

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MORFOAGRONÓMICA Y  
MOLECULAR DE LA COLECCIÓN DE CHIRIMOYA  
*Annona cherimola* Mill EN LA GRANJA EXPERIMENTAL  
TUMBACO INIAP - ECUADOR**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de: INGENIERO EN  
BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**RICARDO PATRICIO ANDRADE CALDERÓN**

**Sangolquí, 5 de febrero de 2009**

## **DEDICATORIA**

A la memoria del patriarca de la familia Calderón Figueroa, mi abuelo y héroe, Segundo Sergio Calderón Obando y la de mi entrañable amigo y hermano del alma, Andrés Roberto García Vintimilla, aunque la muerte los arrancó de mi lado, vivirán siempre como llama eterna en mi corazón.

**RICARDO**

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

A nivel mundial hoy en día se ha incrementado la demanda de nuevos productos agrícolas, incentivando el desarrollo de cultivos no tradicionales. Esta apertura de los mercados hacia los frutos “exóticos” así como el buen precio pagado por ellos, ha generado una situación ventajosa para países megadiversos como el Ecuador. En este país, la diversidad genética y las condiciones agroclimáticas óptimas otorgan la posibilidad de cultivar especies entre las que sobresalen la naranjilla, tomate de árbol, uvilla, babaco, mora, granadilla, pitahaya, mango, piña y la chirimoya (Martínez, 2002).

La chirimoya pese a su gran potencial en el mercado interno y externo, ha tenido poca acogida por parte los agricultores, debido a la falta de tecnología en el manejo de cultivo como la preparación del terreno, uso de fertilizantes, riego, aplicación de podas, presencia de plagas y enfermedades especialmente la mosca de la fruta (*Anastrepha spp.*), la falta de un manejo adecuado en la post cosecha, etc. Estos inconvenientes generan baja calidad de frutos en consecuencia, precios bajos, lo que evidencia la falta de interés del agronegocio local y causa un riesgo de pérdida de diversidad genética (Scheldeman, *et al.*, 2003).

La investigación científica en los frutos andinos se ha desarrollada en el transcurso de los últimos años por parte de instituciones y centros de investigación, quienes han visto la necesidad de ampliar el conocimiento y utilizar la información generada para el mejoramiento de estas especies.

## 1.2 Justificación

El estudio de la diversidad tanto morfoagronómica como molecular de la chirimoya, permitirá identificar materiales con características deseables (bajo índice de semilla, buen sabor, alto porcentaje de pulpa, baja acidez), de acuerdo a las necesidades del productor y el consumidor final. Para el premejoramiento es necesario conocer la variabilidad existente entre las variedades tradicionales que se logrará con la información obtenida a partir de los descriptores morfoagronómicos y los marcadores moleculares.

El uso específico de marcadores tipo microsatélites es ideal en genética de poblaciones para realizar un minucioso análisis de la diversidad genética de la colección actual del INIAP.

Scheldeman, Van Damme & Ureña (2002), analizaron 137 árboles de chirimoya en la provincia de Loja, basados en los descriptores de peso del fruto, porcentaje de semillas, número de semillas por 100 g de fruto, porcentaje de pulpa, solubles sólidos y tipo de epidermis.

En la parte molecular se realizaron trabajos previos con algunos marcadores moleculares por ejemplo, mediante isoenzimas (Ellstrand & Lee, 1987; Pascual *et al.*, 1993; Perfectti & Pascual 1998), RAPD's (Ronning *et al.*, 1995) y AFLP's (Rahman *et al.*, 1998).

En Ecuador, la Universidad Católica de Quito (PUCE) usó AFLP's, en el estudio de la base genética de variedades comerciales de chirimoya, trabajo realizado en conjunto con la Universidad Nacional de Loja (UNL), quienes a su vez, caracterizaron morfológicamente una colección de 600 accesiones entre material silvestre y cultivo

tradicional (Seminario Taller- “La biotecnología en el Ecuador: estado actual y perspectivas futuras”, 2006).

Por lo tanto, el DENAREF con el Programa de Fruticultura, ha propuesto esta investigación orientada a fortalecer programas de mejora genética que desarrollen nuevas variedades con características tales como resistencia a plagas y enfermedades, precocidad a la maduración, frutos con menor índice de semilla y características organolépticas de gran aceptación en el mercado.

Este estudio de diversidad genética local tendrá un impacto directo en los usuarios finales (fitomejoradores, promotores campesinos y agricultores conservacionistas), generando un aporte de información científica desde del punto de vista morfológico y molecular permitiendo identificar la variabilidad existente dentro de la colección de chirimoya del INIAP.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

- ❖ Estudiar la diversidad genética de la colección nacional de chirimoya del INIAP-Ecuador.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- ❖ Caracterizar morfoagronómicamente 97 entradas de chirimoya a fin de identificar materiales promisorios, morfotipos y caracteres cuantitativos y cualitativos de alto poder discriminante.

- ❖ Analizar molecularmente 97 entradas de chirimoya, mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites a fin de registrar la riqueza alélica de este germoplasma y determinar el nivel de heterocigosidad presente en el germoplasma en estudio.
  
- ❖ Determinar el nivel de heterocigosidad presente en la población en estudio.

## **1.4 Marco Teórico**

A continuación se detalla la revisión bibliográfica de la chirimoya, describiendo el origen y distribución, la taxonomía, los aspectos nutritivos y usos de este cultivo.

### **1.4.1 Origen y Distribución de la chirimoya**

*Annona* significa cosecha anual y cherimola o chirimoya viene del nombre quichua *chirimuya* que significa “semillas frías”. El nombre común de la chirimoya varía dependiendo de la región, en países anglosajones es chirimoya, en Perú se conoce como chirimoyo, en Venezuela se llama chirmorriñón y chirimoya en Bolivia, Colombia y Ecuador (Owens, 2003).

La chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) es un árbol tropical cuyo fruto, de forma acorazonada, es considerado un manjar entre los nativos pobladores de los Andes desde tiempos prehistóricos. Este frutal, tiene origen en los valles interandinos comprendidos desde el sur del Ecuador hasta el norte de Chile. Su mayor diversidad, se concentra en Ecuador y Perú, países en los que tanto las formas cultivadas como silvestres, se encuentran desde los 1.200 hasta los 2.000 msnm (Instituto Nacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), 2002). La ubicación del centro de origen se observa en la Figura 1.1.

### ZONA ORIGINARIA DEL CHIRIMOYO



**Figura 1.1** Esquema del centro de origen de la chirimoya (Guirado *et al.*, 2004).

Es uno de los llamados “cultivos perdidos de los Incas” provenientes de los Andes. Dicho fruto es conocido por la población en Latinoamérica y por un limitado grupo de consumidores fuera de la región (Van Damme & Scheldeman, 1999c). Fue domesticado en la antigüedad, y ya en los tiempos pre-colombinos tuvo lugar un movimiento de material vegetal hacia Centroamérica, el sur de México, y el norte de Sudamérica (Cherla, 2006).

Algunos cronólogos proponen a Centroamérica como el centro de origen, entre ellos Estrella (1988) quien dijo que es una fruta “nueva” en la región andina, pero Farré Massip *et al* (1995) asocia esta malinterpretación, a que los cronólogos han confundido a la chirimoya con otras *annonaceas* (*A. reticulata* o *A. squamosa*), que sí tienen origen en Centroamérica (Scheldeman *et al.*, 1999).

Aunque no existe acuerdo concreto respecto al centro de origen, no existe mucha duda, que en el sur de la provincia de Loja está ubicado el centro de diversidad de esta fruta andina (Scheldeman *et al.*, 1999), encontrándose un gran número de poblaciones o ecotipos, con una amplia diversidad genética, formando densos bosques silvestres y también, algunos huertos agrícolas (Morales *et al.*, 2006).

Históricamente, la chirimoya se introdujo en el Sur de España en 1757, de donde probablemente se llevó a Italia e Isla de Madeira (Portugal). En la actualidad, en la zona mediterránea se encuentra adaptado en Israel, Egipto, Grecia y Argelia (Rosell, 2001). Cabe resaltar que dicha propagación fue facilitada debido al contenido bajo de humedad de las semillas, que permite que el poder germinatorio se conserve por más de un año en condiciones ambientales (Proyecto de Aumento de la Productividad (PROFUT), 1997).

Su cultivo a escala comercial, se encuentra en zonas poco húmedas y libres de heladas en América Central y del Sur así como en India, Italia, Nueva Zelanda, España y los Estados Unidos (IPGRI, 2002).

En lo que respecta al Ecuador, en la Región Sierra, en las provincias de Pichincha, Imbabura y Loja, la producción de chirimoya para el año 2001 fue de 153 TM, en el 2002 incrementó en un 10% con una producción de 168 TM; elevándose de forma exuberante en el 2003 a 441 TM, lo que impulsó a los agricultores a invertir en este cultivo; llegando a producir en el 2006 un total de 1143 TM anuales (Agencia de Servicios Agropecuarios /Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2006).

#### **1.4.2 Clasificación Taxonómica de la chirimoya**

PROFUT (1997) y Dowes citado por Cholota y Quito (1999), coinciden en la siguiente clasificación taxonómica (Cuadro 1.1):

**Cuadro 1.1** Clasificación taxonómica de la chirimoya.

<b>Orden:</b>	Ranales
<b>Suborden:</b>	Magnolíneas
<b>Familia:</b>	Anonácea
<b>Género:</b>	Annona
<b>Especie:</b>	Annona cherimola Mill

Está integrada por especies diploides y cuenta con cerca de 2.300 especies de árboles, arbustos y lianas, con una amplia distribución a nivel mundial (Escribano *et al.*, 2004). Según Nakasone & Paull; George & Nissen; Koesriharti citados por Pinto *et al.*, (2005), el número de cromosomas reportado para la chirimoya es  $2n= 14$  a  $16$ .

### 1.4.3 Descripción Botánica de la chirimoya

El chirimoyo es un árbol de copa abierta que alcanza un promedio de ocho metros de altura. Es un árbol semicaduco, donde la caída de las hojas se debe a un efecto mecánico de las yemas, ya que estas están rodeadas por la base de las hojas y no pueden crecer hasta que éstas caen (Figura 1.2). En las zonas de invierno suave, el chirimoyo permanece siempre con hojas, del que no se desprenden las hojas viejas hasta la salida de los nuevos brotes (Universidad Católica Valparaíso, 1988).



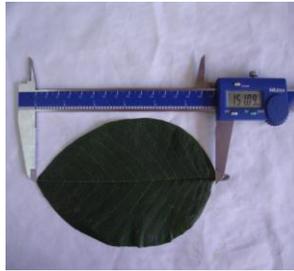
**Figura 1.2** Fotografía de un árbol de chirimoya conservado en la Estación Experimental Tumbaco 2348 msnm (Andrade, 2006).

#### ❖ Raíz

Posee un sistema radicular superficial y ramificado, originando dos o tres planos de raíces a diferentes niveles de poca profundidad (Moreno, 1987).

## ❖ Hojas

Son simples, enteras y lisas, de forma oval a elíptica, según el cultivar. Muy pubescentes por el envés y menos por el haz (Figura 1.3). Se caracterizan por ser alternas, miden de 10 a 20 cm de largo por 4 a 8 cm de ancho, de color verde oscuro en el haz de la hoja y verde claro en el envés (PROFUT, 1997).

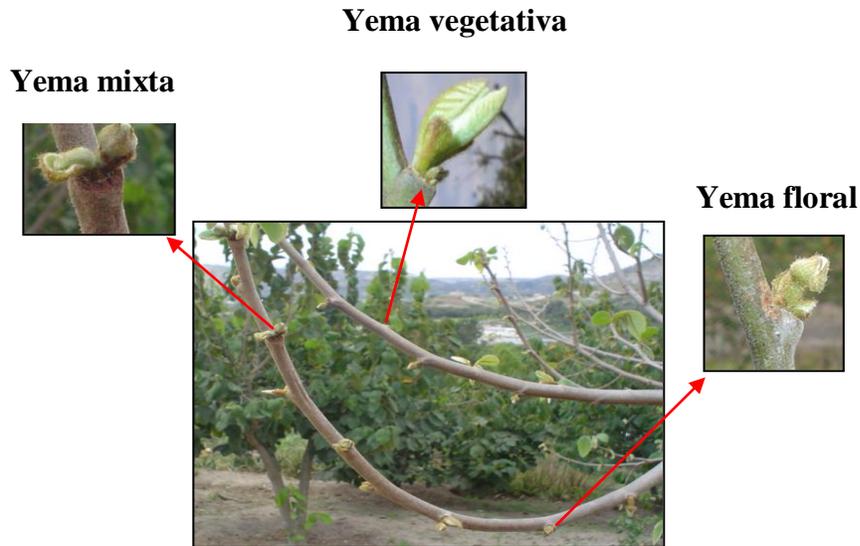


**Figura 1.3** Fotografía de una hoja de chirimoya tomada en el proceso de caracterización de germoplasma (Andrade, 2007).

El pecíolo de la hoja, es corto y hueco en la parte de inserción con el tallo; oculta y protege a las yemas que darán origen a la próxima brotación (Guirado *et al.*, 2004).

## ❖ Yemas

Son de tres tipos: a) formadores de ramas vegetativas; b) diferencian de una a tres flores y, c) diferencian una flor acompañada de un brote, formador de una nueva ramificación (Martín, 1983) como se aprecia en la Figura 1.4.



**Figura 1.4** Fotografías de los tres tipos de yemas presentes en la rama del árbol de chirimoya (León y Herrera, 2006).

#### ❖ Flor

Es hermafrodita, tiene los estambres y pistilos agrupados en una pirámide de tres caras. Rodeando la cara de la misma se encuentra la masa de estambres, los cuales son blancos durante el estado hembra y crema claro durante el estado macho (Soria, citado por Van Damme, 1999a).

Ambos órganos, femenino (carpelos) y masculino (estambres) se encuentran en la flor, sin embargo exhibe una marcada dicogamia protogínica. La protoginia se define como la maduración en una primera fase de los órganos femeninos de la flor y la maduración posterior de los órganos masculinos, manifestado con la pérdida de receptividad de los estigmas antes de que las anteras liberen polen, siendo un factor limitante de la autopolinización (George, citado por Scheldeman, 2002; Gonzáles *et al.*, 2007).

Desde que aparece al exterior la yema floral, la flor se desarrolla permaneciendo cerrada durante aproximadamente 30 días (PROFUT, 1997). La flor consta de tres sépalos triangulares de unos 5 mm de largo y dos series de pétalos insertos en un receptáculo ancho (Farré *et al.*, 1999).

Según Gardiazabal y Rosberg, citados por León y Herrera (2006), se puede diferenciar claramente los siguientes estados florales:

**Flor Cerrada:** Dura unos treinta días hasta el completo desarrollo de la flor (fase inicial) (Figura 1.5).



**Figura 1.5** Fotografía de una flor completamente desarrollada y con sus pétalos cerrados (Cautín y Agustí, 2005).

**Estado Pre-hembra:** Flor cerrada por su base, pero la punta de sus sépalos está abierta. Las partes sexuales están protegidas. Normalmente dura menos de un día dependiendo de la temperatura ambiental, mientras más elevada sea, más rápido se produce el cambio (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Fotografía de una flor en estado pre-hembra (Cautín y Agustí, 2005).

**Estado Hembra:** Flor abierta, pero los estambres y pistilos están protegidos por los pétalos aún cerrados en su base, pudiendo verse solo la parte superior del cono estigmático. Los estambres son blancos y al final del estado se encuentran formando una base perfectamente unida y el estigma comenzando a liberar el polen (Figura 1.7).



**Figura 1.7** Fotografía de una flor en estado hembra (Cautín y Agustí, 2005).

**Flor Macho:** Flor totalmente abierta; con las anteras soltando el polen, los estambres se separan entre sí, adquiriendo un color marrón (Figura 1.8).



**Figura 1.8** Fotografía de una flor en estado macho (Cautín y Agustí, 2005).

#### ❖ Fruto

Es una inflorescencia de color verde oscuro que al madurar se torna de un color verde claro. Está formado, por la unión de los pistilos con el receptáculo, del tipo sincarpio. Cuando el óvulo no llega a ser fecundado, el carpelo correspondiente no se desarrolla, produciendo deformación en el fruto (Corporación de Fomento de la Producción, 1989).

El fruto es cónico o en forma de corazón, alcanza entre 10 y 25 cm de longitud y hasta un máximo de 15 cm de anchura y pesa por término medio de 250 a 800 g. Cuando alcanza la madurez se torna de un color verde pálido o cremoso; se considera que está demasiado maduro cuando la piel adquiere un tono marrón oscuro o negro. La piel, delgada o gruesa, puede ser suave, con marcas que se asemejan a huellas dactilares, o cubierta de protuberancias cónica o redondeada, que quedan de las flores (Van Damme & Scheldeman, 1999b) como se observa en la Figura 1.9.



**Figura 1.9** Fotografía de un fruto de chirimoya cosechado en la Granja Experimental Tumbaco, 2348 msnm, en el mes de junio del 2008 (Andrade, 2008).

#### ❖ Semillas

Son aplanada, elíptica, de color castaño claro a negro (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, 2003) como se observa en la Figura 1.10.



**Figura 1.10** Fotografía de semillas de chirimoya extraídas en la caracterización de fruto (Andrade, 2007).

## ❖ Propagación

La propagación aplicada a la chirimoya, puede ser de forma sexual (propagación por semilla) o asexual (propagación vegetativa). Para la propagación sexual, las semillas deben ser obtenidas de plantas madres selectas, cuyas características deben incluir una alta producción de frutos, una excelente calidad de la fruta y una alta tolerancia a plagas y enfermedades (Pinto *et al.*, 2005); por esto, la propagación vegetal, es una alternativa más eficiente, siendo la injertación, una herramienta adecuada para el manejo de la chirimoya.

Los tipos de injertos que se practican según experiencias del INIAP son de enchape y hendidura, ya que tienen mayor prendimiento, debido a que las ramillas contienen una suficiente cantidad de reservas hasta que se logre la soldadura del injerto (León y Herrera, 2006), siendo el método más recomendable, porque se garantizan plantas con la misma identidad genética, con mejor producción y calidad de frutos, además se facilita el manejo de la plantación (Cruz, 2002).

