro SSR (Tabla 15), y también se obtuvo la frecuencia alélica de cada SSR (Tabla 16).

**Tabla 14**

*Datos informativos de heterocigosidad e índice de Shannon de 371 individuos de **Bixa orellana L.** por SSR*

Marcador	% Heterocigotos	IS
BorA2	8.4	0.815
BorB4	3.5	1.158
BorB10	9.7	0.887
BorB12	3.2	0.792
BorC12	14.6	0.874
BorF1	3.5	1.072
BorF9	0	0.475
BorG4	27	1.388
<b>Media</b>	<b>8.7</b>	<b>0.933</b>

*Nota.* Se muestra en la tabla el % de heterocigotos que tuvo cada marcador, y el valor del índice de Shannon (IS). Se descartó el SSR BorG3 ya que presentaba un 66% de información total, cuando se debe tener más del 90% para tener resultados confiables.

### Tabla 15

*Datos de alelos privados por marcador encontrados en el análisis de diversidad genética de Bixa orellana L.*

Marcador	Alelo	Freq	No. Obsv
BorA2	232	0.005	2
BorA2	214	0.010	3
BorB4	210	0.033	10
BorB4	226	0.050	15
BorB10	168	0.003	1
BorB12	172	0.060	18

*Nota.* La tabla muestra los alelos privados que se encontraron en el análisis de diversidad genética de las 371 muestras de achiote.

**Tabla 16**

*Frecuencias alélicas observadas en cada marcador molecular de los 371 individuos de **Bixa orellana L.***

<b>Marcador</b>	<b>Alelo</b>	<b>Freq.</b>
	214	0.010
	224	1.375
<b>BorA2</b>	228	0.178
	230	0.433
	232	0.005
	210	0.033
	212	0.516
	218	0.961
<b>BorB4</b>	222	0.440
	226	0.050
	168	0.003
	174	0.248
<b>BorB10</b>	180	1.420
	184	0.219
	188	0.110
	158	1.378
<b>BorB12</b>	162	0.486

<b>Marcador</b>	<b>Alelo</b>	<b>Freq.</b>
<b>BorB12</b>	172	0.060
	180	0.077
<b>BorC12</b>	176	0.085
	179	0.028
	191	0.775
	194	1.112
<b>BorF1</b>	138	0.024
	148	1.202
	152	0.290
	154	0.403
	162	0.017
	164	0.064
<b>BorF9</b>	118	0.200
	120	1.715
	122	0.084
<b>BorG4</b>	181	0.061
	183	0.340
	187	0.064
	201	0.222
	205	0.831
	209	0.020
	213	0.461

*Nota.* La tabla presenta las frecuencias alélicas de cada alelo en su respectivo marcador. Estos datos nos ayudan a observar qué tan común o privativo se encuentra ese alelo en la población.

### **Análisis de estructura genética**

Para analizar el grado de diferencia de los individuos basándonos en la obtención de una matriz de disimilitud, se utilizó el programa DARWIN. Con los datos obtenidos de la disimilaridad de las muestras, se realizó un árbol filogenético en el mismo programa (Figura 6), donde se puede evidenciar el agrupamiento de las muestras según la distancia entre ellos. En este árbol se observa que, ambos individuos de muy pocas accesiones se agruparon en el mismo clado como el individuo A1 con A2, A161 con A162, A113 con A112, A224 con A225, entre otros; además permite visualizar el agrupamiento de individuos que son de diferentes accesiones, demostrando que son similares genéticamente como A264 con A203, A226 con A303, A271 con A130, entre otros (ver Anexo F).



Los 371 individuos de achote correspondientes a 191 accesiones del banco de germoplasma de la EETP, se agruparon en grupos genéticos con la ayuda del programa bioinformático STRUCTURE. En este programa se obtuvo una tabla de datos donde se muestra un valor de  $\Delta K$  máximo en K2 de 124.96, sin embargo, se podía considerar posibles subestructuras en K7 ( $\Delta K=42.877$ ) y K9 ( $\Delta K=25.03$ ) (Tabla 17). Esto se puede corroborar con el gráfico de  $\Delta K$  vs K (Figura 7).

**Tabla 17**

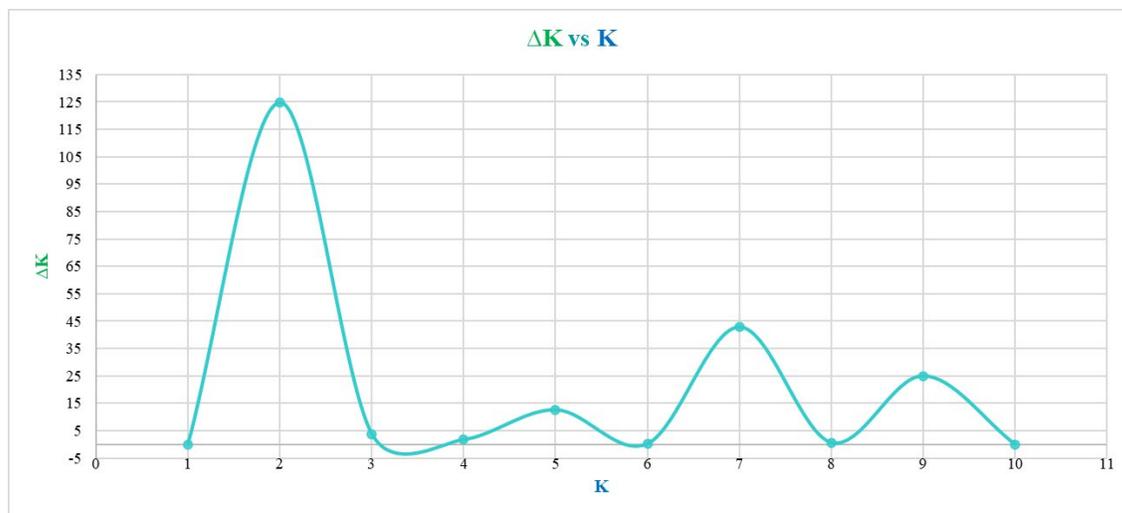
*Datos de K para asignación de poblaciones de **Bixa orellana L.***

# K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-5647.74	0.0966	NA	NA	NA
2	10	-5089.53	1.7969	558.21	224.55	124.96231
3	10	-4755.87	8.9256	333.66	34.18	3.829424
4	10	-4456.39	59.0826	299.48	101.73	1.721827
5	10	-4258.64	3.1295	197.75	39.46	12.609038
6	10	-4100.35	1.9501	158.29	0.42	0.215377
7	10	-3942.48	1.9612	157.87	84.09	42.877274
8	10	-3868.7	41.0943	73.78	26.04	0.633665
9	10	-3768.88	2.0986	99.82	52.54	25.036085
10	10	-3721.6	23.3857	47.28	NA	NA

*Nota.* Los datos de la tabla se obtuvieron mediante el método de Evanno con el programa Structure Harvester. El mayor valor de delta K es el que nos indica la cantidad de poblaciones (#K) a las que se asignan los individuos.

## Figura 7

*Estimación de poblaciones asignadas para los 371 individuos de **Bixa orellana L.***

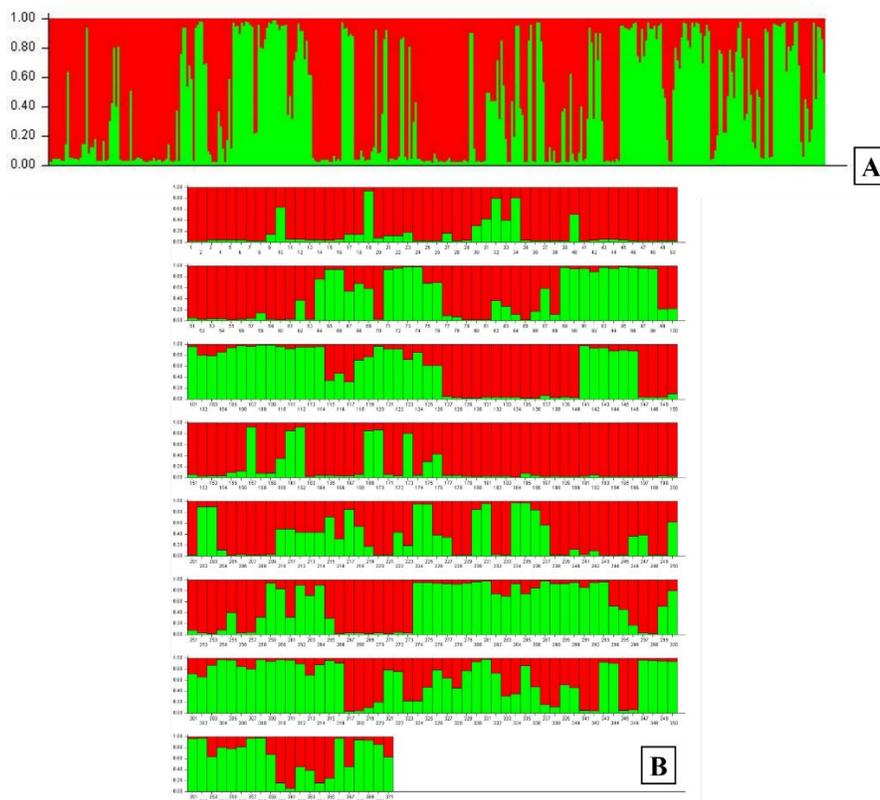


*Nota.* El gráfico muestra en las coordenadas X los valores de K, y en Y los valores de  $\Delta K$ . Se observa el punto máximo de  $\Delta K$  en K2, y dos puntos altos en K7 y K9. Sin embargo, se escoge K2 porque la variación dentro de cada población empieza a disminuir según se aumenta el número de poblaciones.

Las dos poblaciones asignadas con STRUCTURE se muestran en la Figura 8, las cuales constan de 151 y 220 individuos en la Población 1 y Población 2 respectivamente. Se observa que todos los individuos pertenecen tanto a una población como a otra, sin embargo, de cada una se obtuvo un porcentaje que ayudó a clasificarlas en una u otra población. La suma de los valores obtenidos de cada muestra debe ser 1.00 (rango observado en el eje Y de los gráficos).

## Figura 8

*Grupo de poblaciones asignados (K2) para los 371 individuos de **Bixa orellana L.***

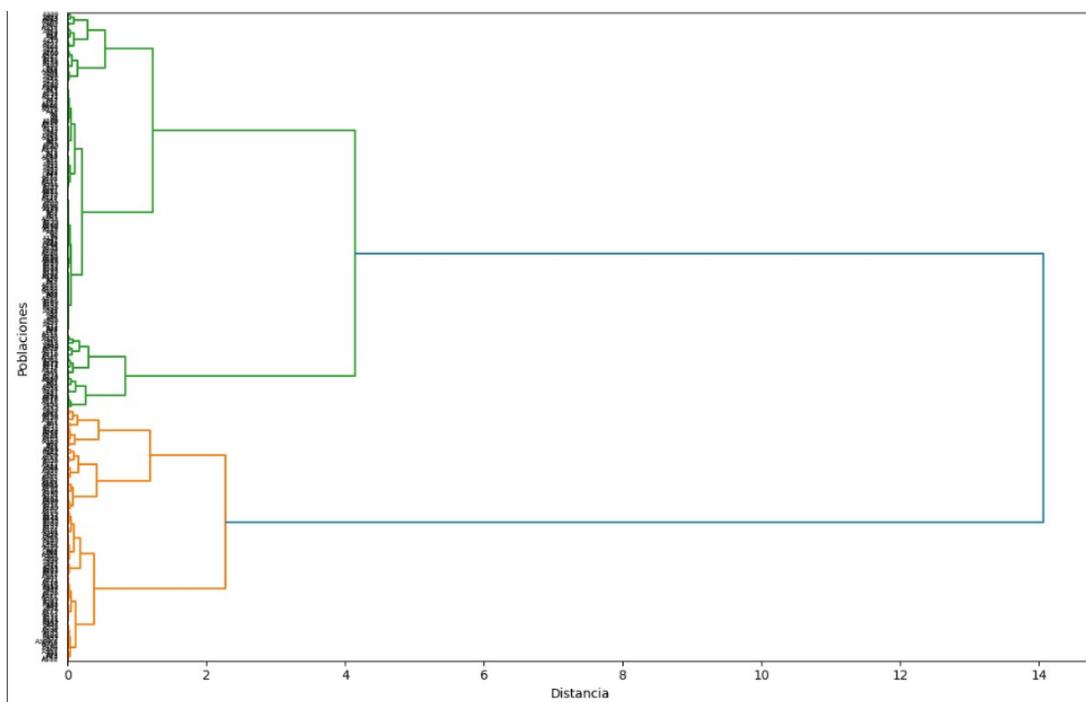


*Nota.* En la figura se muestran los gráficos obtenidos en el programa bioinformático STRUCTURE. La figura A muestra las dos poblaciones (K2) en un solo gráfico, mientras que en la figura B se observan las dos poblaciones asignadas a cada individuo. En rojo se muestra la Población 1, y en verde se muestra la Población 2.

Una vez asignadas las poblaciones se realizó la construcción de un dendrograma con el método UPGMA. En el nuevo gráfico se encontró una relación entre los individuos que concuerda con lo obtenido por STRUCTURE (Figura 9) (ver Anexo G) con la formación de dos poblaciones. Los individuos más distantes dentro de la población de estudio son A320 de la accesión ECU26734 y A108 de la accesión ECU26617.

## Figura 9

*Dendrograma UPGMA de los 371 individuos de **Bixa orellana L.***



*Nota.* El dendrograma realizado por el método UPGMA divide los individuos en dos poblaciones. La población verde corresponde a la Población 1 compuesto por 226 individuos, y la Población 2 naranja está compuesto por 145 individuos.

Por otro lado, el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg por poblaciones y por cada marcador, muestra una importante significancia, ya que todos los valores obtenidos de  $\chi^2$  son mayor que el Chi crítico, así mismo las frecuencias observadas son mayores a las esperadas, mostrando una desviación del equilibrio (Tabla 18) (ver Anexo H).