### **1.4.4 Valores nutritivos y usos de la chirimoya**

La chirimoya es una fruta dulce, debido a su alto contenido de azúcares y bajo en ácidos. Posee calcio y fósforo en cantidades moderadas, contiene vitamina A, también es rica fuente de tiamina, riboflavina y niacina. Dicho contenido vitamínico, forma un complejo de gran valor antirraquítico que fortalece el sistema óseo por fijación de calcio. Es poderoso antiescorbútico y generador de energía (Cholota y Quito, 1999).

La chirimoya tiene el siguiente contenido nutricional por un gramo de fruta:

**Cuadro 1. 2** Composición nutricional de la chirimoya.

Componentes	Cantidad (unidades)
Calorías	0.94 cal
Carbohidratos	0.18 g
Grasas	0.001 g
Proteínas	0.013 g
Fibra	0.020 g
Calcio	0.32 mg
Hierro	0.05 mg
Tiamina	0.001 mg
Riboflavina	0.001 mg
Niacina	0.009 mg
Acido Ascórbico	0.09 mg
Beta-caroteno	0.18 mg

**Nota:** los análisis varían dependiendo del estado de la maduración y variedad

Fuente: University of California, 2006

En hojas, tallos, corteza y semillas se han detectado compuestos citotóxicos y alcaloides con uso farmacéutico y antimicrobial; además de sus valiosas propiedades insecticidas (Morton, 1987; Simeon *et al.*, 1990; Cortes *et al.*, 1993, citados por Nava-Díaz, 2000).

#### **1.4.5 Caracterización de germoplasma de chirimoya**

La caracterización de germoplasma de chirimoya, es un factor estratégico en la investigación ya que es un componente de peso decisivo en la solución de los problemas actuales y futuros relacionados con el desarrollo de nuevas alternativas dirigidas a la obtención de variedades vegetales. Esto puede realizarse, mediante la utilización de métodos tradicionales (caracterización morfológica) o moleculares (IPGRI, 1995; Karp, *et al.*, 1997).

#### **1.4.6 Caracterización Morfoagronómica**

De acuerdo a Taba (1991) la caracterización morfoagronómica se realiza en una población representativa mediante descriptores que son los caracteres o atributos referentes a la forma, estructura o comportamiento de un individuo dentro de la población en estudio.

Estas medidas tienen la ventaja de que son fácilmente realizables, no requieren de un equipo sofisticado y son la apreciación más directa de un fenotipo; por consiguiente, están al alcance para uso inmediato, lo que es un atributo importante. Sin embargo, las determinaciones morfológicas deben ser tomadas por un experto en la especie, están sujetas a cambios debidos a factores ambientales, pueden variar en las diferentes etapas del desarrollo de las plantas, y su número es limitado (IPGRI, 2003a). Con frecuencia, estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando ésta llega a su estado adulto (Azofeifa, 2006).

La sistematización en la caracterización y documentación, es prerequisite para que la información del germoplasma sea usada de forma directa o como material básico, en la generación de variedades superiores (Sevilla y Holle, 2004).

Este tipo de caracteres han sido usados para la identificación de especies, familias, de tal forma que la mayoría de las plantas cultivadas tienen sus patrones de identificación, caracterización y evaluación. Los cuales son dominantes o recesivos, siendo los más útiles para la descripción morfológica aquellos menos influenciados por el ambiente, como son la flor y el fruto; le siguen en importancia las hojas, ramas, raíces, y tejidos celulares (Enríquez, 1991).

Por otra parte, los métodos morfológicos son útiles para estimar niveles de variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas de un cultivar de tal manera que se puedan definir caracteres discriminantes de la especie en estudio, los mismos que pueden ser utilizados para posteriores procesos de caracterización y evaluación (Wolf, 1998).

#### **1.4.7 Caracterización Molecular**

Los marcadores moleculares, son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Son sectores de ADN que pueden ser identificados y localizados en un sitio de ADN con mucha precisión (Sevilla y Holle, 2004). El estudio de los marcadores moleculares, está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva (Azofeifa, 2006).

Entre las ventajas de los marcadores moleculares está la de ser técnicas precisas y objetivas de identificar genotipos y marcar genes o regiones del cromosoma que están relacionados con rasgos genéticos como resistencia a enfermedades, color del fruto, etc. No son afectados por el ambiente, ya que aunque las plantas estén sujetas a condiciones extremas y variadas, la información genética no cambia y es constante en cualquier parte de la planta y en cualquier estado de desarrollo. Además el número de marcadores moleculares es ilimitado (Mendoza – Herrera y Simpson, 1996).

Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (cuando un gen enmascara o suprime la expresión de otro) (Tanksley; Powell; Phillips; Rallo, citados por Azofeifa, 2006).

Según IPGRI (2003b), para obtener marcadores de ADN se usan diferentes métodos que pueden agruparse en tres categorías:

1. La primera categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la Reacción de la Polimerización en Cadena o PCR con cebadores arbitrarios que abarca a los RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), DAF (*DNA amplification fingerprinting*) y AP-PCR (*Arbitrarily primed polymerase chain reaction*).
2. La segunda categoría pertenece a la técnica de AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphic*), que es una combinación de las tecnologías de RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphic*) y PCR
3. La tercera categoría agrupa las metodologías de la PCR de sitios de secuencia etiquetada. A diferencia de la PCR con cebadores arbitrarios, el diseño de los cebadores para detectar sitios de secuencia etiquetada (STS), está basado en cierto conocimiento de las secuencias. Estos cebadores son únicos y específicos de las secuencias y detectan variación en el ADN genómico alélico. Los STS tienen una ventaja especial sobre los RAPD por ser codominantes, o sea, pueden distinguir entre los homocigotos y heterocigotos. Tienden también a ser más reproducibles, porque las secuencias de los cebadores son más largas. Dentro de la cual se encuentran los SCAR (*Sequence-characterised amplified region*), CAPS (*Cleaved amplified polymorphic sequence*), ISSR (*Inter-simple sequence repeat*) y SSR (*Simple Sequence Repeats*).

### **1.4.7.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La "Reacción en Cadena de la Polimerasa" por sus siglas en inglés (PCR, "*Polymerase Chain Reaction*") es una técnica, que comprende la síntesis *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de ADN polimerasa. Un ciclo de PCR consta de tres etapas: Denaturación, Anillamiento o Pareamiento y Elongación o Polimerización (Ferreira y Grattapaglia, 1998):

#### **A) Denaturación**

Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Por ello, el ADN de doble cadena es desnaturizado mediante el aumento de temperatura que varía entre 92 y 95°C, que produce la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto, la separación de ambas cadenas.

#### **B) Anillamiento o Pareamiento**

Una vez que el ADN está desnaturizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre 35 y 60 °C, para que se pueda producir la unión de los *primers* a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.

#### **C) Elongación o Polimerización**

La temperatura es elevada a 72° C para que la enzima ADN polimerasa (Taq), realice la extensión de la cadena a partir de cada terminal de los *primers* mediante la incorporación de nucleótidos, utilizando como molde la "secuencia-blanco", de manera que una copia de esta secuencia es producida en el proceso.

Mediante ciclos repetidos de síntesis (enfriamiento) y fusión (calentamiento), se amplifica rápidamente la secuencia buscada. En cada ronda se duplica la cantidad de copias

de la secuencia entre los sitios del iniciador; en consecuencia, la cantidad de la secuencia buscada aumenta de forma exponencial (Lodish *et al.*, 2002).

#### **1.4.7.2 Microsatélites**

A inicios de la década de los 80, se demostró que los genomas eucariotes están poblados por distintas clases de secuencias repetidas. Los SSR (*Simple Sequence Repeats*) o microsatélites, son pequeñas secuencias de uno a cuatro nucleótidos adyacentes repetidas lado a lado, que se encuentran arbitrariamente distribuidas en los genomas eucariotes (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Este tipo de secuencias varía entre animales y vegetales. Por ejemplo en los mamíferos las secuencias más comunes son (GT)<sub>n</sub> y (CA)<sub>n</sub>, donde representa el número de veces que se repite la secuencia. En plantas, las secuencias más comunes son (AA)<sub>n</sub> y (AT)<sub>n</sub> (Dobrowolski, 2002).

Los microsatélites pueden ser amplificados individualmente vía PCR, utilizando un par de "*primers*" especialmente diseñados (de 20-30 bases), complementarios a las secuencias únicas que limitan (flanquean) los microsatélites. La base molecular de polimorfismo radica en la diferencia del número de unidades repetitivas en los diferentes loci de microsatélites. Cada segmento de tamaño diferente (amplificado generalmente desde varias decenas hasta centenas de pares de bases) representa un alelo diferente de un locus (Dobrowolski, 2002).

El desarrollo de marcadores SSR, es muy laborioso debido a que se debe identificar y secuenciar, regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo (Azofeifa, 2006).

Los microsatélites amplificados vía PCR ofrecen ventajas como: (Roca y Ramírez, 1999; Creste *et al.*, 2001)

- Alto polimorfismo y por consiguiente son altamente informativos;
- Son codominantes que permite diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos;
- Disponibilidad de una colección de diferentes microsatélites, algunos de los cuales ocurren en alto número de copias;
- Están dispersos a través del genoma;
- La técnica puede ser automatizada.

Los microsatélites por su alto contenido polimórfico, han sido importantes en la construcción de mapas genéticos en vertebrados y mapas de ligamiento en algunos cromosomas humanos. Tanto la simple aplicación de la tecnología, así como la cantidad y calidad de la información que generan, los han convertido, en una de las técnicas más poderosas para la identificación de individuos, análisis de parentesco y genética de poblaciones (Jordano, 2000).

Las limitaciones de estos marcadores son: la demanda de trabajo en el desarrollo de los marcadores, la necesidad de personal capacitado para el manejo de la técnica, además el equipamiento es costoso y sofisticado (Morales, 2003).

Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en estudios de poblaciones, caracterización de germoplasma y estudios de variabilidad intra e interespecífica en genomas de cloroplasto (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2000).

Se ha desarrollado *sets* de microsatélites en la genotipificación de individuos, en evaluaciones de germoplasma, como herramienta para estudios de diversidad genética, en cartografía de genomas, estudios filogenéticos, e inclusive en estudios evolutivos (IPGRI, 2003b).

Un reporte de la Corporación de Investigación y Desarrollo para las Industrias Rurales, muestra la aplicación de marcadores moleculares (SSR), para el mejoramiento del arroz australiano, de características de interés como: fragancia, resistencia a enfermedades, vigor de la semilla, temperatura de gelificación, entre otras (Christopher *et al.*, 2004).

Las universidades de Estados Unidos y China, realizaron la identificación de microsatélites en el genoma de cultivares de maní y así como, la detección de polimorfismos en una colección de accesiones de maní con diversidad de origen (He *et al.*, 2003).

El CIAT, en su informe anual del año 2002, desarrolló algunos proyectos, en los cuales los microsatélites fueron de gran apoyo por ejemplo el “fingerprinting” (huella digital) genética de genotipos de fréjol común para determinar el origen de la de la variedad patentada “Enola” y también en la investigación de la diferencia de biotipos en accesiones de arroz rojo colectados en Tolima y Huila – Colombia (CIAT, 2003).

En la Estación Experimental La Mayora - España, se trabajó en el desarrollo, caracterización y análisis de variabilidad de Lichi (*Litchi chinensis*), un árbol nativo del sur de China (Viruel & Hormaza, 2003).

La universidad de Bologna – Italia, desarrolló estrategias de selección por marcadores, en el cultivo de manzanas y peras. Diferentes análisis de ADN han sido utilizados para identificar marcadores ligados a rasgo monogénicos y multigénicos (Tartarini, 2003).

Kikuchi & Isasi (2002), ensayaron cuatro microsátélites loci en 19 poblaciones de *Magnolia sieboldii spp Japonica*, para encontrar la variación genética de este raro arbusto de hoja caduca, que aunque no está en peligro de extinción, sufre cierto grado de amenaza. Los resultados mostraron el potencial hipervariable de los microsátélites loci, en la evaluación de los efectos de desvío genético y el aislamiento de poblaciones dentro de las regiones, pese a la baja variabilidad genética en esta planta.

El Departamento de célula y Genética Molecular de Inglaterra, usó ocho pares de microsátélites para investigar el nivel de diversidad genética y la estructura genética de población del coco (*Cocos nucifera* L.), en un total de 130 individuos (Perera *et al.*, 1999).

#### **1.4.8 Relación entre la caracterización morfoagronómica y molecular**

Karp (1997), citado por Pagano, Rosso, Rimieri y Ríos (2007), señala que la caracterización molecular extiende y complementa la caracterización basada en descriptores morfoagronómicos brindando una información precisa y más detallada que la fenotípica.

De acuerdo a Philip *et al.*, (1995) citados por Peña (2003), con el desarrollo de descriptores morfoagronómicos y los métodos biotecnológicos (marcadores de ADN), ha sido posible, el inicio de estudios de colecciones de germoplasma de forma eficaz, sistemática y rápida, planteando objetivos que desde el punto de vista del mejoramiento genético de plantas, son fácilmente realizables.

## **1.5 Sistema de hipótesis**

Ha. Las entradas de la colección nacional de chirimoya del INIAP presentan variabilidad genética.

Ho. Las entradas de la colección nacional de chirimoya del INIAP no presentan variabilidad genética.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Participantes

La presente investigación fue desarrollada en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por medio el Departamento de Recursos Fitogenéticos (DENAREF) y el Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) en la Granja Experimental Tumbaco.

#### 2.2 Caracterización Morfoagronómica

Se evaluaron 126 árboles que conforman la colección de chirimoya donde se tomaron datos de hojas, flores y frutos de cada una de las accesiones.

##### 2.2.1 Zona de Estudio

La colección de chirimoya del INIAP está ubicada en la Granja Experimental Tumbaco, a continuación se detalla la ubicación geográfica y condiciones agroclimáticas.

##### 2.2.2 Ubicación geográfica

- |                      |                  |
|----------------------|------------------|
| 1) <b>Provincia:</b> | 7) Pichincha     |
| 2) <b>Cantón:</b>    | 8) Quito         |
| 3) <b>Parroquia:</b> | 9) Tumbaco       |
| 4) <b>Altitud:</b>   | 10) 2348 msnm    |
| 5) <b>Longitud:</b>  | 11) 78° 24 Oeste |
| 6) <b>Latitud:</b>   | 12) 0° 13 Sur    |

##### 2.2.3 Condiciones agroclimáticas

<b>13) Temperatura promedio anual:</b>	17) 17,2° C*
<b>14) Precipitación promedio anual:</b>	18) 800 mm
<b>15) Humedad relativa promedio:</b>	19) 75,23%
<b>16) Zona Ecológica:</b>	<b>20) Bosque Seco Montano Bajo</b> (bsMb)

#### **2.2.4 Tratamientos**

El germoplasma está integrado por 27 ecotipos de Ecuador (los lugares de origen de los ecotipos ecuatorianos se precisa en el Anexo A), seis de Estados Unidos, cuatro de España, tres de Chile, una de Perú y Costa Rica, respectivamente. La lista de ecotipos se precisa en el Anexo B.

#### **2.2.5 Unidad Experimental**

De acuerdo al Ing. Juan León, técnico de la Granja Experimental Tumbaco (comunicación personal, Febrero 2, 2007), el lote de chirimoya tiene 25 años de establecido. El área neta del ensayo es de 3200 m<sup>2</sup>. Los árboles se encuentran plantados a una distancia de plantación de cinco por cuatro metros. El mapa de campo de las accesiones está precisado en el Anexo C.

#### **2.2.6 Descriptores cualitativos y cuantitativos**

Los descriptores morfoagronómicos empleados en este estudio, son los propuestos por Biodiversity (2008) donde 33 son cualitativos y 32 cuantitativos. El detalle de los descriptores utilizados se encuentra en el Anexo D.

### **2.3 Caracterización Molecular**

---

\* Datos obtenidos de la Estación meteorológica del INAMHI ubicada en la Facultad de Ciencias Agrícolas de La Universidad Central (Tumbaco- La Morita, 2005).

Los reactivos, materiales y equipos utilizados en la caracterización molecular se detallan en el Anexo E.

### **2.3.1 Zona de estudio**

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de biología molecular del Departamento Nacional de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del INIAP.

### **2.3.2 Ubicación geográfica**

<b>21) Provincia:</b>	27) Pichincha
<b>22) Cantón:</b>	28) Mejía
<b>23) Parroquia:</b>	29) Cutuglahua
<b>24) Altitud:</b>	30) 3050 msnm
<b>25) Longitud:</b>	31) 0°22'15'' Sur
<b>26) Latitud:</b>	32) 78°33'14'' Oeste

### **2.3.3 Extracción de ADN genómico**

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN de Viruel y Hormaza (2006) modificado por la Ing. Doris Chalampunte (comunicación personal, Julio 26, 2006), para muestras frescas, detallado a continuación:

Las hojas frescas colectadas fueron maceradas en tubos Eppendorf con 750µl de buffer de extracción CTAB, se añadió 2µl del antioxidante β-mercapto-etanol, se homogenizó la muestra mediante agitación, se incubó en baño maría a 65 °C durante 30 minutos mezclando por inversión cada 10 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar durante cinco minutos y se añadió 750µl de CIA (Cloroformo: Alcohol Isoamílico, 24:1), se homogeneizó nuevamente y se centrifugó por 15 minutos a 10.000 rpm.

El sobrenadante fue transferido a tubos nuevos y se repitió la limpieza con CIA, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por cinco minutos. Una vez finalizada la limpieza, el ADN fue precipitado con isopropanol y colocado a -20 °C por 30 minutos en el congelador obteniendo un pellet o pastilla de ADN, se centrifugó a 13.000 rpm por dos minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió 500 µl de buffer de lavado; se colocó esta mezcla en el congelador a -20 °C por 30 minutos; culminado el tiempo se eliminó el buffer de lavado, finalmente se realizó un lavado rápido con 200 µl de etanol frío al 70%; el secado de las muestras se lo realizó en la microestufa por 1 hora a 37 °C.

Una vez eliminados los residuos de etanol, se procedió a diluir el pellet de ADN en volúmenes de 50 a 400 µl en TE (Tris-HCl, EDTA) a 65 °C por 30 minutos en baño maría; para eliminar el ARN se colocó 2 µl de RNAsa (10 ug/ml; R-4642, SIGMA) por cada 100 µl de ADN obtenidos, se colocó en baño maría por 15 minutos a 65 °C. Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20° C hasta la cuantificación (Morillo, 2002).