**Tabla 18**

*Equilibrio de Hardy-Weinberg calculado por poblaciones para cada SSR de **Bixa orellana L.***

Poblaciones	Marcador	Grado de libertad	ChiSq	Signif
Pob1	BorA2	6	511.413	***

Poblaciones	Marcador	Grado de libertad	ChiSq	Signif
Pob1	BorB4	3	343.916	***
Pob1	BorB10	6	328.662	***
Pob1	BorB12	3	300.910	***
Pob1	BorC12	6	415.344	***
Pob1	BorF1	15	629.702	***
Pob1	BorF9	3	440.000	***
Pob1	BorG4	21	695.371	***
Pob2	BorA2	6	231.449	***
Pob2	BorB4	10	547.017	***
Pob2	BorB10	10	341.847	***
Pob2	BorB12	6	418.945	***
Pob2	BorC12	6	228.520	***
Pob2	BorF1	15	546.857	***
Pob2	BorF9	3	302.000	***
Pob2	BorG4	21	249.768	***

*Nota.* La tabla presenta los valores de Chi<sup>2</sup> obtenidos para el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se observa una elevada significancia, ya que ns=no significativo, \* P<0.05 (significativo), \*\* P<0.01 (moderadamente significativo), \*\*\* P<0.001 (muy significativo).

### **Análisis Molecular de Varianza y estadísticos F**

El análisis AMOVA reveló que el 5% de la variación genética se dio entre poblaciones, y el 95% dentro de las poblaciones (Tabla 19), mostrando que la mayor parte de la diversidad se encuentra dentro de las poblaciones (Figura 10). Esto se corroboró realizando otro AMOVA incluyendo la evaluación de individuos, obteniendo que el 5% corresponde a la variación entre

poblaciones, el 17% variación dentro de los individuos, y un 78% a la variación entre individuos (Tabla 20). Dentro de cada población se encuentra agrupado un significativo número de individuos, por lo que la variación entre ellas (Figura 11), es lo que hace que exista una mayor variación dentro de las poblaciones.

**Tabla 19**

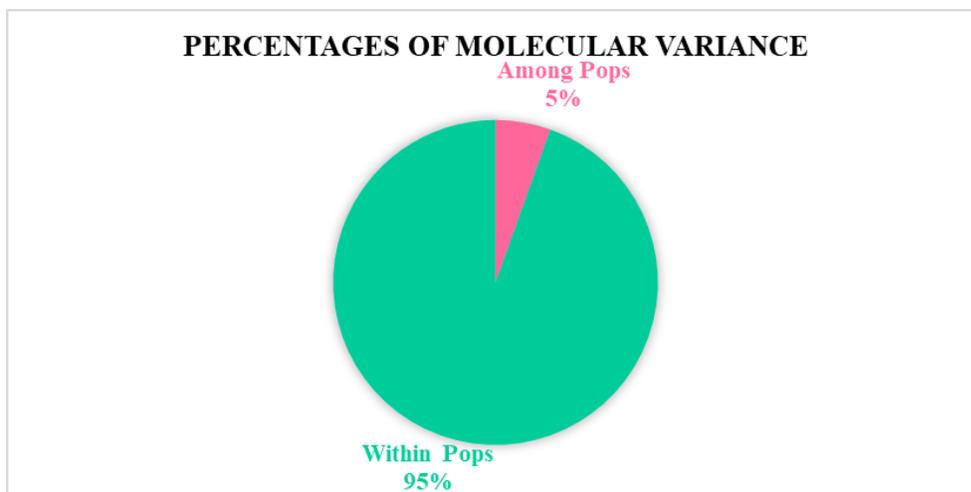
*Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para 371 individuos de **Bixa orellana L.** y 8 SSR*

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	Variación estándar	%
<b>Entre poblaciones</b>	1	44.403	44.403	0.118	5%
<b>Dentro de las poblaciones</b>	740	1506.532	2.036	2.036	95%
<b>Total</b>	741	1550.935		2.154	100%

*Nota.* En la tabla se muestran los resultados obtenidos del AMOVA de poblaciones realizado con GenAlex. SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio.

**Figura 10**

*Gráfico de pastel del porcentaje de varianza molecular de poblaciones*



*Nota.* El diagrama de pastel muestra gráficamente el resultado de los porcentajes obtenidos en el análisis de AMOVA de poblaciones.

**Tabla 20**

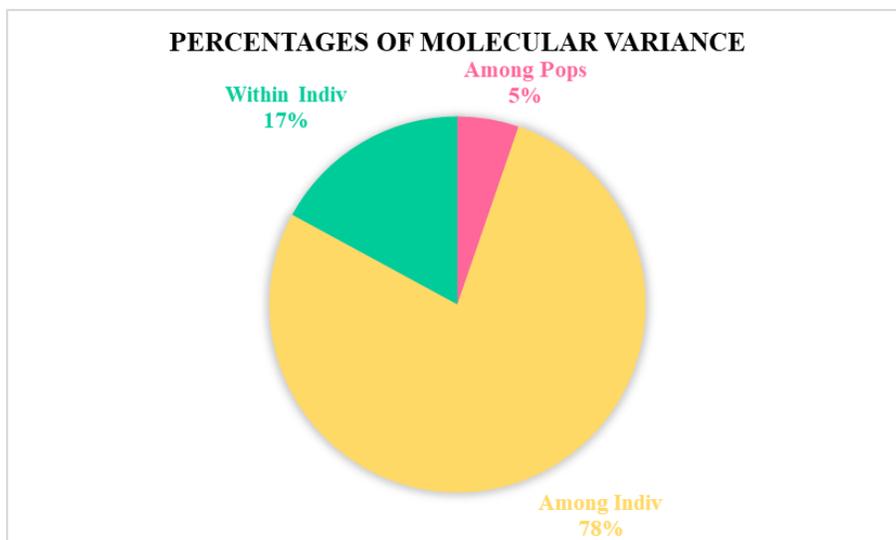
*Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para **Bixa orellana L.** incluyendo análisis de individuos*

Fuente de variación	Grados de libertad	SS	MS	Variación estándar	%
<b>Entre poblaciones</b>	1	44.403	44.403	0.114	5%
<b>Entre individuos</b>	369	1370.032	3.713	1.672	78%
<b>Dentro de los individuos</b>	371	136.500	0.368	0.368	17%
<b>Total</b>	741	1550.935		2.154	100%

*Nota.* La tabla presenta los resultados obtenidos del AMOVA de poblaciones incluido el análisis por individuo realizado con GenAlex. SS: suma de cuadrados, MS: cuadrado medio.

**Figura 11**

*Gráfico de pastel del porcentaje de varianza molecular incluyendo análisis de individuos*



*Nota.* El diagrama de pastel muestra gráficamente el resultado de los 3 porcentajes obtenidos en el análisis de AMOVA incluido el análisis por individuo.

Los estadísticos F presentaron valores positivos mayores a 0. El coeficiente de fijación ( $F_{ST}$ ) muestra un mínimo de 0.018 y un máximo de 0.127. El rango de este coeficiente debe estar entre 0 y 1, y los valores obtenidos sobrepasan el 0 pero no llegan a 1, indicando que no se tiene el mismo alelo en todas las subpoblaciones. El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) presenta un valor mínimo de 0.610, y un máximo de 1, confirmando el déficit de heterocigotos en los individuos. El índice de fijación ( $F_{IT}$ ) presenta los valores más altos casi llegando a 1, indicando la presencia de dos alelos idénticos en el mismo individuo (Tabla 21).