#### **2.3.4 Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación del ADN genómico se realizó en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio, en solución tampón TAE 1X. Las muestras fueron cuantificadas utilizando el marcador de peso molecular estándar DNA Low Mass Ladder (10068-013 GIBCO BRL). La electroforesis se realizó a 100 V por 15 min. En base a la estimación de la concentración, se realizó la dilución de las muestras de ADN en tampón TE 0,1M tartrazine hasta lograr una concentración final de 5 ng/µl para los ensayos de amplificación.

#### **2.3.5 Amplificación de loci microsatélites**

En un sondeo preliminar con 20 *primers* (Escribano *et al.*, 2006) fueron seleccionados nueve *primers* en función del polimorfismo y la calidad de los productos

observados en la amplificación, siendo amplificados en 126 accesiones de chirimoya. Los *primers* polimórficos y sus secuencias de nucleótidos 5' - 3' se encuentran detallados en el Anexo F.

- **Amplificación SSR's (Hormaza, 2008)**

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 15 µL que contiene 16 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris-HCl con pH 8,8, 0,01% de Tween20, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada uno de los dNTPs, 0,4 µM de cada cebador, 25 ng de ADN genómico y 0,5 unidades de ADN Taq polimerasa, BioTaq<sup>TM</sup> (Bioline, London, UK).

Las reacción DE PCR se realizó en un termociclador I-cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) con el siguiente perfil de temperaturas: denaturación inicial a 94 °C por un minuto, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y un minuto a 72 °C y, finalmente, un paso de extensión de cinco minutos a 72 °C.

Uno de los cebadores de cada pareja, concretamente el cebador directo, fue marcado con los fluorocromos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub> de Beckman Coulter (Proligo, París, Francia) en el extremo 5' (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1** Microsatélites de chirimoya y sus respectivos fluorocromos.

<b>Locus</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Fluorocromo</b>
LMCH-1	55 °C	D <sub>4</sub> -azul
LMCH-4	55 °C	D <sub>4</sub> -azul

LMCH-16	55 °C	D <sub>3</sub> -verde
LMCH-48	55 °C	D <sub>3</sub> -verde
LMCH-69	55 °C	D <sub>2</sub> -negro
LMCH-87	55 °C	D <sub>2</sub> -negro
LMCH-122	55 °C	D <sub>4</sub> -azul
LMCH-139	55 °C	D <sub>2</sub> -negro
LMCH-144	55 °C	D <sub>3</sub> -verde

Fuente: Hormaza, 2008.

Los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis capilar en un analizador automático de fragmentos CEQ™ 8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU) en el cual, para determinar el tamaño de los mismos las muestras fueron desnaturalizadas a 90 °C durante 120 segundos, inyectadas a 2,0 kV durante 30 segundos y separadas a 6,0 kV durante 35 minutos. Para eliminar las variaciones en cada electroforesis y asegurar con exactitud el tamaño de los fragmentos, las reacciones se repitieron dos veces y se usó el cultivar español ‘Fino de Jete’ como control positivo en cada una de ellas.

### **2.3.6 Secuenciación (Hormaza, 2008)**

En un tubo de 15 ml se preparó el mix que incluye Formamida (35 µl/pocillo) y el *standard* (0,45 µl/pocillo), para tantos pocillos como muestras correspondan al análisis.

En la placa del secuenciador se colocaron alícuotas de 35,5 µl del mix en cada uno de los pocillos y con la pipeta multicanal, se depositó cada muestra en su pocillo correspondiente, se añadió una gota de aceite para evitar la evaporación de la muestra durante el proceso de electroforesis.

### **2.4 Período de tiempo de investigación**

El tiempo de duración invertido en esta investigación fue 1 año y 8 meses.

## 2.5 Análisis de datos

### 2.5.1 Análisis Estadístico de la Caracterización Morfoagronómica

#### 2.5.1.1 Matriz de similitud y distancia

La similitud general entre dos entradas es función de sus similitudes individuales en cada uno de los caracteres para los cuales son comparados. Utilizando el paquete estadístico SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1990) y la distancia de Gower (1967), se estimó la similitud taxonómica entre cada par de entradas para caracteres continuos, mientras que para los cualitativos se utilizó el coeficiente de asociación que se detalla a continuación:

$$S_{ij} = \sum S_{ij} / n$$

Donde:

$n$  = número de caracteres cualitativos

$S_{ij}$  = coeficiente de asociación entre las entradas  $i$  y  $j$

Luego se transformó en una matriz de distancia ( $D1$ ), mediante el complejo  $S_{ij}$ :

$$D1(ij) = (1 - S_{ij})$$

Además se calculó una matriz de distancia Euclideana:

$$D2(ij) = (\sum (X_{ki} - X_{kj})^2)^{1/2}$$

Donde:

$X_{ki}$  = registro estandarizado de carácter  $k$  en la entrada  $i$

$X_{kj}$  = registro estandarizado de carácter  $k$  en la entrada  $j$

Dando la matriz final:

$$D = (n_1D_1 + n_2D_2) / (n_1 + n_2)$$

La estructura taxonómica de las entradas fue analizada por medio del agrupamiento jerárquico de Ward (1963) permite encontrar en cada estado aquellos dos grupos cuya unión produzca el mínimo incremento en la suma total de cuadrados del error dentro del grupo.

La elección del número de grupos de entradas se hizo con los criterios de Pseudo F y Pseudo t2 utilizando el procedimiento CLUSTER del paquete estadístico SAS.

#### **2.5.1.2 Determinación del valor discriminante entre grupos**

Mediante este análisis se reconocieron dentro del grupo de caracteres utilizados aquellos que tuvieron el mayor valor discriminante y por lo tanto permitieron una eficiente identificación de la relación entre los individuos de la población en estudio para un determinado carácter y para el grupo de caracteres.

#### **Caracteres cuantitativos**

El valor discriminante o índice “D” de un descriptor cuantitativo es el número de diferencias significativas detectadas por la prueba Duncan, expresadas como una fracción del número total de posibles comparaciones dentro de un grupo. Con el análisis de esta comparación se identificó los descriptores de mayor valor discriminante (Engels, 1983), que permitió la formación de grupos dentro de la colección.

#### **Caracteres cualitativos**

El valor índice “D” para caracteres cualitativos se basa en el número de pares de taxa que un cierto descriptor puede separar y en la cantidad de información que este descriptor comparta con otros descriptores del mismo estudio.

La comparación de valores “D” entre el grupo de descriptores permitió seleccionar aquellos con mayor valor discriminante. En general, la magnitud de “D” expresa la mayor o menor relación entre clones de un grupo con relación a un determinado carácter; entre mayor sea la relación de los clones de un grupo, menor será el valor “D” (Engels, 1983).

El valor discriminante se estima, con pruebas estadísticas como: Valor de Cramer “V” (Kendall & Stuart, 1979), Coeficiente de Asociación “P” (Fienberg citado por Tapia, 1998) y Chi cuadrado “X<sup>2</sup>” (Cochran, 1954).

## **2.5.2 Análisis Estadístico de la Caracterización molecular**

### **2.5.2.1 Análisis de Diversidad genética**

Se utilizó el programa PowerMarker V3.0 (Liu, 2005). Los parámetros de diversidad determinados fueron:

- **Número de observaciones:** Es el número de alelos o genotipos observados en la muestra. Se reconoce que un genotipo perdido cuando uno de los alelos está perdido. Si existen datos perdidos, disminuye el número de observaciones.
- **Tamaño de la muestra:** Número de accesiones analizadas.
- **Frecuencia de alelos:** Es el resultado de la división del número de veces que se presenta un gen para el número total de genes en la población.

- **Número de Genotipos:** Número de genotipos que se generan.
- **Número de alelos:** Cantidad de alelos generado por locus.
- **Heterocigosis Observada ( $H_o$ ):** Es la frecuencia de individuos heterocigotos en la población. A mayor frecuencia de un alelo, existe menor heterocigosis.
- **Heterocigosis Esperada ( $H_E$ ):** Es la probabilidad de que dos alelos al azar sean diferentes.
- **Contenido de información de polimorfismo:** Conocido como (PIC) por sus siglas en inglés, "Polymorphism information content". Es la medida de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas (Universidad de Navarra, 2008).
- **Alelos exclusivos:** Alelos presentes en una determinada población o individuo que posee una característica sea que provenga de un lugar único o tenga un fenotipo especial (Alstad *et al.*, 1991).

### 2.5.2.2 Análisis de Agrupamiento

La representación en árbol busca representar las relaciones individuales entre accesiones, se basan en una matriz de distancias genéticas individuales. Con el programa PowerMarker (Liu, 2005) este análisis incluye los siguientes pasos:

1. **Cálculos de frecuencia:** La matriz genotípica se transformó en una matriz de frecuencia con datos binarios (0 y 1), posteriormente se calculó la matriz de distancia escogiendo la opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS).

**2. Reconstrucción de árboles genéticos:** Para Figueras (2000) el objetivo es clasificar una muestra individuos en un número pequeño de grupos de forma que las observaciones pertenecientes a un grupo sean muy similares entre sí y muy disimilares del resto. A partir de la matriz de distancias, se probaron los métodos de agrupamiento:

- \* **UPGMA (*Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Average*):** Es un algoritmo de *clustering* o agrupamiento de abajo hacia arriba o *bottom-up*. El algoritmo recibe una matriz de distancias y a partir de ella genera un árbol filogenético. Cada entidad de la matriz tiene su propio grupo (=cluster). De forma recursiva, en cada paso se unen los dos grupos más cercanos y se recalculan las distancias, definiéndose la distancia entre dos grupos como la media (sin ponderar) de las distancias que hay entre los miembros de cada grupo.

Este método asume implícitamente la existencia de un reloj molecular evolutivo. La hipótesis del reloj molecular dice que para una determinada macromolécula (proteína o gen) el ritmo de cambio ha sido similar a lo largo de la historia y en los distintos organismos, de forma que existe una relación directa entre tiempo y cantidad de cambios (Abascal, 2006).

Los árboles fueron visualizados en TREEVIEW 1.6.6 (Page, 2001).

**3. Bootstrap:** Muestra (con reemplazamiento) el alineamiento repetidas veces (por ejemplo 100 ó 1000 veces) y para cada una de esas muestras buscar la mejor hipótesis. El resultado es una lista de árboles que pueden ser usados para construir un árbol consenso con la opción “Consensos” del software PHYLIP 3.67 (Felsenstein, 1993; Abascal, 2006).

### **2.5.2.3 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)**

Los métodos factoriales como el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) detectan estructuras fuertes en una población sin tomar en cuenta en lo posible los efectos individuales. El PCoA es una técnica de análisis multivariado que permite detectar los ejes de mayor variación a diferencia del método de agrupamiento (UPGMA) que solo tiene un eje. El cálculo matemático permite definir ejes ortogonales (extrayentes cada uno de una fracción independiente de la varianza global), donde se distribuyen los individuos observados. Este método es homólogo al análisis de Componentes Principales pero aplicado no a datos derivados de observación, sino a una matriz de similitud de estas observaciones entre los individuos analizados. Típicamente son considerados los dos o tres primeros ejes (García, 2008).

Para el análisis de PCoA, se utilizó el software NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002), se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard de la opción *SimQual*, la matriz obtenida se utilizó para la opción *DCENTER*, y mediante la opción *Eigen* se obtuvo la dispersión de las muestras y los porcentajes de varianza explicados para cada coordenada.

### **2.6 Identificación de duplicados**

Para la identificación de duplicados se utilizó el software Excel *Microsatellite Toolkit* (Park, 2001), a partir de la matriz de las tallas de los alelos. La opción *diploide: double column format* reconoció a la matriz formada por 95 muestras y nueve loci y se escogió la opción *finding matching simples*. Además se seleccionó la diferencia de por lo menos un alelo para las comparaciones entre las tallas de las accesiones.

### **2.7 Relación de datos morfoagrónomica y moleculares**

Se utilizó la opción MXCOMP del paquete estadístico NTSYS, la cual procede de la siguiente manera: utilizando la matriz de distancia moleculares “X” obtenidas con el coeficiente de Jaccard y las morfológicas “Y” obtenidas con el coeficiente de Gower; se correlaciona entre ellas el valor estadístico Mantel (1967), que se define como:

$$Z = \sum_j \sum_k X_{jk} Y_{jk}$$

Donde:

$X_{jk}$  y  $Y_{jk}$  = son elementos de  $j$ s líneas y de  $k$ s columnas de  $X_{n \times n}$  y  $Y_{n \times n}$  respectivamente, y  $k$  es  $< j$

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización Morfoagronómica

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de los descriptores morfoagronómicos evaluados en la colección nacional de chirimoya del INIAP- Ecuador, se detalla a continuación:

##### 3.1.1 Variabilidad morfológica

Para determinar la variabilidad de los datos morfológicos de la colección de chirimoya, se usaron como parámetros estadísticos, el valor mínimo, valor máximo, promedio y el coeficiente de variación (CV) en los 32 descriptores cuantitativos (Tabla 3.1).

Mientras menor sea el valor de CV en el conjunto de caracteres, los datos colectados serán más homogéneos, por lo tanto menor variación; el coeficiente de variación de esta investigación estuvo entre 6,31% (**Número de venas primarias en el**

**haz)** con un promedio de 30 y 96,83% (**Rendimiento [kg/árbol]**) con un promedio de 17,82 (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1** Parámetros usados para la estimación de la variabilidad genética de la colección de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) del INIAP- Ecuador.

Descriptor	Valor mínimo	Valor máximo	Promedio	CV %
Número de flores por metro en la rama del año anterior	2	18	7	38,78
Porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año [%]	14,95	87,63	51,34	29,88
Longitud de la lámina foliar [mm]	107,86	164,43	138,23	9,04
Anchura de la lámina foliar [mm]	66,42	105,84	85,57	9,76
Espesor de la lámina foliar [mm]	0,19	0,35	0,23	11,04
Longitud del pecíolo [mm]	9,68	21,41	15,30	15,09
Grosor del pecíolo [mm]	1,73	3,02	2,44	12,13
Número de venas primarias en el haz	23	33	30	6,314
Peso de la flor [g]	0,70	2,80	1,59	25,46
Longitud del pétalo [mm]	21,64	32,95	27,88	9,44
Ancho del pétalo [mm]	4,02	10,22	6,32	16,81
Peso del pétalo [g]	0,20	0,75	0,45	29,16
Peso del cono estigmático [g]	0,06	0,19	0,09	17,10
Longitud del fruto [mm]	55,46	124,33	87,52	16,04
Diámetro del fruto [mm]	71,21	128,55	98,38	10,26
Peso del fruto [g]	205,20	952,80	461,13	33,35
Longitud del pedúnculo [mm]	12,76	35,16	21,63	20,62
Diámetro del pedúnculo [mm]	3,88	11,75	6,13	22,35
Peso de la epidermis [g]	42,25	212,30	90,13	42,01
Grosor de la epidermis [mm]	0,36	3,33	0,96	51,42
Resistencia al penetrómetro [N/cm <sup>2</sup> ]	3,93	104,14	40,40	36,19
Peso de semillas [g]	2,00	50,03	18,90	51,22
Número de semillas	6	75	29	46,09

Contenido de sólidos solubles en la pulpa [° Brix]	14,17	31,00	22,60	13,03
Acidez titulable [meq / 100 g]	0,08	1,24	0,33	37,22
Peso de una semilla fresca [g]	0,40	0,90	0,66	16,43
Longitud de la semilla [mm]	14,44	34,50	17,71	13,92
Anchura de la semilla [mm]	8,35	12,52	11,27	64,96
Diámetro del tallo principal [mm]	424	1118	735,22	18,28
Número de días desde la floración hasta el cuajado de fruto [d]	8	21	13	16,73
Número de días desde la floración hasta la maduración del fruto [d]	129	229	186	10,55
Rendimiento [kg/árbol]	1,00	85,60	17,82	96,83

### 3.1.2 Agrupamiento de entradas

El agrupamiento jerárquico de Ward (1963) obtenido a partir de la matriz de distancia generada por el algoritmo de Gower (Anexo G), identificó **tres grupos** de entradas (Tabla 3.2), el Grupo 1 está formado por 27 accesiones, el Grupo 2 está conformado por 40 accesiones y el Grupo 3 formado por 30 accesiones.

**Tabla 3.2** Distribución de las 97 accesiones de *Annona cherimola* Mill por grupos, según el análisis de agrupamiento jerárquico de Ward, evaluados en la granja Experimental Tumbaco, INIAP - Ecuador.

Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
Código	Sitio de colecta	Código	Sitio	Código	Sitio de colecta
ch122	Ecuador - MAG Tumbaco	ch3	Estados Unidos	ch32	Ecuador - Canchinomaca
ch96	Ecuador - Paute	ch55	Ecuador - Nambacola	ch43	Ecuador - San José de Minas
ch84	España	ch13	Ecuador - Tumbaco	ch117	Ecuador - San José de Minas
ch72	Ecuador - MAG Tumbaco	ch68	Ecuador - Tumbaco	ch27	Ecuador - Puéllaro
ch99	Ecuador - MAG Tumbaco	ch38	Ecuador - MAG Tumbaco	ch60	Ecuador - Puéllaro
ch102	Ecuador - San José de Minas	ch56	Perú	ch98	Ecuador - MAG Tumbaco
ch114	Ecuador - MAG Tumbaco	ch52	Ecuador - MAG Tumbaco	ch116	Ecuador - San José de Minas
ch8	Ecuador - San José de Minas	ch11	Ecuador - Canchinomaca	ch26	Ecuador - Perucho
ch100	Ecuador - Nambacola	ch40	Ecuador - MAG	ch70	Chile

			Tumbaco		
ch107	Ecuador - Nambacola	ch73	Ecuador - MAG Tumbaco	ch88	Ecuador - San José de Minas
ch30	Ecuador - San José de Minas	ch42	Ecuador - San José de Minas	ch79	Ecuador - Nambacola
ch12	Estados Unidos	ch1	Estados Unidos	ch90	Ecuador - San José de Minas
ch62	Ecuador - MAG Tumbaco	ch4	Estados Unidos	ch82	Ecuador - Paute
ch6	Estados Unidos	ch2	Estados Unidos	ch126	Chile
ch115	Ecuador - MAG Tumbaco	ch125	Ecuador - Paute	ch97	Chile
ch23	Chile	ch39	Ecuador - MAG Tumbaco	ch16	Chile

**Continuación...**

ch103	Ecuador - San José de Minas	ch49	Ecuador - Perucho	ch76	Ecuador - San José de Minas
ch53	Ecuador - San José de Minas	ch51	España	ch10	Ecuador - Nambacola
ch63	Ecuador - MAG Tumbaco	ch61	España	ch22	Ecuador - Nambacola
ch85	Ecuador - MAG Tumbaco	ch28	España	ch33	Chile
ch112	Ecuador - MAG Tumbaco	ch71	España	ch65	Ecuador - San José de Minas
ch86	Ecuador - MAG Tumbaco	ch17	España	ch75	Ecuador - San José de Minas
ch113	Ecuador - MAG Tumbaco	ch19	Ecuador - San José de Minas	ch69	Costa Rica
ch29	Ecuador - MAG Tumbaco	ch20	Ecuador - San José de Minas	ch91	Ecuador - Loja
ch34	Ecuador - Tumbaco	ch118	Ecuador - San José de Minas	ch15	Ecuador - Perucho
ch35	Ecuador - Perucho	ch18	Ecuador - MAG Tumbaco	ch77	Ecuador - Loja
ch24	Ecuador - Tumbaco	ch89	Ecuador - San José de Minas	ch81	Ecuador - Loja
		ch83	Ecuador - Puéllaro	ch36	Ecuador - Puéllaro
		ch5	Estados Unidos	ch21	Estados Unidos
		ch14	Ecuador - Baños	ch9	Estados Unidos
		ch59	Ecuador - Perucho		
		ch74	Ecuador - MAG Tumbaco		
		ch120	Ecuador - Vilcabamba		
		ch37	España		
		ch50	Ecuador - Puéllaro		
		ch80	Ecuador - Nambacola		
		ch105	Ecuador - Loja		
		ch25	Ecuador - Baños		

		ch121	Ecuador - Nambacola		
		ch48	Ecuador - Baños		

### 3.1.3 Valor Discriminante de los Caracteres

Los parámetros estadísticos para la selección de descriptores discriminantes cualitativos y cuantitativos se detallan en los párrafos a continuación.