**Tabla 21**

*Estadísticos estimados de F-Wright para cada SSR*

SSR	$F_{ST}$	$F_{IS}$	$F_{IT}$
<b>BorA2</b>	0.032	0.809	0.815
<b>BorB4</b>	0.018	0.916	0.917
<b>BorB10</b>	0.047	0.770	0.781

SSR	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	F <sub>IT</sub>
<b>BorB12</b>	0.035	0.919	0.922
<b>BorC12</b>	0.024	0.725	0.732
<b>BorF1</b>	0.050	0.944	0.946
<b>BorF9</b>	0.057	1.000	1.000
<b>BorG4</b>	0.127	0.610	0.659
<b>Media</b>	0.053	0.820	0.829

*Nota.* La tabla muestra los resultados obtenidos de los estadísticos F-Wright para saber si existe panmixia o subdivisiones extremas en la población con F<sub>ST</sub>: coeficiente de fijación; si existe heterocigosidad con valores negativos (-1) o falta de estos con valores positivos (1) con F<sub>IS</sub>: coeficiente de endogamia; y la probabilidad de que un individuo presente dos alelos idénticos con F<sub>IT</sub>: índice de fijación.

Posteriormente, la ejecución del análisis de coordenadas principales (PCoA) a partir de la distancia genética calculada con GenAlex, nos permitió observar las similitudes y diferencias en el grupo de poblaciones mediante un gráfico de dispersión (Figura 12). Este análisis corrobora los resultados obtenidos en STRUCTURE y el dendrograma, ya que se observa las distancias y similitudes entre los individuos de ambas poblaciones.

## Figura 12

*Gráfico de dispersión de coordenadas principales (PCoA) para dos poblaciones de **Bixa orellana L.***



lo tanto, esencial llevar a cabo un estudio exhaustivo a nivel molecular de esta planta. Esto permitiría no solo explorar la diversidad que presenta en el país, sino también fomentar su conservación y potenciar su aprovechamiento comercial.

La caracterización molecular es una técnica que sirve de ayuda para tener una mejor gestión de los bancos de germoplasma, evitando la presencia de individuos duplicados, o de una inadecuada agrupación de los individuos en las accesiones. El achiote es una planta que cuenta con una amplia colección en la EETP, ya que está conformado por 191 accesiones vivas, sin embargo, su diferencia morfológica brinda mejores resultados cuando los árboles presentan fruto, ya que sin éstos existe similitud entre los mismos. Este estudio a nivel molecular permitirá distinguir qué tan diferentes genéticamente son los individuos de la colección de achiote, obteniendo una idea de si las accesiones están conformadas correctamente ya que es un banco de germoplasma realizado a partir de semillas.

La incorporación del lavado con buffer de sorbitol durante el proceso de extracción de ADN demostró ser altamente beneficioso debido a la naturaleza osmóticamente activa de este alcohol de azúcar. Este enfoque resultó eficaz en la eliminación de compuestos como polifenoles y polisacáridos presentes en las hojas de la planta, lo cual repercutió positivamente en la pureza del ADN extraído, tal como lo señala Jones, (2020).

Así mismo, la combinación de etanol con acetato de amonio resultó ser un buffer de lavado de alto rendimiento. Esto se debe a que el ADN es insoluble en alcohol, y al mismo tiempo, el acetato de amonio desempeña un rol esencial al precipitar las proteínas que se hallan asociadas al ADN (Tuya et al., 2016). Estos dos pasos estratégicos se revelaron cruciales para lograr la obtención de ADN de calidad sobresaliente, permitiendo llevar a cabo el genotipado sin complicaciones y asegurando la obtención de resultados fiables.

El proceso de genotipaje utilizando los 9 marcadores moleculares arrojó un total de 44 alelos identificados, con un rango de 3 a 7 alelos por locus. En detalle, los alelos detectados en cada SSR fueron de 5 para BorA2, 5 para BorB4, 5 para BorB10, 4 para BorB12, 4 para BorC12, 6 para BorF1, 3 para BorF9, 7 para BorG4, y 5 para BorG3. En un estudio similar, Dequigiovanni et al., (2014) analizaron 50 accesiones en un banco de germoplasma de *B. orellana* L. en Brasil, empleando estos mismos SSR, y encontraron un total de 30 alelos, con una variación de 3 a 6 alelos por locus. Los alelos registrados en su estudio fueron 3 para BorA2, 3 para BorB4, 6 para BorB10, 5 para BorB12, 3 para BorC12, 4 para BorF1, 4 para BorG4 y 2 para BorG3, mientras que BorF9 presentó homogeneidad genética.

En otra investigación llevada a cabo por (Dequigiovani et al., (2017), que se centró en un banco de germoplasma en Brasil con 63 accesiones, se utilizaron exclusivamente los marcadores BorA2, BorB4, BorB10, BorB12, BorC12, BorF9 y BorG4. Los resultados de este estudio revelaron la presencia de un total de 36 alelos, distribuidos en cantidades de 3, 3, 10, 4, 3, 8 y 5 alelos para los marcadores mencionados respectivamente. De acuerdo con Vieira et al., (2016), "los marcadores SSR resultan de la adición o eliminación de unidades, pares o motivos completos, lo que contribuye a que varíen entre los individuos. Además, las mutaciones que no son corregidas por el sistema de reparación genética tienen tendencia a originar nuevos alelos en los loci, lo que explica la diversidad de alelos presentes en un locus SSR". En consecuencia, la utilización de estos marcadores resultó altamente beneficiosa, ya que proporcionaron información crucial acerca de la composición genética (cantidad de alelos encontrados) de los 371 individuos, evaluados en 9 loci distintos.

Entre los diversos marcadores empleados, el análisis de diversidad genética utilizando programas bioinformáticos reveló que BorG4 ostentó el mayor número de alelos observados, con  $He=0.75$  y  $PIC=0.7127$ , seguido por BorB4 con 5 alelos,  $He=0.6438$  y  $PIC=0.5825$ , y finalmente BorF1 con 6 alelos,  $He=0.5594$  y  $PIC=0.5147$ . Sin embargo, es relevante mencionar

que los valores de  $H_o$  para todos estos marcadores fueron relativamente bajos (0.2764, 0.0539, 0.0390 respectivamente). En un estudio similar, Dequigiovanni et al. (2014) obtuvieron para estos mismos marcadores los siguientes valores:  $H_e=0.519$  y  $H_o=0.479$  para BorG4,  $H_e=0.422$  y  $H_o=0.182$  para BorB4, y  $H_e=0.674$  y  $H_o=0.440$  para BorF1, aunque el valor de PIC no fue calculado. En otro estudio, Dequigiovanni et al. (2017) reportaron valores para BorG4 de  $H_e=0.32$ ,  $H_o=0.16$  y  $PIC=0.29$ , y para BorB4 de  $H_e=0.51$ ,  $H_o=0.17$  y  $PIC=0.39$ .

En resumen, los resultados indican que, en este estudio, los valores de  $H_e$  para BorG4 y BorB4 fueron superiores a los obtenidos en los dos estudios de Dequigiovanni et al., mientras que para BorF1 fue menor. En términos de  $H_o$ , se observó una menor  $H_o$  para BorG4 en comparación con el estudio de Dequigiovanni de 2014, pero mayor que el de 2017. Para BorB4 y BorF1, las  $H_o$  fueron menores en comparación con ambos estudios de Dequigiovanni et al. Además, en relación con el PIC, los valores para BorG4 y BorB4 fueron mayores que los obtenidos en el estudio de Dequigiovanni de 2017.