#### 3.1.3.1 Caracteres cualitativos

De los 33 caracteres cualitativos evaluados, se aplicó la prueba de Chi cuadrado ( $X^2$ ) para determinar los descriptores discriminantes, obteniendo: diez caracteres altamente significativos al 1%, 15 significativos al 5% y un caracter no significativo (Tabla 3.3). Los resultados indican que existen descriptores de gran importancia para determinar los tres grupos genéticos, además presentaron altos coeficientes de asociación.

En la Tabla 3.3 se detalla los resultados de la prueba de  $X^2$ , coeficiente de asociación (P) y Cramer's (V) de los caracteres cualitativos analizados. Se establecieron diez caracteres discriminantes por ser altamente significativos según la prueba de Chi cuadrado y son: **Color de la rama joven** (13,196), **Forma del ápice de la lámina foliar** (22,908), **Color de las hojas jóvenes** (28,296), **Uniformidad en el tamaño de los frutos** (14,858), **Posición del ápice del fruto** (21,449), **Fibra en la pulpa** (19,866), **Forma de fruto** (19,030), **Color de la epidermis** (22,334), **Resistencia a la abrasión** (10,682) y **Textura de la pulpa** (21,386).

Los descriptores con valores totalmente homogéneos (ocho descriptores), no fueron considerados dentro del análisis (Anexo H).

**Tabla 3.3** Parámetros usados para la estimación del valor discriminante en caracteres cualitativos para la colección chirimoya (*Annona cherimola* Mill) del INIAP.

Caracteres	X <sup>2</sup>	Coefficiente de Asociación (P)	Cramer's (V)
Color de las hojas jóvenes	28,296**	0,54	0,54
Forma del ápice de la lámina foliar	22,908**	0,486	0,486
Posición del ápice del fruto	21,449**	0,47	0,47
Fibra en la pulpa	19,866**	0,453	0,453
Uniformidad en el tamaño de los frutos	14,858**	0,391	0,391
Color de la rama joven	13,196**	0,369	0,369
Color de la epidermis	22,334**	0,48	0,339
Resistencia a la abrasión	10,682**	0,332	0,332
Textura de la pulpa	21,386**	0,47	0,332
Forma de fruto	19,030**	0,443	0,313
Regularidad de la producción	8,460*	0,295	0,295
Color del tronco del árbol	13,978*	0,38	0,268
Forma de la lámina foliar o limbo <sup>a</sup>	6,395*	0,257	0,257
Margen de la lámina foliar	6,026*	0,249	0,249
Oxidación de la pulpa	11,103*	0,338	0,239
Forma de la base de la lámina foliar	5,011*	0,227	0,227
Color de la pulpa	9,956*	0,32	0,227
Color de la semilla fresca	9,599*	0,315	0,222
Tipo de epidermis <sup>a</sup>	9,439*	0,312	0,221
Defoliación al final de la fructificación	9,209*	0,308	0,218
Relieve de la venación en el haz	4,561*	0,217	0,217
Sabor de la pulpa	8,634*	0,298	0,211
Color de las hojas maduras	8,034*	0,288	0,203
Hábito de fructificación	6,625*	0,261	0,185

Color de la base interna de los pétalos	2,133*	0,148	0,148
Desprendimiento de la semilla de su epitelio (camisa)	1,384ns	0,119	0,084

<sup>a</sup> Carácter de mayor valor discriminante    \*\* Altamente significativo al 1% de probabilidad    \* Significativo al 5% de probabilidad  
ns No significativo

### 3.1.3.2 Caracteres cuantitativos

Según Engels (1983), un carácter para el cual los grupos genéticos tengan valores marcadamente distintos, tendrá un valor “D” máximo de 1. En el presente estudio hubo un valor de 1 y 0,33 entre las comparaciones posibles entre grupos, por lo tanto fue posible seleccionar descriptores cuantitativos de mayor poder discriminante.

Los valores de la prueba de Duncan y promedios calculados para los descriptores cuantitativos evaluados se detallan en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Valores promedios para caracteres cuantitativos de los tres grupos definidos del análisis de agrupamiento de Ward en la colección de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) del INIAP- Ecuador.

Descriptor	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Número de flores por metro en la rama del año anterior	6,592 A	6,450 A	7,833 A
Porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año [%]	51,761 AB	47,608 AB	55,955 A
Longitud de la lámina foliar [mm]	141,737 A	136,964 A	136,780 A
Anchura de la lámina foliar [mm]	85,617 A	85,561 A	85,570 A
Espesor de la lámina foliar [mm]	0,235 A	0,228 A	0,240 A
Longitud del pecíolo [mm]	15,362 A	15,273 A	15,309 A
Grosor del pecíolo [mm]	2,481 A	2,422 A	2,441 A
Número de venas primarias en el haz	30,444 A	29,400 B	29,066 B
<b>Peso de la flor [g]</b>	<b>1,869 A</b>	<b>1,375 C</b>	<b>1,632 B</b>
Longitud del pétalo [mm]	28,220 A	27,330 A	28,325 A
Ancho del pétalo [mm]	6,837 A	6,055 B	6,232 B
<b>Peso del pétalo [g]</b>	<b>0,536 A</b>	<b>0,395 C</b>	<b>0,464 B</b>
Peso del cono estigmático [g]	0,099 A	0,093 A	0,097 A
Longitud del fruto [mm]	88,557 A	89,224 A	84,321 A
Diámetro del fruto [mm]	98,279 A	98,343 A	98,545 A
Peso del fruto [g]	481,96 A	450,710 A	456,290 A
Longitud del pedúnculo [mm]	22,340 AB	20,161 B	22,951 A
Diámetro del pedúnculo [mm]	6,519 A	5,995 A	5,959 A
Peso de la epidermis [g]	96,101 A	90,629 A	84,099 A

Grosor de la epidermis [mm]	1,035 A	0,926 A	0,953 A
Resistencia al penetrómetro [N/cm <sup>2</sup> ]	44,818 A	39,549 A	37,582 A
Peso de semillas [g]	21,824 A	18,276 A	17,132 A
Número de semillas	33 A	29,400 AB	25,100 B
Contenido de sólidos solubles en la pulpa [° Brix]	22,277 AB	21,974 B	23,728 A
Acidez titulable [meq / 100 g]	0,409 A	0,302 B	0,308 B
Peso de una semilla fresca [g]	0,651 A	0,667 A	0,680 A
Longitud de la semilla [mm]	17,875 A	17,716 A	17,574 A
Anchura de la semilla [mm]	10,230 A	12,400 A	10,711 A
Diámetro del tallo principal [mm]	777,56 A	719,300 A	718,370 A
Número de días desde floración hasta cuajado de fruto [d]	12,851 A	13,250 A	12,766 A
Número de días desde floración hasta maduración del fruto [d]	190,519 A	181,200 A	189,767 A
Rendimiento [kg/árbol]	27,164 A	18,766 A	8,163 B

De los 32 caracteres cuantitativos evaluados, 2 fueron altamente discriminantes y 8 discriminantes. En la tabla 3.5 se presenta el promedio de la desviación estándar, entre menor sea más similares serán los genotipos en los grupos correspondientes.

**Tabla 3.5.** Valor promedio de desviación estándar para caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante para la colección de chirimoya.

Descriptor	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Valor "D"
Peso de la flor [g]	1,869 ± 0,453	1,375 ± 0,390	1,632 ± 0,378	1
Peso del pétalo [g]	0,536 ± 0,140	0,395 ± 0,138	0,464 ± 0,117	1
Ancho del pétalo [mm]	6,837 ± 1,279	6,055 ± 1,110	6,232 ± 0,737	0,33
Porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año [%]	51,761 ± 13,267	47,608 ± 18,165	55,995 ± 12,720	0,33
Número de venas primarias en el haz	30,444 ± 1,281	29,40 ± 1,945	29,066 ± 2,180	0,33
Longitud del pedúnculo [mm]	22,340 ± 4,028	20,161 ± 4,446	22,950 ± 4,835	0,33
Número de semillas	33 ± 13,496	29,4 ± 14,811	25,1 ± 11,127	0,33
Contenido de sólidos solubles en la pulpa [° Brix]	22,277 ± 3,339	21,974 ± 2,078	23,728 ± 3,512	0,33
Acidez titulable [meq / 100 g]	0,409 ± 0,195	0,302 ± 0,083	0,308 ± 0,080	0,33
Rendimiento [kg/árbol]	27,164 ± 22,838	18,766 ± 18,231	8,163 ± 7,140	0,33

### 3.1.3.3 Análisis de los caracteres cualitativos discriminantes para los grupos

Los descriptores cualitativos están constituidos por varios estados que expresan la variabilidad de la colección. La relación de los agrupamientos con los estados de los

caracteres de mayor poder discriminante permite comprender con facilidad la naturaleza de los agrupamientos (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6** Frecuencia relativa de los tres grupos obtenidos según los análisis de agrupamiento jerárquico de Ward de la colección de chirimoya (*Annona cherimola* Mill), según el estado de los caracteres cualitativos de mayor poder discriminante.

Caracter	Grupo 1 27(27,8 %)	Grupo 2 40(41,3 %)	Grupo 3 30(30,9 %)	Total Accesiones 97(100%)
<b>Color de la rama joven</b>				
1 Verde claro	-----	1(2,50)	7 (23,33)	8(8,25)
2 Verde	-----	-----	-----	-----
3 Verde oscuro	27(100,00)	39(97,50)	23(76,67)	89(91,75)
99 Otro	-----	-----	-----	-----
<b>Forma del ápice de la lámina foliar</b>				
1 Agudo	25(92,59)	37(92,50)	15(50,00)	77(79,38)
2 Intermedio	2(7,41)	3(7,50)	15(50,00)	20(20,62)
3 Obtuso	-----	-----	-----	-----
<b>Color de las hojas jóvenes</b>				
1 Verde claro	4(14,81)	32(80,00)	13(43,33)	49(50,52)
2 Verde	-----	-----	-----	-----
3 Verde oscuro	23(85,19)	8(20,00)	17(56,67)	48(49,48)
99 Otro	-----	-----	-----	-----
<b>Uniformidad en el tamaño de los frutos</b>				
0 No	15(55,56)	10(25,00)	3(10,00)	28(28,87)
1 Si	12(44,44)	30(75,00)	27(90,00)	69(71,13)
<b>Posición del ápice del fruto</b>				
1 Central	26(96,3)	20(50,00)	12(40,00)	58(59,79)
2 Asimétrico	1(3,70)	20(50,00)	18(60,00)	39(40,21)
<b>Fibra en la pulpa</b>				
0 Ausente	24(88,89)	34(85,00)	13(43,33)	71(73,20)
1 Presente	3(11,11)	6(15,00)	17(56,67)	26(26,80)
<b>Forma de fruto</b>				

<b>1</b>	Redonda	2(7,41)	2(5,00)	1(3,33%)	5(5,15)
<b>2</b>	Achatada	2(7,41)	11(27,50)	7(23,33)	20(20,62)
<b>3</b>	Cordiforme	22(81,48)	16(40,00)	21(70,00)	59(60,82)
<b>4</b>	Cónico largo	1(3,70)	11(27,50)	1(3,33)	13(13,40)
<b>5</b>	Elipsoidal	-----	-----	-----	-----
<b>99</b>	Otra	-----	-----	-----	-----
<b>Color de la epidermis</b>					
<b>1</b>	verde	-----	2(5,00)	9(30,00)	11(11,34)
<b>2</b>	verde claro	25(92,59)	37(92,50)	19(63,33)	81(81,51)
<b>3</b>	Verde oscuro	-----	1(1,50)	-----	1(1,03)
<b>4</b>	verde amarillo	1(3,70)	-----	2(6,67%)	3(3,09)
<b>5</b>	amarillo	-----	-----	-----	-----
<b>6</b>	verde marrón	-----	-----	-----	-----
<b>7</b>	marrón	1(3,70)	-----	-----	1(1,03)
<b>99</b>	otro	-----	-----	-----	-----

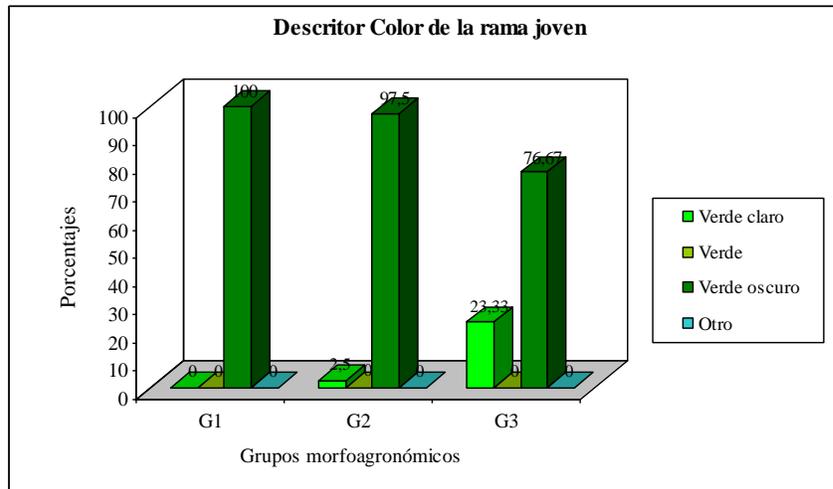
### Continuación...

<b>Resistencia a la abrasión</b>					
<b>0</b>	No	-----	11(27,50)	10(33,33)	21(21,65)
<b>1</b>	Sí	27(100,00)	29(72,50)	20(66,67)	76(78,35)
<b>Textura de la pulpa</b>					
<b>1</b>	Acuosa	10(37,04)	32(80,00)	18(60,00)	60(61,86)
<b>2</b>	Creмосa	12(44,44)	5(12,50)	6(20,00)	23(23,71)
<b>3</b>	Granular	4(14,81)	3(7,50)	2(6,67)	9(9,28)
<b>4</b>	Seca	-----	-----	3(10,00)	3(3,09)
<b>5</b>	Zonas duras en pulpa	1(3,70)	-----	1(3,33)	2(2,06)
<b>99</b>	Otra	-----	-----	-----	-----

A continuación se realiza un análisis de los descriptores más discriminantes en relación a los tres grupos.

#### a) Color de la rama joven

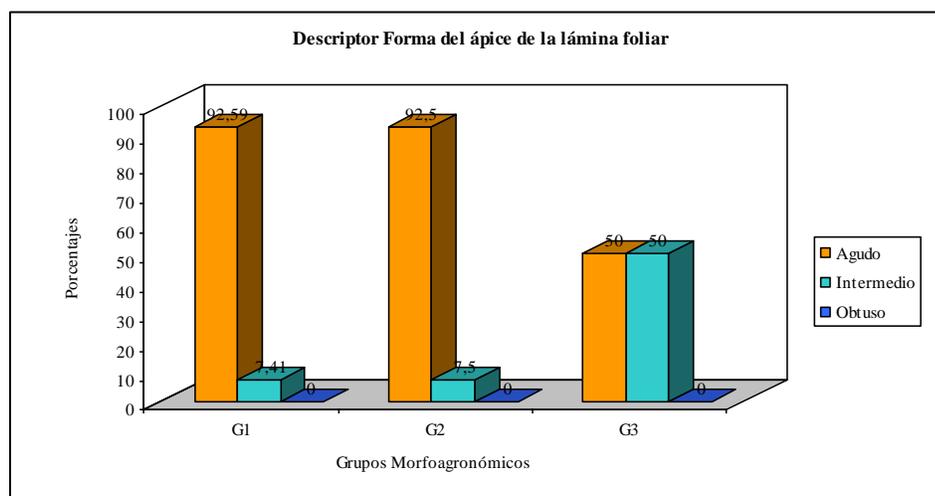
El Grupo 1 tuvo homogeneidad en un 100% de sus accesiones con ramas de color verde oscuro. El Grupo 2 mostró 2,5% color verde claro y el 97,5% un color verde oscuro de sus accesiones. El Grupo 3 presentó el 8,25% de color verde claro y el 91,75% de las entradas de color verde oscuro (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Estados del descriptor color de rama joven en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

**b) Forma del ápice de la lámina foliar**

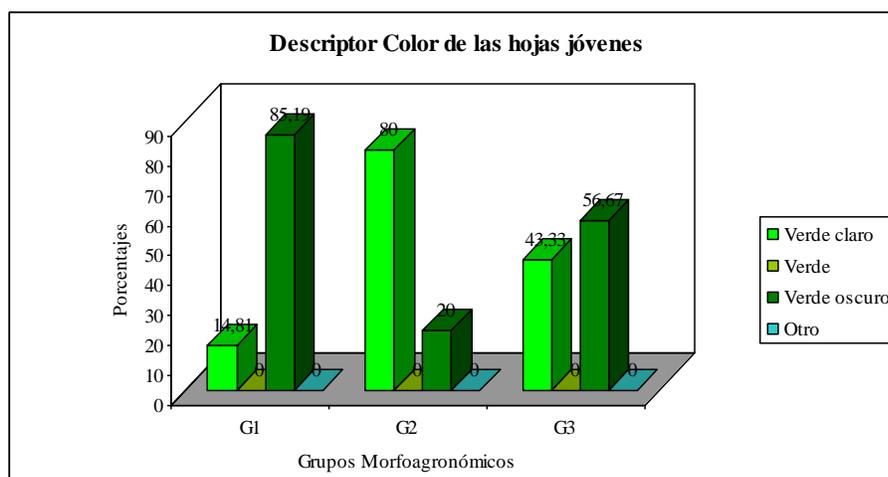
El Grupo 1 presentó el 92,59% de las entradas con forma aguda y el 7,41% con forma intermedia. En el Grupo 2 se observó la forma aguda en un 92,5% y un 7,5% de sus entradas de forma intermedia. El Grupo 3 presentó una forma aguda e intermedia del 50%, respectivamente (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Estados del descriptor forma del ápice de la lámina foliar en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

### c) Color de las hojas jóvenes

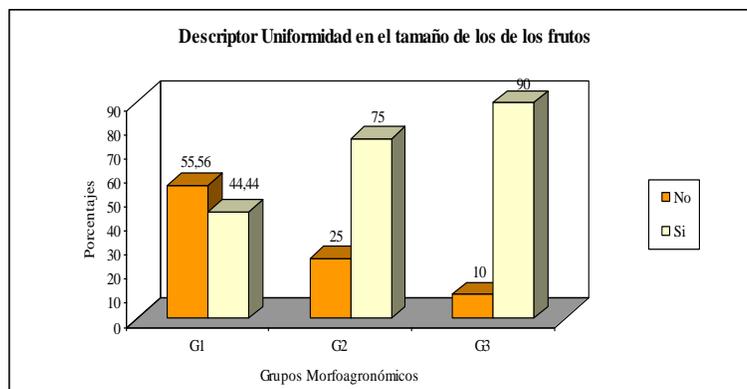
El Grupo 1 presentó el 14,48% de las entradas con hojas jóvenes verde claro y 85,19% de color verde oscuro. Para el Grupo 2 se observó valores del 80 % de color verde claro y 20% de las entradas de color verde oscuro. El Grupo 3 presentó un color verde claro en el 43,33% de las entradas y un color verde oscuro en 56,67% restante (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Estados del descriptor color de las hojas jóvenes en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

### d) Uniformidad en el tamaño de los frutos

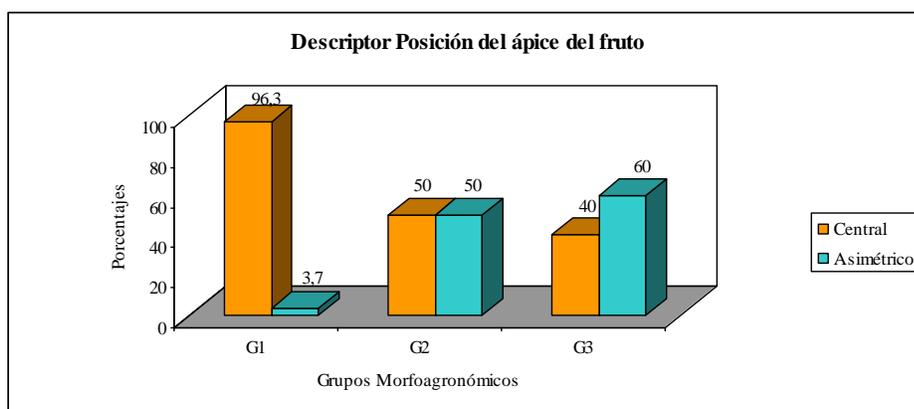
En el Grupo 1 presentó un 55,56 % de no uniformidad y un 44,44% de uniformidad de los frutos. En el Grupo 2 se observó el 25% de no uniformidad y un 75% de uniformidad. El Grupo 3 mostró el 10% de no uniformidad y el 90% de uniformidad (Figura 3.4).



**Figura 3.4** Estados del descriptor uniformidad del tamaño de los frutos en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

**e) Posición del ápice del fruto**

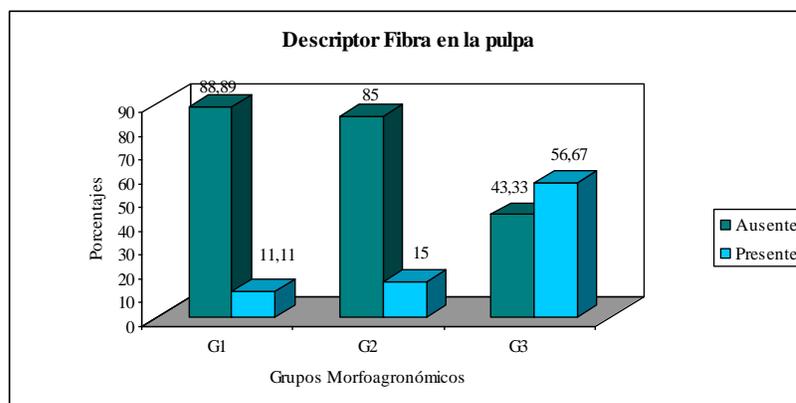
Con respecto a la posición del ápice del fruto el Grupo 1 presentó 96,3% ápice central, y 3,7% asimétrico. El Grupo 2 presentó el 50% central y asimétrica respectivamente. El Grupo 3 presentó el 40% el ápice central y el 60%, asimétrico (Figura 3.5).



**Figura 3.5** Estados del descriptor posición del ápice del fruto en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

**f) Fibra en la pulpa**

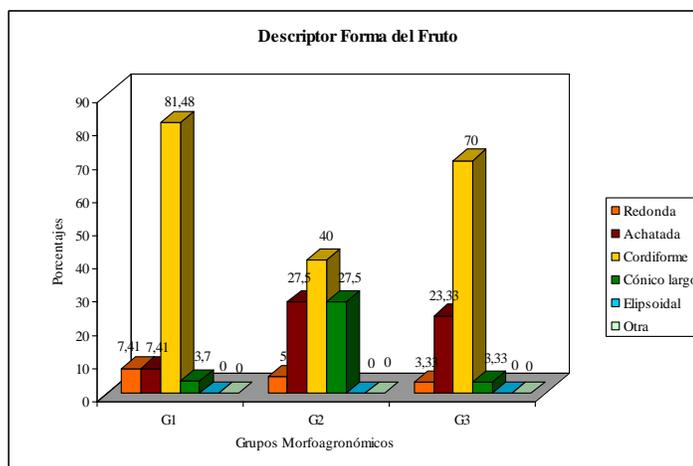
Se observó que el Grupo 1 tiene 88,89% de sus entradas ausencia de fibra y 11,11% fibra presente; el Grupo 2 presentó el 85% ausencia de fibra y el 15% de presencia de fibra. El Grupo 3 muestra el 43,33% de sus entradas con ausencia de fibra y el 56,67% con fibra en la pulpa (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Estados del descriptor fibra en la pulpa en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

### g) Forma del fruto

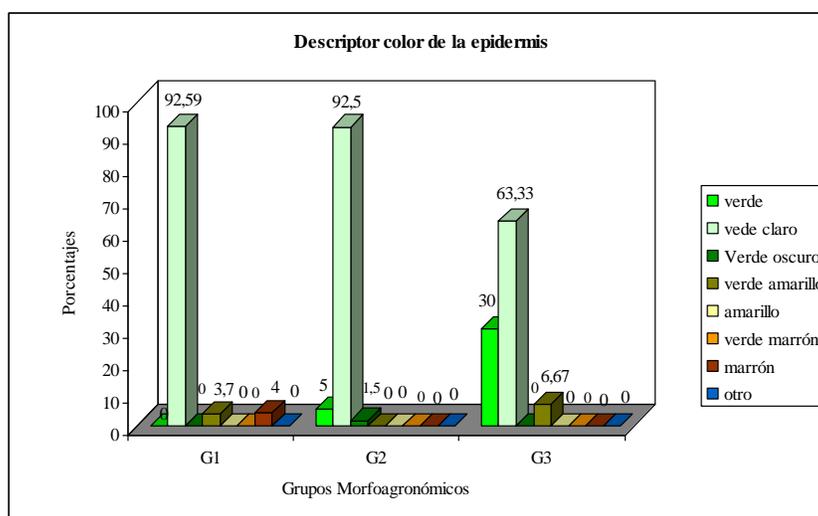
Con relación a la forma del fruto el Grupo 1 presentó 7,41% con forma redonda, 7,41%, con forma achatada, 81,48% cordiforme y 3,7% cónico largo. El Grupo 2 mostró 5% de forma redonda, 27,5% achatada, 40% cordiforme y 27,5% cónico largo. El Grupo 3 presentó el 3,33 % redonda, 23,33% achatada, 70% cordiforme y 3,33% cónico largo (Figura 3.7).



**Figura 3.7** Estados del descriptor forma del fruto en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

#### h) Color de la epidermis

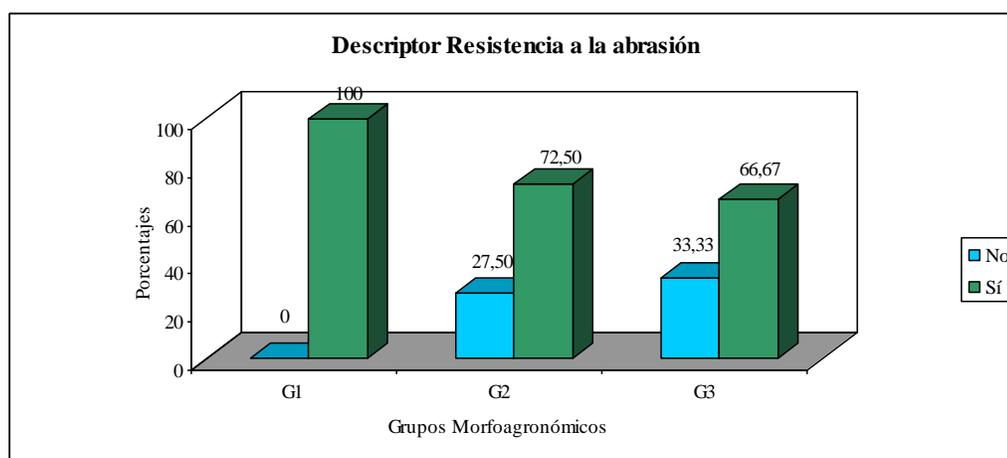
Con respecto al color de la epidermis el Grupo 1 presentó 92,59% color verde claro, el 3,7% color verde amarillo y 4% marrón. El Grupo 2 mostró el 5% de color verde, 92,5% con verde claro y el 1,5% verde oscuro. En el Grupo 3 se observó el 30% verde, 63,33% verde claro y 6,67% verde amarillo (Figura 3.8).



**Figura 3.8** Estados del descriptor color de la epidermis en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

### i) Resistencia a la abrasión

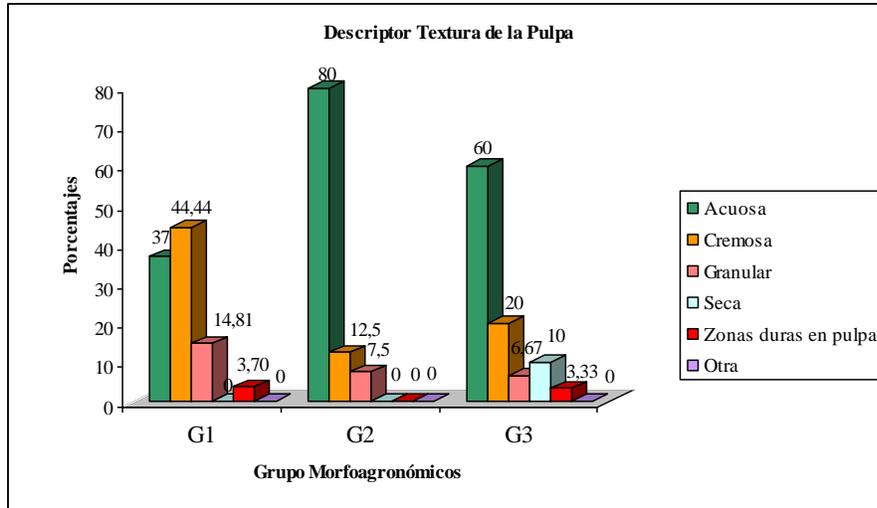
El Grupo 1 presentó el 100% de sus entradas con resistencia a al abrasión. En el Grupo 2 se observó que el 27,5% no tuvo resistencia y el 72,5% tuvo resistencia. El Grupo 3 mostró el 33,33% con resistencia y el 66,67% de sus entradas no tuvo resistencia (Figura 3.9).



**Figura 3.9** Estados del descriptor resistencia a la abrasión en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

### j) Textura de la pulpa

El Grupo 1 presentó el 37% textura acuosa, 44,44% cremosa, 14,81% granular y el 3,7% restante zonas duras en la pulpa. En el Grupo 2 se observó que el 80% presentó textura acuosa, 12,5% cremosa y el 7,5% restante, granular. El Grupo 3 mostró el 60% con textura acuosa, 20% creomosa, 6,67% granular, 10% seca, 3,33% zomas duras en la pulpa (Figura 3.9).

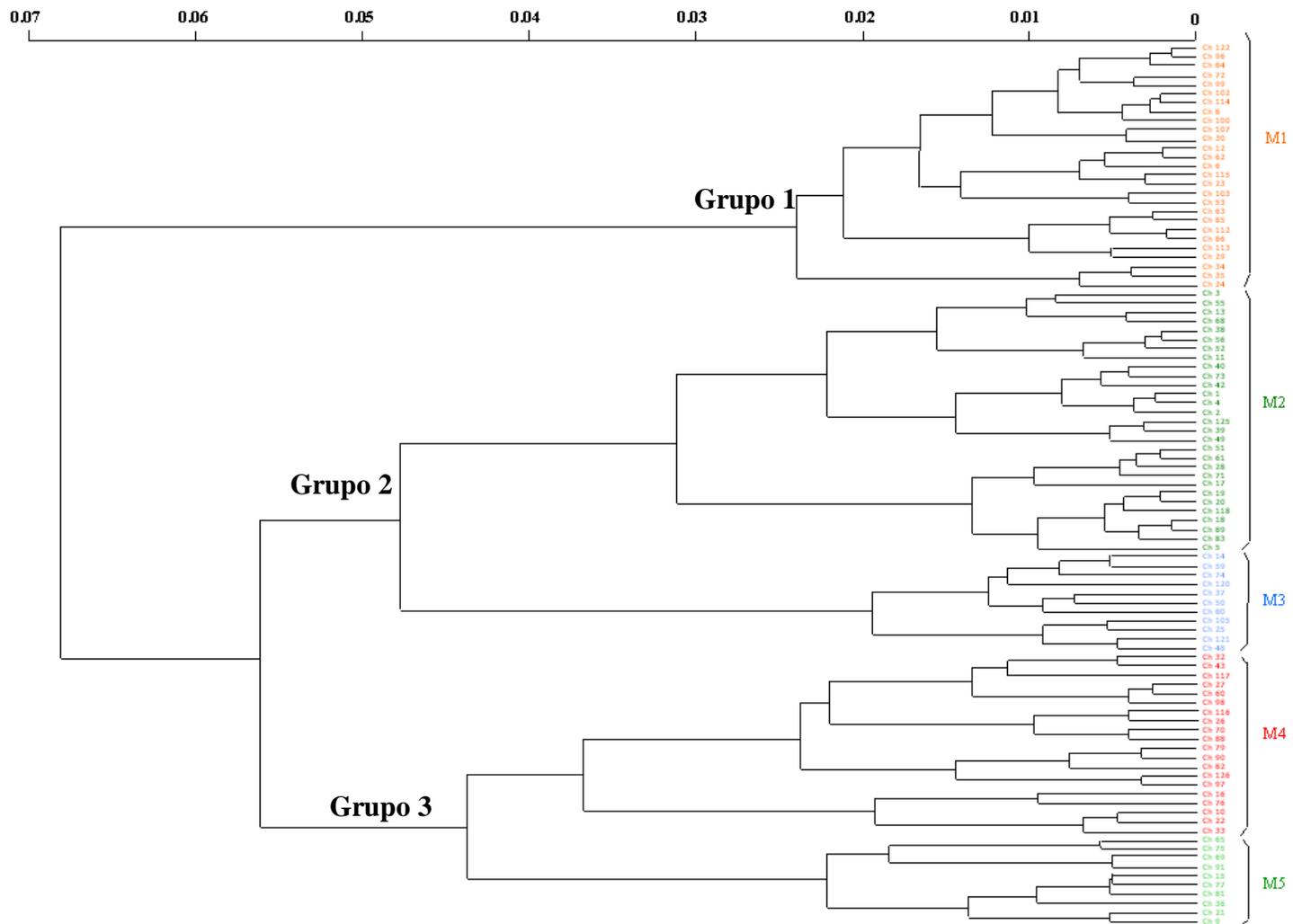


**Figura 3.10** Estados del descriptor textura de la pulpa en los grupos morfoagronómicos (G1, G2 y G3).

### 3.1.4 Estructura de los agrupamientos

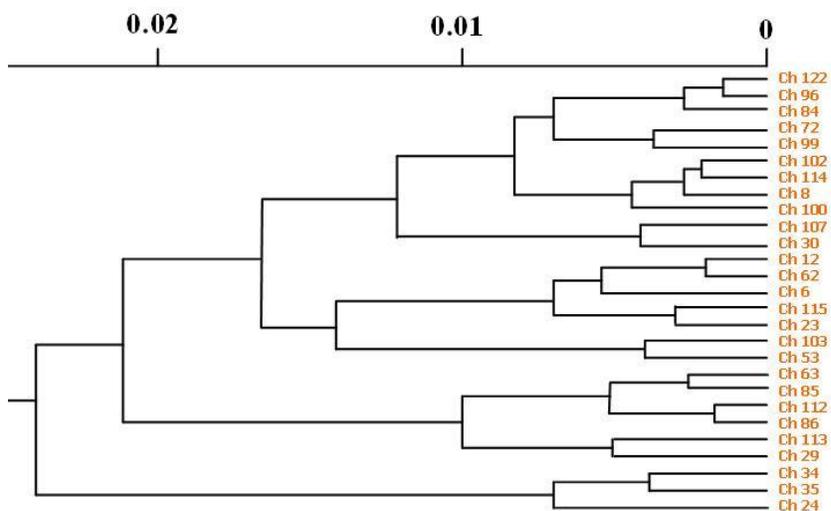
El resultado del agrupamiento jerárquico de Ward (1963) obtenido a partir de la matriz de distancia generada por el algoritmo de Gower (Anexo G) resume las relaciones en la totalidad de pares de genotipos, las cuales indican distancias cercanas entre la mayoría de accesiones con una distancia mínima de 0,0014. El dendograma de la Figura 3.10, muestra la variabilidad y parentesco genético entre entradas y grupos de accesiones de la colección de chirimoya.