Conforme a lo expuesto por Serrote et al., (2020), "el cálculo de la heterocigosidad de un marcador adquiere importancia al determinar la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto en dicho marcador. Este cálculo se basa en el número de alelos y su frecuencia en la población, abarcando un espectro desde cero, que denota ausencia de heterocigosidad, hasta uno, que indica una alta cantidad de alelos con igual proporción". Los resultados obtenidos en el presente estudio reflejan que los valores de heterocigosidad se sitúan ligeramente por encima de 0, y en todos los casos, la  $H_e$  supera a la  $H_o$ . Una observación similar la presentó Dequigiovanni et al. (2017), cuyos resultados paralelos se vinculan con un fenómeno común en el análisis de bancos de germoplasma. En tales contextos, diversas poblaciones son fusionadas en un solo grupo de estudio, lo cual puede generar un efecto conocido como efecto Wahlund. Esta noción se refiere a la presencia de un exceso de

homocigotos y una disminución de heterocigotos en una muestra amplia de individuos, a causa de la subdivisión de la población en estudio (Garnier-Géré & Chikhi, 2013).

El efecto Wahlund se origina como consecuencia de una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, caracterizada por la disminución de la heterocigosis y un exceso de homocigosis. De acuerdo con Lachance, (2016), este fenómeno puede ser atribuido a diversas causas. Entre ellas, se destaca la consanguinidad y el apareamiento positivo, donde los individuos muestran preferencia por aparearse con aquellos que poseen similitudes fenotípicas y genotípicas aumentando la endogamia. Así mismo, cuando las muestras se obtienen de múltiples poblaciones en lugar de una sola población con apareamiento aleatorio, el apareamiento no aleatorio y la estructura poblacional pueden afectar a nivel genómico, manifestando sus efectos en múltiples loci.

En el contexto de un banco de germoplasma, es frecuente encontrar desviaciones en este equilibrio debido a diversas causas, siendo la domesticación de la planta una de las principales. Este proceso conlleva la reducción de la diversidad genética de la especie al seleccionar individuos con características óptimas y descartar aquellos que no son de utilidad. Esto da como resultado individuos con similitudes marcadas entre sí, como lo señala Chávez Pesqueira, (2017). Además, la domesticación lleva consigo alteraciones fenotípicas en los rasgos de interés, resultando en diferencias morfológicas, fisiológicas y genéticas entre las variedades cultivadas y silvestres. Esta adaptación a entornos específicos puede llevar a la pérdida de alelos raros presentes en distintas subpoblaciones, tal como discuten Eguiarte et al., (2018).

En el marco de este estudio, se ha constatado la existencia de alelos privados en cuatro marcadores moleculares. Los alelos privados se definen como variantes genéticas específicas y exclusivas de una determinada subpoblación. Estos alelos no se encuentran presentes en otras subpoblaciones de la misma especie y se relacionan principalmente con la adaptación

que dicha subpoblación ha desarrollado en respuesta a las condiciones ambientales específicas de su hábitat. La identificación de estos alelos privados reviste una gran relevancia, ya que a menudo son el producto del aislamiento y la limitada transferencia genética entre diversas poblaciones, condicionada por barreras geográficas (Slatkin, 1985).

Esta implicación cobra aún mayor relevancia al considerar los planteamientos de Szpiech & Rosenberg, (2011), quienes resaltan que estos alelos brindan indicios acerca de la diversidad adaptativa de las especies y, por ende, pueden contribuir de manera efectiva a la comprensión de la evolución y la ecología de las poblaciones. Tomando en cuenta las afirmaciones previas, se puede decir que, desde una perspectiva orientada hacia los ecotipos, estos alelos privados adquieren una significativa trascendencia, ya que pueden denotar la existencia de distintos ecotipos dentro de una misma especie. Gracias a que sugieren la capacidad de la planta para prosperar y adaptarse exitosamente a las condiciones específicas de dicho entorno.

Resulta crucial tomar en consideración los orígenes del material genético conservado y mantener colecciones separadas para distintas subpoblaciones o ecotipos, con el propósito de mitigar el efecto Wahlund presente en un banco de germoplasma y de conservar los alelos privados que presentan las diferentes subpoblaciones. En resumen, la comprensión de este fenómeno y sus implicaciones es fundamental para una gestión adecuada de los recursos genéticos y la conservación de la diversidad en las poblaciones de interés.

En contraste, los marcadores utilizados en este estudio exhibieron un rango de valor de PIC que osciló entre 0.4051, como valor mínimo, y el previamente mencionado máximo de 0.7127. El valor de Contenido de Información Polimórfica (PIC) representa un elemento valioso en el análisis de la diversidad genética, pues proporciona indicios sobre la presencia de variabilidad en individuos dentro de una población. Como indican Serrote et al., (2020), “los valores de marcadores co-dominantes deben situarse en una franja que se extiende desde 0

(monomórfico) hasta 1 (altamente informativo). En específico, valores superiores a 0.5 se consideran altamente informativos, aquellos entre 0.25 y 0.5 son moderadamente informativos, y valores por debajo de 0.25 se califican como poco informativos”.

Con base en esta categorización, seis de los nueve marcadores analizados se ubican en la categoría de moderadamente informativos, mientras que tres pertenecen a la categoría de altamente informativos. No obstante, a pesar de que el marcador BorG3 exhibió un PIC de 0.4677, su análisis individual reveló que solo el 66% de las 371 muestras presentaron información disponible, contabilizando únicamente 185 observaciones. Como resultado, este marcador no pudo ser considerado como informativo y quedó excluido de los análisis de diversidad y estructura genética. La decisión de descartarlo se fundamenta en que su baja capacidad de proporcionar información hubiera distorsionado los resultados de los análisis realizados.

Como ya se ha mencionado previamente, se obtuvo una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. Esta discrepancia es evidente a través del cálculo del equilibrio mediante la prueba de independencia del chi cuadrado. Dicho análisis exhibió una significativa elevación en su resultado, ya que los valores calculados del chi cuadrado superan el valor crítico (Figura 13). En otras palabras, esta estadística calculada desempeña la función de evaluar si la heterocigosidad observada concuerda con lo esperado (hipótesis nula). No obstante, debido a que este valor supera el umbral crítico, la diferencia entre lo observado y lo esperado es significativo, lo que indica un desajuste del equilibrio y resulta en el rechazo de la hipótesis nula (Simulations Popgen, n.d.).

### **Figura 13**

*Valores críticos de chi cuadrado a un nivel de significancia de 0.05*

TABLE 1. Critical values of $\chi^2$ at the 0.05 level of significance ( $\alpha$ )			
Degrees of freedom	$\alpha = 0.05$	Degrees of freedom	$\alpha = 0.05$
1	3.84	11	19.68
2	5.99	12	21.03
3	7.82	13	22.36
4	9.49	14	23.69
5	11.07	15	25.00
6	12.59	16	26.30
7	14.07	17	27.59
8	15.51	18	28.87
9	16.92	19	30.14
10	18.31	20	31.41

Source:  $\chi^2$  values from R. A. Fisher and F. Yates, 1938, *Statistical Tables for Biological, Agricultural, and Medical Research*. Longman Group Ltd., London.

Nota. La figura muestra los diferentes valores críticos de  $\chi^2$  según su grado de libertad a una significancia de 0.05. Figura recuperada de (Simulations Popgen, n.d.)

Esta desviación del equilibrio Hardy-Weinberg se encuentra respaldada por los valores obtenidos en las estadísticas F, los cuales en este estudio fueron  $F_{ST}=0.053$ ,  $F_{IS}=0.820$  y  $F_{IT}=0.829$ . Conforme lo planteado por De Meeûs, (2020), el efecto Wahlund incrementa  $F_{IS}$  mientras reduce  $F_{ST}$ , explicando así el valor cercano a 0 para  $F_{ST}$  y aproximado a 1 para  $F_{IS}$ . De manera análoga, dado que los valores de  $F_{ST}$  entre marcadores pasan del cero, se evidencia una ligera diferenciación genética, en concordancia con los resultados obtenidos por Dequigiovanni, et al., (2018b).