**Figura 3.11** Agrupamiento jerárquico de Ward de la colección de chirimoya, basada en distancias genéticas de Gower, según los datos morfoagronómicos (M= morfotipos).



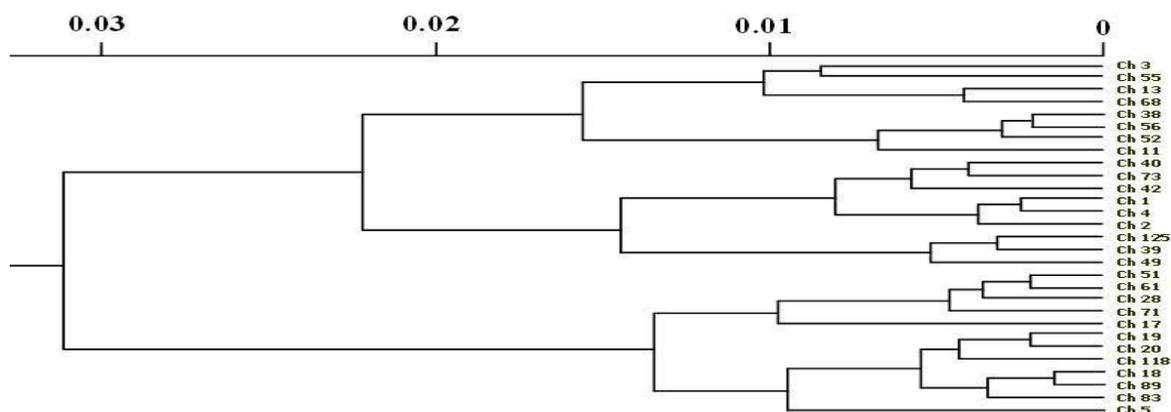
El Grupo 1 consta de entradas y se encuentra a una distancia de 0,068 en relación a los otros dos grupos (Grupo 2 y Grupo 3). Las accesiones de este grupo muestran una estrecha relación y parentesco por lo que este grupo forma el subgrupo A (Figura 3.11)

**Figura 3.12** Fenograma de 27 entradas de *Annona cherimola* Mill. que conforman el subgrupo A del Grupo 1.

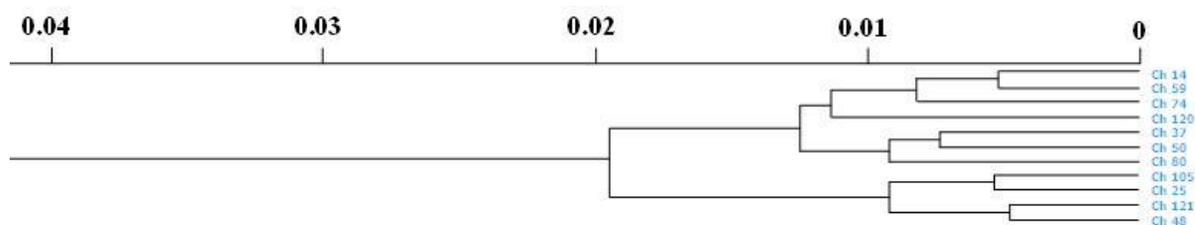


El Grupo 2 consta de 40 entradas, se encuentra a una distancia de 0,047; agrupando el mayor número de accesiones y se divide en dos subgrupos: subgrupo B (Figura 3.12) con 29 entradas y el subgrupo C (Figura 3.13) con 11 entradas; el subgrupo B se encuentra a una distancia genética de 0,031 y el subgrupo C está separado genéticamente a 0,019 mostrando una relación estrecha entre los dos subgrupos.

**Figura 3.13** Fenograma de las 29 entradas de *A. cherimola* Mill del subgrupo B en el Grupo 2.

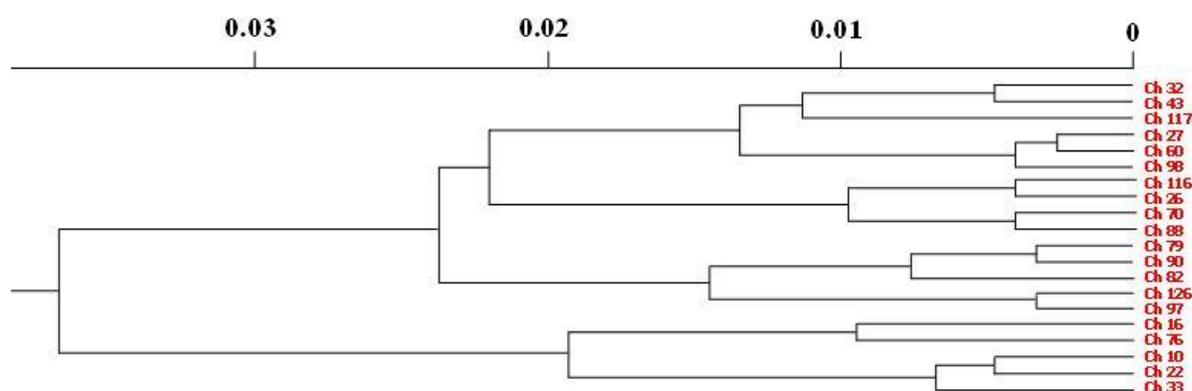


**Figura 3.14** Fenograma de las 11 entradas de *A. cherimola* Mill., del subgrupo C en el Grupo 2.

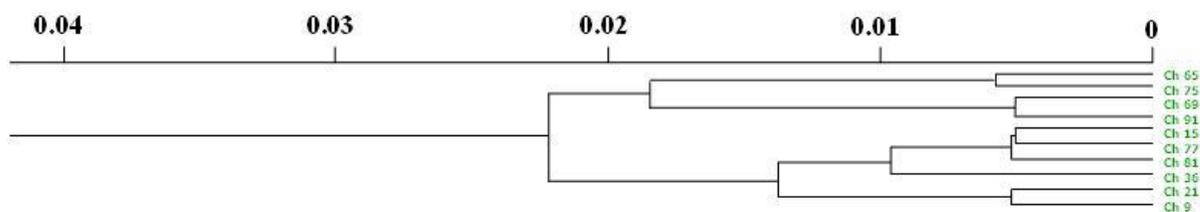


El Grupo 3 se encuentra a una distancia de 0,058 en relación al Grupo 2, y entre los dos tienen una diferencia de 0,0039; el Grupo 3 está conformado por 30 entradas, de igual manera se divide en dos subgrupos: subgrupo D (Figura 3.14) con 20 entradas y el subgrupo E (Figura 3.15) posee diez entradas; el subgrupo D se encuentra a una distancia de 0,037 y el subgrupo E está separado por una distancia genética de 0,022.

**Figura 3.15** Fenograma de las 20 entradas de *A. cherimola* Mill, del subgrupo D en el Grupo 3.



**Figura 3.16** Fenograma de las 10 entradas de *A. cherimola* Mill., del subgrupo E en el Grupo 3.

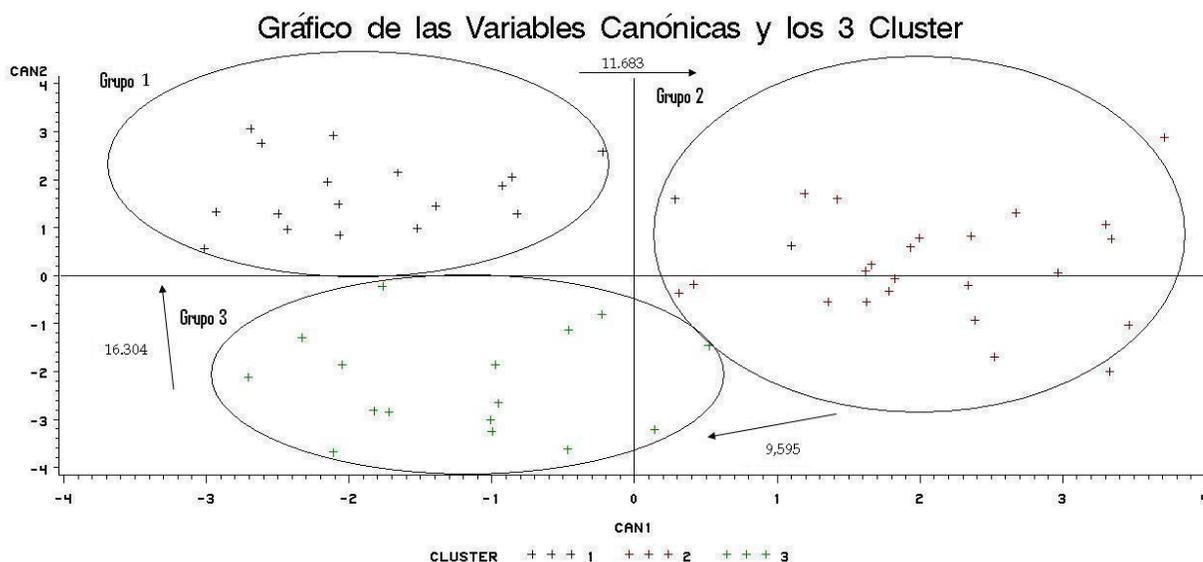


### 3.1.5 Análisis Canónico

Se presenta la ubicación espacial de las entradas en función de las ecuaciones construidas a partir del coeficiente de Gower en el análisis discriminante canónico y las distancias de Mahalanobis (Figura 3.11).

La variable CAN 1 muestra el 50% de la variabilidad genética y separa al Grupo 1 del Grupo 2, a una distancia de 11,683 mientras que la variable CAN 2 representa el 50% de la variabilidad restante separando a los grupos Grupo 1 y Grupo 3 a una distancia de 16,304 siendo los grupos más alejados. Se observa también que el Grupo 2 y Grupo 3 son los más relacionados pues muestran una distancia de 9,595.

**Figura 3.17** Ubicación espacial de las accesiones de chirimoya en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Gower (1967).



### 3.1.6 Análisis de agrupamientos

El análisis de agrupamiento jerárquico de Ward formó tres grupos de entradas dentro de los cuales se identificó cinco morfotipos. A continuación se detalla las características de cada grupo y sus respectivos morfotipos.

#### Grupo 1

Las 27 entradas que conforman el grupo provienen de España (1), Estados Unidos (2), Ecuador – Tumbaco (14), Ecuador - San José de Minas (5), Ecuador - Canchinomaca (1), Ecuador - Nambacola (2), Ecuador - Perucho (1), Ecuador - Paute (1) donde se identificó un morfotipo (M1).

**Morfotipo 1 (M1).** Está formado por 27 accesiones: (Ch122, Ch96, Ch84, Ch72, Ch99, Ch102, Ch114, Ch8, Ch100, Ch107, Ch30, Ch12, Ch62, Ch6, Ch115, Ch23, Ch103, Ch53, Ch63, Ch85, Ch112, Ch86, Ch113, Ch29, Ch34, Ch35, Ch24). Se caracteriza por presentar en la mayoría de las accesiones la forma del fruto cordiforme y tiene resistencia a la abrasión. El detalle de los caracteres evaluados se detalla en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7** Características morfoagronómicas del Grupo 1. Morfotipo 1.

			
<b>Morfotipo 1</b>			
<b>Descriptor Cualitativo</b>	<b>Estado</b>	<b>Descriptor Cuantitativo</b>	<b>Estado</b>
Color de la rama joven	verde oscuro	% de flores ( en la rama del año)	51,76%
Forma del ápice de la lámina foliar	agudo e intermedio	Número de semillas	33
Color de las hojas jóvenes	verde claro y verde oscuro	Contenido de sólidos solubles	22,28 °Brix
Forma de fruto	redonda, achatada y cordiforme	Acidez titulable	0,41 meq / 100 g
Uniformidad en el tamaño de fruto	irregular	Rendimiento	22,42 kg / árbol
Posición del ápice del fruto	central y asimétrico		
Color de la epidermis	verde, verde amarillo y marrón		
Resistencia a la abrasión	resistente		
Textura de la pulpa	acuoso, cremoso granular y zonas duras		
Fibra en la pulpa	irregular		

## **Grupo 2**

Este grupo está conformado por 40 entradas que provienen de Estados Unidos(6), España (5), Perú (1), Ecuador – Tumbaco (9), Ecuador – San José de Minas (5), Ecuador – Loja (1), Ecuador – Vilcabamba (1), Ecuador – Canchinomaca (1), Ecuador – Nambacola (1), Ecuador – Baños (3), Ecuador – Perucho (2), Ecuador – Paute (1) y Ecuador – Puéllaro (2), donde se identificó dos morfotipos (M2 y M3). Se caracteriza por presentar en la mayoría de las accesiones color verde oscuro en la rama joven, forma aguda del ápice de la lámina foliar, color verde de la epidermis, y textura acuosa en la pulpa. El detalle de los caracteres cualitativos y cuantitativos evaluados en este grupo se detalla en la Tabla 3.8.

**Morfotipo 2 (M2).** Está formado por 29 entradas provenientes de: (Ch3, Ch55, Ch13, Ch68, Ch38, Ch56, Ch52, Ch11, Ch40, Ch73, Ch42, Ch1, Ch4, Ch2, Ch125, Ch39, Ch49, Ch51, Ch61, Ch28, Ch71, Ch17, Ch19, Ch20, Ch118, Ch18, Ch89, Ch83, Ch5).

**Morfotipo 3 (M3).** Está conformado por 11 entradas: (Ch14, Ch59, Ch74, Ch120, Ch37, Ch50, Ch80, Ch105, Ch25, Ch121, Ch48).

Estos dos morfotipos se diferencian porque el M2 presenta las formas de fruto redonda, achatada, cordiforme y cónico largo; mientras que el M3 sólo presenta las formas de fruto cordiforme y cónico largo. La posición del ápice del fruto en el M2 en su mayoría es asimétrica, a diferencia de M3 donde es central. La textura de la pulpa en algunas accesiones del M2 es cremosa, mientras que en el M3 se presenta granular.

**Tabla 3.8** Características morfoagronómicas del Grupo 2. Morfotipo 2 y 3.

			
<b>Morfotipo 2</b>		<b>Morfotipo 3</b>	
Descriptor Cualitativo	Estado	Descriptor cuantitativo	Estado
Color de la rama joven	verde claro y verde oscuro	% de flores ( en la rama del año)	47,61 %
Forma del ápice de la lámina foliar	agudo e intermedio	Número de semillas	29
Color de las hojas jóvenes	verde claro y verde oscuro	Contenido de sólidos solubles	21,97 °Brix
Forma de fruto	redonda, achatada, cordiforme y cónico largo	Acidez titulable	0,3 meq / 100 g
Uniformidad en el tamaño de fruto	irregular	Rendimiento	15,42 kg / árbol
Posición del ápice del fruto	central y asimétrico		
Color de la epidermis	verde, verde claro y verde oscuro		
Resistencia a la abrasión	irregular		
Textura de la pulpa	acuoso, cremoso y granular		
Fibra en la pulpa	irregular		

### Grupo 3

Este grupo está conformado por 30 entradas provenientes de Ecuador – Tumbaco (1), Ecuador –San José de Minas (8), Ecuador – Loja (3), Ecuador –Nambacola (3), Ecuador –Canchinomaca (1), Ecuador – Perucho (2), Ecuador – Paute (1), Ecuador – Puéllaro (3), Estados Unidos (2), Chile (5), Costa Rica (1), donde se identificó dos morfotipos (M4 y M5). El Grupo 3 se caracteriza por el color verde oscuro de las ramas jóvenes y frutos resistentes a la abrasión.

El detalle de los caracteres cualitativos y cuantitativos evaluados en este grupo se detalla en la Tabla 3.9.

**Morfotipo 4 (M4).** Está conformado por 20 entradas (Ch32, Ch43, Ch117, Ch27, Ch60, Ch98, Ch116, Ch26, Ch70, Ch88, Ch79, Ch90, Ch82, Ch126, Ch97, Ch16, Ch76, Ch10, Ch22, Ch33).

**Morfotipo 5 (M5).** Está formado por 10 entradas (Ch65, Ch75, Ch69, Ch91, Ch15, CH77, Ch81, Ch36, Ch21, Ch9).

El M4 presenta color verde oscuro en ramas jóvenes en la mayoría de las accesiones, mientras que el M5 tiene un 50% de sus accesiones color verde oscuro y verde claro respectivamente. El M4 presenta en color de hojas jóvenes, verde oscuro en la mayoría de sus accesiones mientras que el M5 posee accesiones con hojas jóvenes de color verde claro. Las accesiones en el M4 no tienen uniformidad de fruto a diferencia del M5.

**Tabla 3.9** Características del Grupo 3: Morfotipo 4 y 5.

			
<b>Morfotipo 4</b>		<b>Morfotipo 5</b>	
Descriptor Cualitativo	Estado	Descriptor cuantitativo	Estado
Color de la rama joven	verde claro y verde oscuro	% de flores ( en la rama del año)	55,96 %
Forma del ápice de la lámina foliar	agudo e intermedio	número de semillas	25

### Continuación...

Color de las hojas jóvenes	verde claro y verde oscuro	Contenido de sólidos solubles en pulpa	23,73 °Brix
Forma de fruto	redonda, achatada, cordiforme y cónico largo	Acidez titulable	0,31 meq / 100 g
Uniformidad en el tamaño de fruto	irregular	Rendimiento	16,90 kg / árbol
Posición del ápice del fruto	central y asimétrico		
Color de la epidermis	verde claro y verde		
Resistencia a la abrasión	irregular		
Textura de la pulpa	acuoso, cremoso granular, seco y zonas duras		
Fibra en la pulpa	irregular		

### 3.1.7 Identificación de materiales promisorios

La caracterización morfoagronómica realizada en el presente estudio, ha permitido identificar posibles materiales promisorios dentro de la colección de chirimoya.

Para la selección de los materiales promisorios se tomó en consideración descriptores relacionados con producción y características de fruto que demanda el mercado nacional e internacional como son: tamaño del fruto, peso, oxidación, grados Brix, índice de semilla, tipo de piel, resistencia a la abrasión, textura de la pulpa.

Como materiales promisorios se ha identificado las siguientes accesiones: Ch11, Ch29, Ch37, Ch50, Ch99, Ch112 y Ch113. Estos materiales presentaron promedios de longitud de fruto de 91,66 mm, diámetro de fruto de 102,1 mm, peso del fruto de 542,08 g, tipo de piel impresa, textura de pulpa cremosa, sin oxidación de pulpa, 22,73 °Brix, índice

de semilla de 10,64 ; 193 días de floración a maduración de fruto, rendimiento de 62,61 kg por árbol y producción regular.

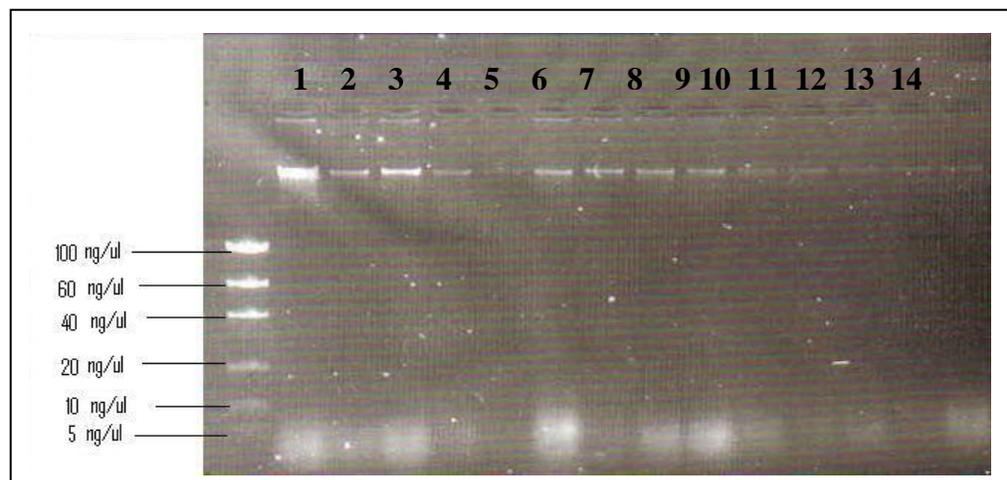
El Programa de Fruticultura del INIAP trabaja con estos materiales en la obtención de baretas para la reproducción asexual de la chirimoya, en la injertación y finalmente obtención de plantas que son vendidas al público en general.

### 3.2 Caracterización molecular

#### 3.2.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Hormaza (2006) modificado por la Ing. Doris Chalampunte (comunicación personal, 16 de agosto, 2006) para muestras secadas con sílica gel y muestras frescas. El promedio de rendimiento en la extracción de ADN fue de 4,27  $\mu\text{g}$ .

La visualización de las bandas de ADN en el gel de agarosa fue clara y de buen peso molecular como se presenta en la Figura 3.3.



**Figura 3.18** Fotografía de un gel de agarosa 1% cargado con ADN genómico de chirimoya, tomada en el Laboratorio de biología molecular de la Estación Experimental Santa Catalina - INIAP.

### **3.2.2 Productos de amplificación**

De las 126 accesiones de la colección, se trabajó con solo 95 accesiones de las cuales se tenía datos morfoagronómicos y moleculares.

Los nueve *primers* seleccionados fueron amplificados en las 95 accesiones de chirimoya. El registro de las tallas de los productos de amplificación, se obtuvo a partir de los histogramas de las muestras. El detalle de las tallas se observa en el Anexo I.

### **3.2.3 Valores de similitud**

En el Anexo J se presenta los valores de similitud entre las muestras estudiadas que varían entre 1,00 y 0,04; con un valor promedio de 0,39. Existen accesiones que tienen entre sí valores de 1.

### **3.2.4 Parámetros de Diversidad Genética**

Con la matriz de genotipos, se calcularon los parámetros de diversidad como el número de alelos por locus, frecuencias alélicas por locus, heterocigosidad esperada y observada bajo la hipótesis de equilibrio de Hardy-Weinberg y valor PIC utilizando el programa Powermarker (Liu, 2005).

#### **3.2.4.1 Número, frecuencia y tamaño de alelos**

Se registraron 53 alelos en los nueve locus analizados con un promedio de seis alelos/locus (Tabla 3.10) y tamaños de alelos de pesos entre 112 y 317 pares de bases (pb).

Los locus SSR que presentaron mayor número de alelos fueron el LMCH-48 y LMCH-69 con siete alelos cada uno a diferencia de los locus LMCH-1, LMCH-139 y LMCH-144 que presentaron cinco alelos respectivamente. El alelo de mayor frecuencia fue

el LMCH-122 (183 pb) con 0,7 en contraste con los alelos LMCH-48 (151 pb), LMCH-48 (157 pb), LMCH-69 (176 pb) y LMCH-122 (207 pb) que presentaron una frecuencia de 0,0053. Se contabilizaron de cinco a siete alelos en cada locus con una diferencia de pares de bases que fluctuó entre dos y 18.

**Tabla 3.10** Alelos registrados y sus respectivas frecuencias en 9 locus SSR en 95 muestras de chirimoya.

<b>Locus</b>	<b>Tallas encontradas (pb)</b>	<b>Frecuencia</b>
<b>LMCH-1</b>	289	0,0484
	291	0,0376
	293	0,4516
	311	0,3710
	313	0,0914
<b>LMCH-4</b>	112	0,0789
	118	0,0526
	120	0,3421
	122	0,3316
	126	0,0158
	128	0,1789
<b>LMCH-16</b>	216	0,0263
	218	0,2579
	220	0,1579
	222	0,1000
	224	0,0158
	230	0,4421
<b>LMCH-48</b>	141	0,0158
	143	0,1263
	149	0,0105
	151	0,0053
	153	0,2211
	155	0,6158
	157	0,0053
<b>LMCH-69</b>	146	0,0474
	156	0,3947
	160	0,1211
	164	0,3263
	166	0,0158
	176	0,0053
	184	0,0895
<b>LMCH-87</b>	134	0,2000
	142	0,4211
	146	0,0263
	148	0,2684
	150	0,0474

Continuación...

	152	0,0368
<b>LMCH-122</b>	177	0,0632
	183	0,7000
	189	0,1474
	193	0,0684
	207	0,0053
	211	0,0158
<b>LMCH-139</b>	299	0,5737
	301	0,0211
	305	0,0947
	311	0,0632
	317	0,2474
<b>LMCH-144</b>	175	0,5263
	189	0,0842
	195	0,0526
	197	0,2947
	203	0,0421

### 3.2.4.2 Niveles de Heterocigosidad

La riqueza alélicas media fue de seis por locus mientras que la heterocigosis observada ( $H_O$ ) fue de 0,562 y la heterocigosis esperada ( $H_E$ ) fue de 0,639. El valor de genotipos varió entre ocho y 16 con un promedio de 11. El valor PIC fue de 0,591 siendo el locus LMCH-4 que presentó mayor PIC (0,687) como se precisa en la Tabla 3.11.

**Tabla 3.11** Parámetros de diversidad genética observados en *Annona cherimola* Mill.

Locus	Mayor frecuencia de alelo	Núm. de genotipos	Tamaño de la muestra	Núm. de observaciones	Núm. de alelos	$H_E$	$H_O$	PIC
<b>LMCH-1</b>	0,452	9	95	93	5	0,646	0,602	0,582
<b>LMCH-4</b>	0,342	13	95	95	6	0,732	0,579	0,687
<b>LMCH-16</b>	0,442	12	95	95	6	0,702	0,600	0,657
<b>LMCH-48</b>	0,616	11	95	95	7	0,556	0,495	0,504
<b>LMCH-69</b>	0,395	16	95	95	7	0,713	0,663	0,666
<b>LMCH-87</b>	0,421	13	95	95	6	0,706	0,653	0,658
<b>LMCH-122</b>	0,700	9	95	95	6	0,479	0,389	0,449
<b>LMCH-139</b>	0,574	11	95	95	5	0,596	0,516	0,545
<b>LMCH-144</b>	0,526	8	95	95	5	0,624	0,558	0,568
<b>Promedio</b>	<b>0,496</b>	<b>11</b>	<b>95</b>	<b>94</b>	<b>6</b>	<b>0,639</b>	<b>0,562</b>	<b>0,591</b>

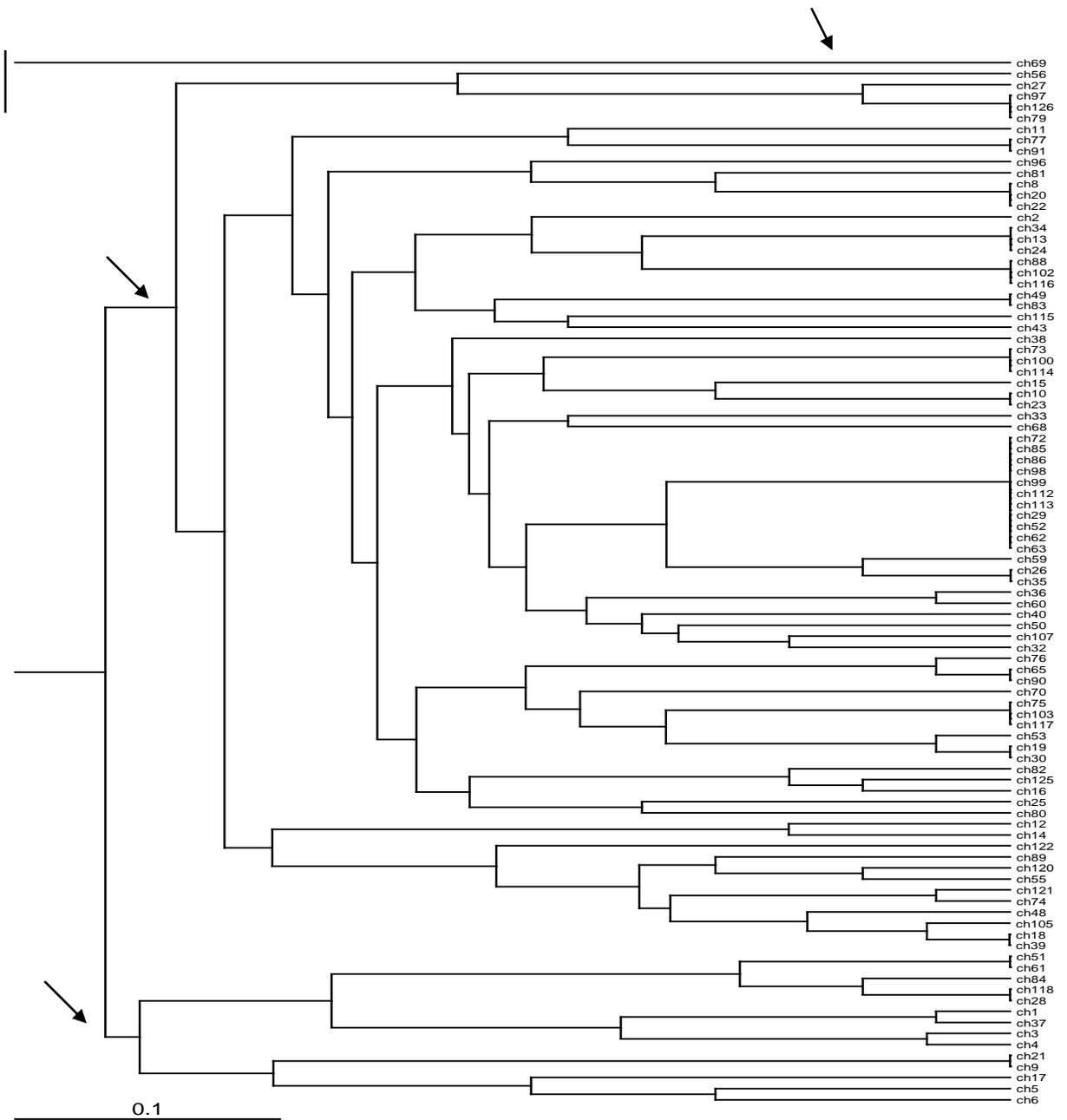
### 3.2.5 Análisis de agrupamiento

Se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método UPGMA a partir de la distancia de alelos compartidos (DAS: *Shared Allele Distance*). Un análisis de bootstrap fue establecido con 1000 repeticiones.

El dendrograma UPGMA (Figura 3.18) representa gráficamente las relaciones genéticas del germoplasma en estudio, como se puede observar no hay un agrupamiento definido de las entradas como en el caso del dendrograma morfoagronómico, ya que con los resultados del análisis de agrupamiento se ubican en un mismo *cluster* accesiones que son diferentes morfológicamente pero si se puede identificar tres *cluster*; en la parte superior se distingue una muestra única (ch69), en el centro se encuentran agrupadas la mayoría de accesiones; donde también existe varios duplicados siendo uno de los más grandes, conformado por 11 materiales (Ch62, Ch85, Ch98, Ch112, Ch29, Ch52, Ch63, Ch72, Ch86, Ch113 y Ch99) y el último *cluster* agrupa 14 materiales, en su mayoría provenientes de España (Ch51, Ch61, Ch84, Ch118, Ch28, Ch1, Ch37, Ch3, Ch4, Ch21, Ch9, Ch17, Ch5, y Ch6).

### 3.2.6 Bootstrap

Con la opción de “Consensos” del programa PHYLIP, se obtuvo un árbol de 1000 repeticiones con una sola rama robusta (1000), perteneciente a la accesión Ch69 (Zarzero) proveniente de Costa Rica.



**Figura 3.19** El dendrograma UPGMA muestra la agrupación de 95 accesiones de chirimoya a partir de la distancia de alelos compartidos (DAS). Las flechas indican los grupos formado.

### 3.2.7 Análisis de Coordenadas Principales

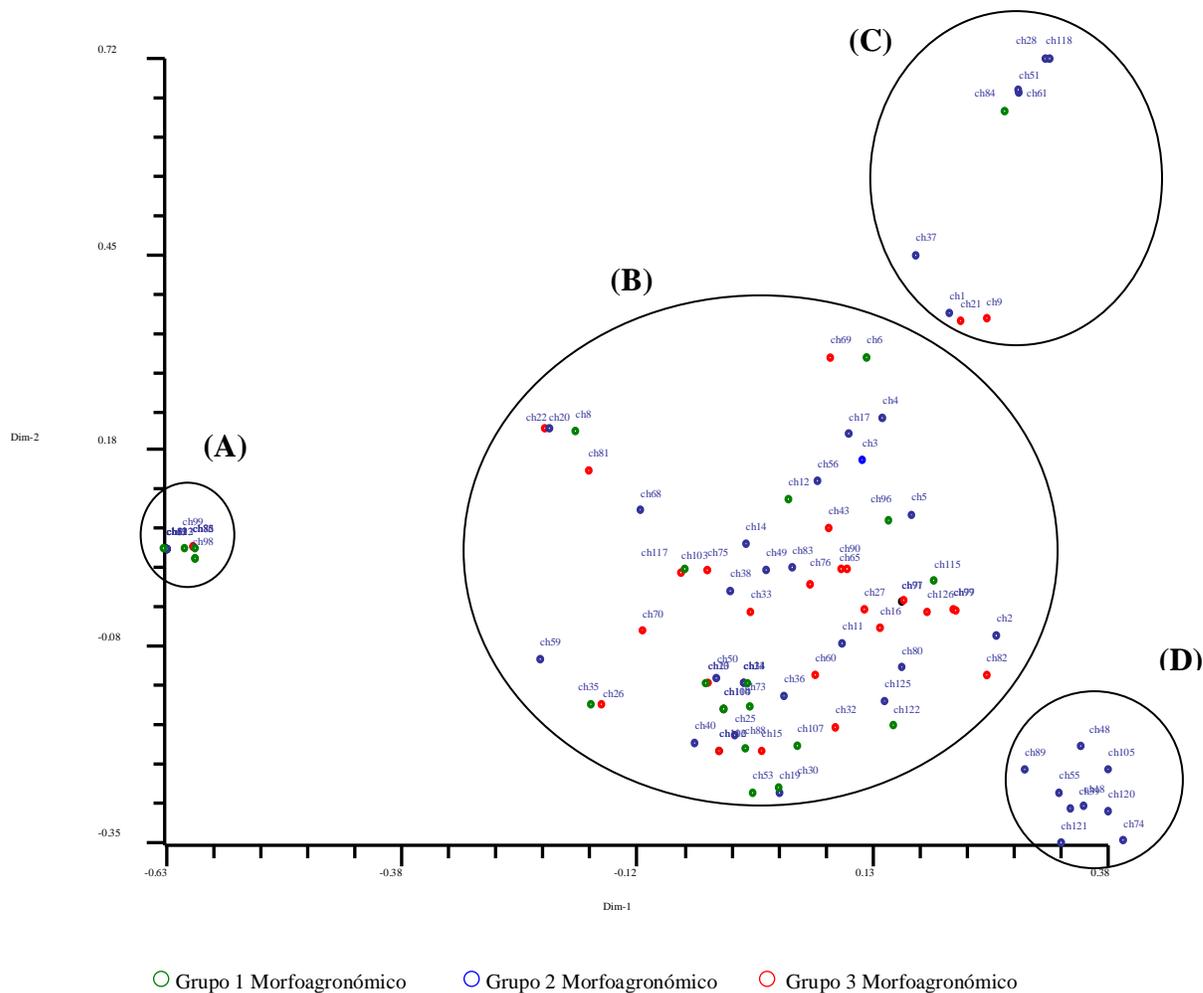
En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), se determinaron los Eigen-valores (Tabla 3.12 ), que indican el porcentaje individual y acumulado de la variabilidad de cada uno de las coordenadas obtenidas; así la primera coordenada principal incluye el 11,54% de la variabilidad total de las accesiones analizadas y la segunda coordenada principal el 8,81% de la varianza (Figura 3.19).

Este método indica cuantos factores independientes explican la diversidad total, que fracción de la diversidad es explicada y el peso de estos factores.

**Tabla 3.12** Eigen-valores, Porcentaje absoluto y acumulativo de la varianza para las coordenadas principales en el estudio de *Annona cherimola* Mill.