Todas las accesiones de achiote fueron cultivadas a partir de semillas recolectadas en diversas provincias de la región costera, incluyendo Manabí, Santo Domingo, Santa Elena, Los Ríos, Esmeraldas, Guayas y El Oro. El análisis de agrupamiento de las poblaciones realizado a través de la herramienta STRUCTURE permitió la identificación de dos grupos poblacionales, compuestos por 220 y 151 individuos respectivamente, lo cual se observa de manera gráfica en el dendrograma ejecutado a partir de las similitudes de los individuos.

Por otro lado, la construcción del árbol filogenético empleando el método del vecino más cercano (NJ) a partir de una matriz de disimilitud, permitió la agrupación de los individuos más similares y se evidenció su relación evolutiva. Sin embargo, es importante destacar que no todos los individuos de una misma accesión se agruparon en el mismo clado, aunque algunos sí compartieron al menos un nodo común. En vista de la ausencia de estudios previos sobre la diversidad genética de *Bixa orellana* L. en el país, no es posible confirmar si este patrón de agrupamiento se originó debido a la influencia de la ubicación geográfica en la cual fueron recolectadas las semillas.

Sin embargo, Dequigiovanni et al., (2018a) que ya ha trabajado con distintas muestras de *Bixa orellana* L. de Brasil, recalca que a pesar de que en diferentes estudios los individuos se agrupan según su ubicación geográfica, hay otras investigaciones en las que no se encuentra correlación entre las distancias geográficas y genéticas. Por lo que sería importante realizar más estudios que se enfoquen en identificar si en el caso de Ecuador, las plantas se agrupan según su localización geográfica utilizando otros individuos y no los del banco de germoplasma.

Se puede observar en el análisis de coordenadas principales (PCoA) la dispersión de dos poblaciones, similar a lo obtenido mediante el software STRUCTURE, las mismas que presentan características distintivas. Es evidente que la Población 1 (representada en verde) exhibe una mayor similitud genética interna, pues sus individuos se distribuyen de manera más compacta y cercana entre sí. Por otro lado, en la Población 2 (señalada en rojo), se observa una mayor dispersión de los individuos, lo que sugiere una mayor diversidad genética intrapoblacional. A pesar de estas diferencias, ambas poblaciones muestran una afinidad genética, ya que la distancia entre sus puntos no es considerablemente amplia.

No obstante, es de relevancia señalar que, de acuerdo con Jombart et al., (2010), "el análisis de PCoA presenta limitaciones en la exploración de la estructura genética de las

poblaciones, proporcionando más un resumen de la variabilidad general entre individuos que una visión clara de las diferencias interpoblacionales". A pesar de estas limitaciones, este enfoque pone de manifiesto la semejanza genética existente entre los individuos estudiados. En contraste con los hallazgos reportados por Dequigiovanni et al., (2018a; 2018b), quienes en su análisis de coordenadas principales lograron una dispersión coherente de sus tres y cuatro grupos genéticamente distintos. En este estudio, aunque se observan dos poblaciones, estas no presentan una delimitación consistente, ya que muestran cierta mezcla entre ellas.

El análisis AMOVA reveló que la mayor variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (95%), en contraste con la variación entre las poblaciones (5%). Este resultado se respalda con el análisis a nivel de individuos, que también destacó una mayor variabilidad genética entre individuos (78%) en comparación con la variación dentro de los individuos (17%) y entre las poblaciones (5%). Es importante destacar que una mayor cantidad de individuos dentro de una población contribuye a una mayor variación genética. Sin embargo, si se disminuye el número de individuos y se aumenta el número de poblaciones, la variación tiende a disminuir significativamente. Comparando los resultados de este estudio, con los reportados por Dequigiovanni et al., (2017; 2018a; 2018b) en sus tres publicaciones obtuvieron resultados similares en el análisis AMOVA, con una variación genética entre poblaciones del 11%, 21% y 29%, y del 89%, 79% y 68% dentro de las poblaciones.

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio indican que el banco de germoplasma de la EETP presenta una notoria variabilidad genética. Se identificaron un total de 44 alelos a partir de los 9 marcadores moleculares utilizados. Entre estos marcadores, tres se destacaron por su alta informatividad, manifestada mediante un PIC superior a 0.5. Sin embargo, el marcador SSR BorG3 fue excluido del análisis y estudio de estructura genética debido a su carencia de resultados informativos, basados en 185 observaciones de las 371 disponibles.

Es importante resaltar que se evidenció una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg, atribuida posiblemente al efecto Wahlund, que se manifiesta mediante un déficit de heterocigosidad. Este fenómeno se refleja en los valores de  $H_e$ , los cuales superan a los valores de  $H_o$  ( $0.5175 > 0.0824$ ). Se presume que esta deriva genética puede haber sido impulsada por el proceso de domesticación que ha experimentado la especie.

El análisis de estructura genética reveló la formación de dos poblaciones claramente diferenciadas. Este patrón de agrupación se confirmó mediante el uso de la herramienta informática STRUCTURE, el análisis de componentes principales (PCoA) y la representación en el dendrograma basado en las similitudes de los individuos, destacaron la distinción entre estas dos poblaciones. Por otro lado, el árbol filogenético ofreció una visión de las relaciones evolutivas entre los individuos, agrupándolos según sus ancestros comunes. Sin embargo, se observó que, de pocas accesiones, los dos individuos muestreados se agruparon de manera conjunta.

Cabe mencionar la detección de alelos privados en cuatro de los nueve SSR analizados. Estos alelos específicos y exclusivos de subpoblaciones son indicativos de la adaptación a condiciones ambientales particulares. La presencia de estos alelos resalta la importancia de ciertos individuos en términos genéticos, pues podrían ser portadores de características valiosas que aún no han sido afectadas por procesos de domesticación o aislamiento. Mientras que el análisis AMOVA puso de manifiesto una mayor variación genética dentro de las poblaciones (95%) que entre ellas (5%). Este hallazgo refuerza la noción de que una mayor cantidad de individuos dentro de una población contribuye a un incremento de la variación genética.

En conclusión, el estudio demuestra la significativa variabilidad genética en el banco de germoplasma de la EETP. Este análisis es fundamental para la identificación y conservación de individuos genéticamente importantes. Sin embargo, es necesario ampliar la investigación,

incluyendo comparaciones con especies silvestres y un enfoque tanto genético como fenotípico en *Bixa orellana* L., con el objetivo de potenciar su uso como cultivo comercial y garantizar su conservación a largo plazo.

### **Capítulo 5: Conclusiones**

- ✓ El genotipaje con los 9 marcadores moleculares SSR reveló un total de 44 alelos confirmando que todos son polimórficos, sin embargo, se evidenció un déficit de heterocigosidad obteniendo un valor promedio de  $H_e = 0.5175$ , y  $H_o = 0.0824$ .
- ✓ El valor de PIC para cada marcador indicó que tres SSR (BorB4, BorF1, BorG4) presentaban valores  $> 0.5$ , por lo que son altamente informativos. Por otro lado, BorF9 presentó el PIC más bajo, por lo que no es un SSR informativo. Además, se evidenció la presencia de alelos privados en cuatro SSR (BorA2, BorB4, BorB10 y BorB12).
- ✓ Se pudo realizar el agrupamiento de los individuos en un árbol filogenético mediante el método del vecino más cercano (NJ), obteniendo la agrupación de individuos similares. Pocos individuos de la misma accesión se agruparon en el mismo clado, y otros en el mismo nodo.
- ✓ El análisis de estructura genética agrupó a los individuos en dos poblaciones conformadas por 220 y 151 en la Población 1 y Población 2 respectivamente, que se evidenció en el dendrograma realizado con el método UPGMA.
- ✓ El análisis AMOVA identificó una mayor variación genética dentro de las poblaciones (95%) y entre individuos (78%). Se observó un desequilibrio de Hardy-Weinberg lo que se espera al analizar un banco de germoplasma ya que no se reproducen al azar.

### **Capítulo 6: Recomendaciones**

- ⇒ Actualmente existen técnicas de genotipado que utilizan una tecnología más exacta para identificar alelos, por lo tanto, se debería contribuir a esta investigación con la utilización de otro método que aporte con datos más puntuales.

- ⇒ Es importante la cantidad de marcadores moleculares con los que se realiza el genotipaje ya que nos permiten obtener una información más precisa sobre la diversidad que existe en la colección de achiote. Se podría completar el trabajo con la extracción de ADN de los individuos faltantes y con la adición de más marcadores.
- ⇒ Gracias a la información que se obtuvo en este trabajo sobre la diversidad existente en la colección de achiote que tiene la EETP INIAP, sería importante identificar los individuos de interés y conservarlos de mejor manera para evitar su pérdida total.

### Capítulo 7: Bibliografía

- Aguilar, M., Miño, G., & Morillo, E. (2010). Estandarización de las condiciones de genotipaje de microsatélites en papas nativas con la metodología M13-tailing para LI-COR 4300S. *Papas Nativas: Un Tesoro Por Explotar INIAP -Estación Experimental Santa Catalina*, 7.  
<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>
- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130.  
<https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>
- Artieda, D. (2010). *Estudio investigativo del achiote, cultivo, producción, usos y aplicación en la gastronomía* [Universidad Tecnológica Equinoccial UTE].  
[http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11516/1/40848\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11516/1/40848_1.pdf)
- Azofeifa, Á. (2006). Revisión Bibliográfica Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; Aplicaciones En Frutales Del Trópico 1. *Agronomía Meso Americana*, 17(2), 21.  
[http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v17n02\\_221.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221.pdf)
- Benítez, J., González, A., Malats, N., Osorio, A., Robledo, M., Rodríguez, S., & Urioste, M. (2020). *Glosario de genética - genotipaje*. Fundación Instituto Roche.  
<https://www.instituto-roche.es/recursos/glosario/genotipaje>

- Bhandari, H., Nishant, A., Srivastava, K., Singh, M., Shreya, & Hemantaranjan, A. (2017). Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants - An Overview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7(3), 279–286. <https://doi.org/10.15406/apar.2017.07.00255>
- Caruso, G., Broglia, V., & Pocovi, M. (2015). Diversidad genética. Importancia y aplicaciones en el mejoramiento vegetal Genetic diversity. Importance and applications in plant breeding. In *Nuestro entorno* (pp. 45–50). [http://ineah.unsa.edu.ar/userfiles/downloads/lhawet/vol4/Caruso\\_et\\_al\\_2015.pdf](http://ineah.unsa.edu.ar/userfiles/downloads/lhawet/vol4/Caruso_et_al_2015.pdf)
- CEPROBOL, C. de P. B., MREC, M. de relaciones exteriores y culto, & VRECE, V. de relaciones económicas y comercio exterior. (2004). *Sistema de información y asesoramiento en comercialización para productores agrícolas CEPROBOL - IICD Achiote*.
- Cerda-Granados, D., & Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*. *Encuentro*, 94, 82–92. <https://doi.org/10.5377/encuentro.v0i94.1089>
- Chávez Pesqueira, M. (2017). Síndromes de domesticación en plantas. *Desde El Herbario CICY*, 9, 79–83. [http://www.cicy.mx/sitios/desde\\_herbario/](http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/)
- Coronel Coronel, S. P. (2020). El achiote (*Bixa orellana*) como antimicrobiano y antioxidante natural para la industria cárnica. In *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/4589971>
- De Meeûs, T. (2020). *Revisiting FIS, FST, Wahlund effects and null alleles*. 33(0), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx106/4643171>
- Demey, J. R. (2008). *Diversidad Genética En Bancos De Germoplasma: Un Enfoque Biplot*. 226. [http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/19176/1/DES\\_Diversidad genetica en](http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/19176/1/DES_Diversidad%20genetica%20en)

bancos de Germoplasma.pdf

Dequigiovani, G., Ferreyra Ramos, S. L., Alves-Pereira, A., Fabri, E. G., Nogueira Carvalho, P. R., Gomes da Silva, M., Vilela Nogueira Abdo, M. T., Mello Martins, A. L., Clement, C. R., & Veasey, E. A. (2017). Genetic diversity and structure in a major Brazilian annatto (*Bixa orellana*) germplasm bank revealed by microsatellites and phytochemical compounds. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*(7), 1775–1788. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0535-z>

Dequigiovanni, G., Ramos, S. L. F., Zucchi, M. I., Bajay, M. M., Pinheiro, J. B., Fabri, E. G., Bressan, E. A., & Veasey, E. A. (2014). Isolation and characterization of microsatellite loci for *Bixa orellana*, an important source of natural dyes. *Genetics and Molecular Research*, *13*(4), 9097–9102. <https://doi.org/10.4238/2014.October.31.25>

Dequigiovanni, Gabriel, Ferreyra Ramos, S. L., Alves-Pereira, A., Gomes Fabri, E., Picanço-Rodrigues, D., Clement, C. R., Gepts, P., & Veasey, E. A. (2018a). Highly structured genetic diversity of *Bixa orellana* var. *urucurana*, the wild ancestor of annatto, in Brazilian Amazonia. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198593>

Dequigiovanni, Gabriel, Ferreyra Ramos, S. L., Gomes Lopes, M. T., Clement, C. R., Rodrigues, D. P., Fabri, E. G., Zucchi, M. I., & Veasey, E. A. (2018b). New microsatellite loci for annatto (*Bixa orellana*), a source of natural dyes from Brazilian Amazonia. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *18*(1), 116–122. <https://doi.org/10.1590/1984-70332018v18n1n18>

Diario La Hora. (2016, May 3). *La siembra del achiote – Diario La Hora*. La Hora. <https://www.lahora.com.ec/noticias/la-siembra-del-achiote/>

Diniz, F. M., Iyengar, A., da Costa Lima, P. S., Maclean, N., & Bentzen, P. (2007). Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for

high throughput genotyping. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 380–384.

<https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300014>

Domínguez, O., González, A., García, F., & Casas, A. (2019). La Biodiversidad En Michoacán. *CONABIO, III*, 5–15.

Doyle, J., & Doyle, J. (1991). CTAB Total DNA Isolation. *Molecular Techniques in Taxonomy*, 283–293. [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-83962-7\\_18](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-83962-7_18)

Eguiarte, L. E., Hernández-Rosales, H. S., Barrera-Redondo, J., Castellanos-Morales, G., Paredes-Torres, L. M., Sánchez-de la Vega, G., Ruiz-Mondragón, K. Y., Vázquez-Lobo, A., Montes-Hernández, S., Aguirre-Planter, E., Souza, V., & Lira, R. (2018). Domesticación, diversidad y recursos genéticos y genómicos de México: El caso de las calabazas. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 85.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.159>

El Diario Ecuador. (2017, July 14). *El achiote en todo su “boom”* | *El Diario Ecuador*. El Diario. [https://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/440072-el-achiote-en-todo-su-boom/?\\_\\_cf\\_chl\\_rt\\_tk=ZJUj.0JD8fHwveB.3BG57t5x7WRqCvxSLzu\\_GMQd\\_H0-1681152577-0-gaNycGzNCns](https://www.eldiario.ec/noticias-manabi-ecuador/440072-el-achiote-en-todo-su-boom/?__cf_chl_rt_tk=ZJUj.0JD8fHwveB.3BG57t5x7WRqCvxSLzu_GMQd_H0-1681152577-0-gaNycGzNCns)

El Productor. (2016, May 18). *Ecuador: Achiote en el valle del Jamboé*. Noticias Agropecuarias. <https://elproductor.com/2016/05/ecuador-achiote-en-el-valle-del-jamboe/>

Garnier-Géré, P., & Chikhi, L. (2013). Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlund Effect. *ELS*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0005446.pub3>

Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: Past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290–302.

<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>

- INIA, I. N. de I. A. (2009). *Accesiones promisorias, Banco de Germoplasma de la SUDIRGEB - INIA* (D. Velarde & L. Ríos (eds.)).
- ITIS, S. I. de I. T. (n.d.). *SIIT - Informe: Bixa orellana*. ITIS. Retrieved October 24, 2022, from [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=22251#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22251#null)
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, *11*(94), 1–15. <https://doi.org/http://www.biomedcentral.com/1471-2156/11/94>
- Jones, A. (2020, May 20). *Sorbitol washing complex homogenate for improved DNA extractions*. Protocols.io. <https://www.protocols.io/view/sorbitol-washing-complex-homogenate-for-improved-d-ewov1875pgr2/v1>
- Karlik, E., & Tombuloğlu, H. (2016). Molecular Markers and Their Applications. *Plant Omics: Trends and Applications*, 1–514. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8>
- Kordrostami, M., & Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants: Concepts and applications. *Genetics in the Third Millennium*, *13*(2), 4024–4031.
- Lachance, J. (2016). Hardy-Weinberg Equilibrium and Random Mating. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, *2*, 208–211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800049-6.00022-6>
- La Fabril. (2017, June 30). *Agricultores de Manabí optan por el achiote*. LAFABRIL. <https://www.lafabril.com.ec/agricultores-de-manabi-optan-por-el-achiote/responsabilidad-social/>
- Lim, T. K. (2012). *Bixa orellana*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants* (pp. 515–526). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7\\_69](https://doi.org/10.1007/978-90-481-8661-7_69)
- Liu, K., & Muse, S. V. (2005). PowerMaker: An integrated analysis environment for genetic

maker analysis. *Bioinformatics*, 21(9), 2128–2129.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>

López, S. E., Caicedo, M., Gil, A., López, A., & Pazos, A. E. (2018). Morphometry of fruit and seed of *Bixa orellana* L. “achiote.” *Sciéndo*, 21(2), 213–216.

<https://doi.org/10.17268/scienco.2018.022>

Lorenz, E., Frees, K., & Schwartz, D. (2001). M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods.

*BioTechniques*, 31(1), 24–28. <https://doi.org/10.2144/01311bm02>

Madan Mohan Malaviya Univ. of Technology Gorakhpur. (2020). *Biodiversity*.

MAG, M. de A. y G. (2020, September 24). *Comunidades de Sarayaku inician cultivo de achiote*. MAG Noticias. <https://www.agricultura.gob.ec/comunidades-de-sarayaku-inician-cultivo-de-achiote/>

Morillo, E., & Miño, G. (2011). Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de técnicas y procedimientos en INIAP. In *INIAP -Estación Experimental Santa Catalina*.

<http://181.112.143.123/bitstream/41000/2827/1/iniapsc322est.pdf>

Onysk, A., & Boczkowska, M. (2017). M13-Tailed Simple Sequence Repeat (SSR) Markers in Studies of Genetic Diversity and Population Structure of Common Oat Germplasm. *Oat: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1536, 159–168.

<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6682-0>

OTRI, O. de T. de R. de la I. (2018). *Caracterización genética de cultivos mediante genotipado por secuenciación y su aplicación en la mejora u obtención de nuevas variedades de plantas*. Universidad de Murcia. [https://www.um.es/web/otri/investigadores/oferta-tecnologica/ofertas-tecnologicas/-/asset\\_publisher/JKqdcmqJbZCh/content/id/13220077](https://www.um.es/web/otri/investigadores/oferta-tecnologica/ofertas-tecnologicas/-/asset_publisher/JKqdcmqJbZCh/content/id/13220077)

- Quishpe, M. (2022). Caracterización morfológica de 92 accesiones del cultivo de achiote (*Bixa orellana*) del banco de germoplasma del INIAP (EETP). In *Universidad técnica estatal de Quevedo*.
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L. J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J. A., de León-Sánchez, F. D., Pinzón-López, L. L., Godoy-Hernández, G., & Rivera-Cabrera, F. (2017). Achiote (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2579-7>
- Rimieri, P. (2017). La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal. *BAG. Journal of Basic and Applied Genetics*, 28(2), 7–13.  
[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-62332017000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1852-62332017000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332017000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es%0Ahttp://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1852-62332017000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Rivera-Madrid, R., Escobedo-GM, R. M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., & Harries, H. (2006). Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). *Scientia Horticulturae*, 109(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.03.011>
- Schulman, A. H. (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*, 158(3), 313–321. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9282-5>
- Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., Rabaiolli, S. M. dos S., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. *Gene*, 726, 144175. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175>
- Shahid-ul-Islam, Rather, L. J., & Mohammad, F. (2016). Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research*, 7(3), 499–514. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>

Simulations Popgen. (n.d.). *Hardy-weinberg equilibrium* (pp. 361–373).

[http://rcastilho.pt/EVO/ewExternalFiles/Simulations\\_PopGen\\_04\\_HWE.pdf](http://rcastilho.pt/EVO/ewExternalFiles/Simulations_PopGen_04_HWE.pdf)

Slatkin, M. (1985). Rare Alleles as Indicators of Gene Flow Author ( s ): Montgomery Slatkin

Reviewed work ( s ): Published by : Society for the Study of Evolution Stable URL :

<http://www.jstor.org/stable/2408516> . *Evolution*, 39(1), 53–65.

<http://www.jstor.org/stable/2408516>

Szpiech, Z., & Rosenberg, N. (2011). On the size distribution of private microsatellite alleles.

*Theor Popul Biol.*, 80(2), 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2011.03.006>

Tuya, F., Curbelo, L., & Montero, D. (2016). Extracción de ADN. *Curso Académico*.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. de F. (2016). Microsatellite markers: What they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312–328.

<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>

Vilar, D. D. A., Vilar, M. S. D. A., Moura, T. F. A. D. L. E., Raffin, F. N., Oliveira, M. R. De,

Franco, C. F. D. O., De Athayde-Filho, P. F., Diniz, M. D. F. F. M., & Barbosa-Filho, J. M.

(2014). Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa Orellana* L.:

A review. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/857292>

## Capítulo 8: Apéndices