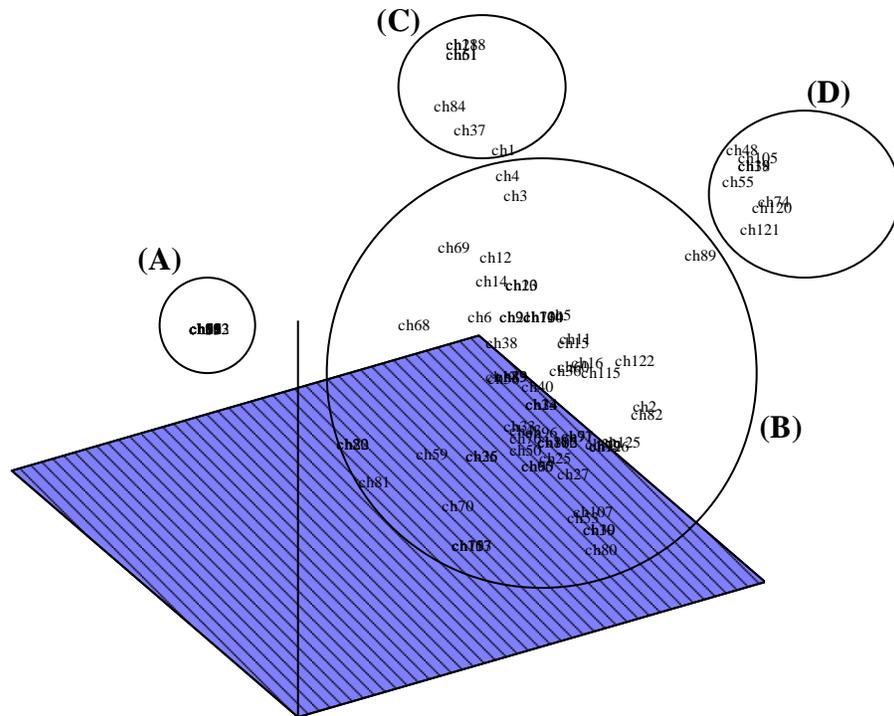
<b>Coordenada Principal (CP)</b>	<b>Valor Propio (Eigen - valor)</b>	<b>Porcentaje de residuo (%)</b>	<b>Varianza Acumulada (%)</b>
1	7,014	11,546	11,546
2	5,351	8,809	20,355
3	4,770	7,852	28,207

El grupo (A), está conformado por duplicados de la misma entrada que pertenecen en su mayoría al Grupo morfoagronómico 1; este grupo está alejado respecto a los otros tres. El grupo (B) contiene la mayoría de las entradas que formar parte de todos los grupos morfoagronómicos (1, 2 y 3). Las entradas del grupo (C) ubicado en la esquina superior derecha, provienen en su mayoría de España y tienen dos pares de duplicados. Y el grupo (D) situado en la esquina inferior derecha pertenecen al grupo morfoagronómico 2 y está formado por entradas ecuatorianas provenientes de San José de Minas, Baños, Loja, Tumbaco, Nambacola y Vilcabamba (Figura 3.19).



**Figura 3.20** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) obtenidos con las coordenadas uno y dos a partir de nueve SSR's en 95 accesiones de chirimoya (el coeficiente de similitud utilizado fue Jaccard).

La Figura 3.20 representa gráficamente, las dos primeras coordenadas y adicionalmente extrae el 7,85 % de la varianza de la tercera coordenada (Tabla 3.12), con un total de 28,2% entre las tres primeras coordenadas del conjunto de las 95 accesiones estudiadas. Los cuatro grupos descritos anteriormente se ubican en un plano tridimensional (Figura 3.20), permitiendo observar distancias entre grupos imperceptibles en el plano cartesiano.



**Figura 3.21** Visualización del análisis PCoA en tres dimensiones

### 3.3 Correlación entre marcadores morfológicos y moleculares

No existe una correlación significativa ( $r \geq 0,8$ ) entre los resultados obtenidos del análisis morfoagronómico (algoritmo de Gower) y molecular (coeficiente de Jaccard), siendo el valor de correlación según el coeficiente de Mantel,  $r = 0,04$ .

### 3.4 Identificación de duplicados y asignación de ECU

Con la utilización del software Excel Microsatellite Toolkit se identificaron 17 duplicados en la colección de chirimoya, los cuales variaron entre dos y 11 accesiones idénticas. A partir de estos datos, se realizó la asignación del código (ECU) a los genotipos conservados en la colección de chirimoya, el detalle de las accesiones se precisa en la Tabla 3.12.

**Tabla 3.13** Duplicados de las accesiones de la colección de chirimoya con el respectivo código ECU, conservados en la Granja Experimental – Tumbaco del INIAP.

No	ECU	Código campo	Ecotipo	ECU individual
1	ECU-17508	ch28	MANTECA D(a)	*
	ECU-17481	ch118	SAN JOSE DE MINAS M1(e )	*
2	ECU-17477	ch51	NEGRITO C(a)	
		ch61	NEGRITO C(b)	
3	ECU-17461	ch62	MAG TUMBACO T61(a)	
		ch85	MAG TUMBACO T61(b)	
		ch98	MAG TUMBACO T61(c )	
		ch112	MAG TUMBACO T61(d)	
		ch29	MAG TUMBACO T55(b)	
		ch52	MAG TUMBACO T55(d)	
		ch63	MAG TUMBACO T28(a)	
		ch72	MAG TUMBACO T28(b)	
		ch86	MAG TUMBACO T28(c )	
		ch113	MAG TUMBACO T28(e )	
4	ECU-174662	ch18	MAG TUMBACO T55(a)	
		ch39	MAG TUMBACO T55(c )	
5	ECU-17463	ch7	MAG TUMBACO T62(a)	
		ch40	MAG TUMBACO T62(b)	
		ch124	LOJA L5(d)	
6	ECU-17464	ch73	MAG TUMBACO T10(a)	
		ch100	MAG TUMBACO T10(b)	
		ch114	MAG TUMBACO T10(c )	
7	ECU-17465	ch64	SAN JOSE DE MINAS M5(a)	
		ch88	SAN JOSE DE MINAS M5(b)	
		ch102	SAN JOSE DE MINAS M5(c )	
		ch116	SAN JOSE DE MINAS M5(d)	
8	ECU-17466	ch19	SAN JOSE DE MINAS M3(a)	
		ch30	SAN JOSE DE MINAS M3(b)	
9	ECU-17467	ch75	SAN JOSE DE MINAS M4(a)	
		ch103	SAN JOSE DE MINAS M4(c )	
		ch117	SAN JOSE DE MINAS M4(d)	

Continuación...

10	ECU-17468	ch8	SAN JOSE DE MINAS M2(a)	
		ch20	SAN JOSE DE MINAS M2(b)	
		ch22	LOJA NAMBACOLA CHURONA L1(b)	
11	ECU-17469	ch65	SAN JOSE DE MINAS M1(a)	
		ch90	SAN JOSE DE MINAS M1(c )	
		ch104	SAN JOSE DE MINAS M1(d)	
12	ECU-17470	ch9	ESTADOS UNIDOS EU(a)	
		ch21	ESTADOS UNIDOS EU(b)	
13	ECU-17471	ch77	LOJA GRANJA MAG L4(a)	
		ch91	LOJA GRANJA MAG L4(b)	
14	ECU-17472	ch10	LOJA NAMBACOLA CHURONA L1(a)	
		ch23	LOJA CANCHINOMACA GONZAMANA L2(b)	
15	ECU-17473	ch55	LOJA CANCHINOMACA GONZAMANA L2(e )	
		ch95	LOJA L5(b)	
16	ECU-17479	ch79	LOJA NAMBACOLA JOSEFA N7(b)	*
	ECU-17478	ch97	BRONCE SUAVE M(a)	
		ch126	BRONCE SUAVE M(c )	
17	ECU-17474	ch13	TUMBACO-CANGAHUA TC 11(a)	
		ch24	TUMBACO-CANGAHUA TC 11(b)	
		ch34	TUMBACO-CANGAHUA TC 11(c )	
18	ECU-17475	ch26	PERUCHO PICHINCHA DELICIOSA D4(b)	
		ch35	PERUCHO PICHINCHA DELICIOSA D4(c )	
19	ECU-17476	ch49	PERUCHO PICHINCHA DELICIOSA D4(d)	
		ch83	PUELLARO PICHINCHA JARAMILLO J1	
20	ECU-17480	ch115	MAG TUMBACO T65(d)	*
21	ECU-17482	ch120	LOJA SAN PEDRO VILCABAMBA (hoja pequeña) L3(d)	*
22	ECU-17483	ch121	LOJA NAMBACOLA JOSEFA N7(d)	*
23	ECU-17484	ch122	LOJA NAMBACOLA N10 (d)	*
24	ECU-17485	ch125	PAUTE - CUENCA P3(d)	*
25	ECU-17486	ch105	LOJA GRANJA MAG L4(c )	*

**Continuación...**

26	ECU-17487	ch107	LOJA NAMBACOLA N10 (c )	*
27	ECU-17488	ch84	FINO DE JETE B (b)	*
28	ECU-17489	ch89	SAN JOSE DE MINAS M4(b)	*
29	ECU-17490	ch96	PAUTE - CUENCA P3(b)	*
30	ECU-17491	ch74	MAG TUMBACO T65(a)	*
31	ECU-17492	ch76	SAN JOSE DE MINAS M1(b)	*
32	ECU-17493	ch80	LOJA NAMBACOLA N10 (a)	*
33	ECU-17494	ch81	Loja L5 (a)	*
34	ECU-17495	ch82	PAUTE - CUENCA P3(a)	*
35	ECU-17496	ch68	TUMBACO-CANGAHUA TC 13(a)	*
36	ECU-17497	ch69	ZARZERO R	*
37	ECU-17498	ch70	CONCHA LISA J(b)	*
38	ECU-17499	ch53	SAN JOSE DE MINAS M3(d)	*
39	ECU-17500	ch56	CHIUNA 4 Q(b)	*
40	ECU-17501	ch59	PERUCHO PICHINCHA DELICIOSA D4(e )	*
41	ECU-17502	ch60	PUELLARO PICHINCHA FABULOSA F3(d)	*
42	ECU-17503	ch37	MANTECA D(b)	*
43	ECU-17504	ch38	MAG TUMBACO T69	*
44	ECU-17505	ch43	SAN JOSE DE MINAS M2(c )	*
45	ECU-17506	ch48	BAÑOS (c)	*
46	ECU-17507	ch50	PUELLARO PICHINCHA FABULOSA F3(c )	*
47	ECU-17509	ch32	LOJA CANCHINOMACA GONZAMANA L2(c )	*
48	ECU-17510	ch36	PUELLARO PICHINCHA FABULOSA F3(b)	*
49	ECU-17511	ch17	BONITA E	*
50	ECU-17512	ch25	BAÑOS (b)	*
51	ECU-17513	ch27	PUELLARO PICHINCHA FABULOSA F3(a)	*
52	ECU-17514	ch11	LOJA CANCHINOMACA GONZAMANA L2(a)	*
53	ECU-17515	ch14	BAÑOS(a)	*
54	ECU-17516	ch15	PERUCHO PICHINCHA DELICIOSA D4(a)	*
55	ECU-17517	ch16	CONCHA LISA J(a)	*
56	ECU-17518	ch1	CHAFFEY Ch(a)	*
57	ECU-17519	ch2	CHAFFEY Ch(b)	*

### Continuación...

58	ECU-17520	ch3	WHITE G(a)	*
59	ECU-17521	ch4	WHITE G(b)	*
60	ECU-17522	ch5	BOOTH H(a)	*
61	ECU-17523	ch6	BOOTH H(b)	*
62	ECU-17524	ch12	OTT I	*
63	ECU-17525	ch33	CORAZON K	*

 No caracterizado morfoagronómicamente

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN

#### 4.1 Caracterización Morfoagronómica

De un total de 126 plantas sólo 97 fueron caracterizadas morfoagronómicamente debido a que las restantes, no tuvieron flores o frutos que brindaran los datos suficientes para realizar el estudio. Entre las accesiones no caracterizadas se produjo la muerte de una accesión (Ch41) en el mes de mayo del 2006, debido a un ataque de termitas.

Los descriptores con mayor variación en la presente evaluación fueron: Número de flores por metro en la rama del año anterior, Porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año, longitud y anchura de la lámina foliar, longitud y ancho del pétalo, peso del fruto, peso de la epidermis, resistencia al penetrómetro, peso de las semillas, número de semillas, contenidos de sólidos solubles en la pulpa, acidez titulable y rendimiento. La alta variación observada posiblemente fue influenciada por factores ambientales y de manejo agronómico presentes en el transcurso de la investigación (Tabla 3.1).

La variación en el porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año anterior, según se pudo observar, depende del ecotipo y de la poda realizada en estas plantas. En este caso fue poda de fructificación, que es la más recomendada para obtener una fuerte producción, además, es necesario por infestaciones e infecciones suprimir los brotes del año anterior (Viteri *et al.*, 2004).

Con respecto al porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año, hubo árboles que a pesar de tener gran cantidad de brotes, no todos fueron florales ya que también hubo brotes vegetativos y mixtos.

La longitud y anchura de la lámina foliar está influenciada por el ecotipo y la posición de las hojas con respecto a la rama. Según Agustín (2004); las hojas de los cultivares de chirimoya, se diferencian principalmente por el área foliar (longitud y anchura de la lámina foliar) y la longitud de pecíolo, estas variables son las más estables en hoja y aportan la mayor variabilidad de este órgano y esta especie. Así, la hoja de la chirimoya puede ser caracterizada para fines de identidad de selecciones y cultivares.

La longitud y ancho del pétalo, definido por Agustín (2004) como la relación eje medio/eje longitudinal de pétalo, el peso de fruto y la resistencia al penetrómetro, tienen una alta variación que permite que estos descriptores sean discriminantes y utilizados para diferenciar cultivares de chirimoya.

De los caracteres señalados, la mayoría son independientes, siendo el área foliar y los sólidos solubles totales los más susceptibles a ser afectados por el ambiente, pero si el cultivo de los individuos a caracterizar se realiza en condiciones edafoclimáticas homogéneas, se produce la reducción de estos problemas (Agustín, 2004).

El peso de la epidermis también fue determinado por el ecotipo, se observó que el ecotipo San José de Minas M4 tuvo frutos con una epidermis de peso de hasta 212, 30 g y de un grosor de hasta 3,3 mm, lo que evita el ataque de mosca, ideal porque la mosca de la fruta, no puede penetrar una epidermis tan gruesa, pero el problema radica que al ser muy gruesa la cáscara del fruto, no se detecta el punto de maduración fisiológica para la cosecha y provoca que se cosechen frutos ligeramente duros por fuera pero podridos por dentro.

Los descriptores de peso y número de las semillas tienen alta variación debido tal vez a la aplicación de la polinización manual, que provoca el aumento del número de semillas por fruto cuando existe una polinización mayor a 400 flores por árbol (González y Cuevas, 2006). Van Damme citado por Morales (2004), obtuvo el índice de semillas, donde el valor óptimo es igual o menor a siete, así se observó en el presente estudio, que el 28% de las accesiones presentaron un valor menor a siete semillas por cada 100 g; el 67% valores entre siete y 14 y el 5% restante presentó índices mayores a 14.

Según Lozada (2000), no existe relación entre la acidez titulable y los SST por tal razón, el sabor astringente es predominante en algunos ecotipos, siendo el equilibrio entre estos factores determinante para el pH de la fruta.

Según Agustín (2004), el sabor de la chirimoya está determinado en gran medida por el balance de la concentración de azúcares ( $^{\circ}$  Brix) y la acidez titulable. Los sólidos solubles totales (SST) varían entre 14 y 30  $^{\circ}$ Brix y la acidez titulable entre 1.3 y 5.3. En este estudio la acidez titulable estuvo entre 0,08 y 1,3 lo cual está muy debajo de lo obtenido por el estudio señalado anteriormente, pero con respecto al sabor de la pulpa presentó todos los estados, por lo que no coincide con el estudio en comparación.

La acidez titulable en el estudio realizado por Sosa (2006) se encuentra en un rango entre 0,16 y 0,53; los grados  $^{\circ}$ Brix entre 14 y 23,8; lo que corrobora que el presente estudio se encuentra dentro de los rangos establecidos.

El descriptor de acidez titulable depende de cada cultivar, lo que probablemente puede estar determinado por su carácter genético, aunque las condiciones ambientales pueden afectar este carácter (Hermoso-González *et al.*, 1999). Tal vez hubo cierta incidencia del pH en la acidez titulable ya que dicho carácter está influenciado por el período de cosecha, en este caso los frutos cosechados bajo el criterio de cambio de color

en la epidermis de verde oscuro a verde claro, como signo de madurez fisiológica. Al no tener la madurez óptima pero si el color, tal vez se fueron cosechados como frutos listos, sin saber que poseían un alto grado de pH.

El rendimiento por árbol tiene un alto coeficiente de variedad, ya que en algunos árboles a pesar de tener gran cantidad de flores, solo el 30% de las flores cuajaron una vez polinizadas, además algunas plantas presentan un comportamiento abortivo floral lo que disminuye la cantidad de flores y consecuentemente el número de frutos.

De los 33 descriptores cualitativos evaluados, 10 resultaron ser de alto poder discriminante: Color de la rama joven, Forma del ápice de la lámina foliar, Color de las hojas jóvenes, Uniformidad en el tamaño de los fruto, Posición del ápice del fruto, Fibra en la pulpa, Forma de fruto, color de la epidermis, Resistencia a la abrasión y Textura de la pulpa, coincidiendo con algunos descriptores discriminantes señalados por Bioiversity (2008), que constituyen variables útiles para la descripción de germoplasma, y son herramientas importantes para futuros trabajos de mejoramiento.

De los diez caracteres discriminantes altamente significativos según la prueba de Chi cuadrado, los descriptores: forma del ápice del fruto, fibra en la pulpa, uniformidad en el tamaño de fruto, color de la epidermis del fruto, resistencia a la abrasión, textura de la pulpa y forma del fruto, son de importancia comercial, ya que pueden ser tomados en cuenta para establecer parámetros en la calidad de fruta, para el consumidor final.

En los caracteres cuantitativos, los valores “D” estuvieron entre 1 y 0,33. Los descriptores: peso de la flor y peso del pétalo tuvieron valor 1 pero dichos descriptores no poseen una importancia morfoagronómica relevante, por ello se tomó a los descriptores con valor 0,33 (Porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año, Número de

semillas, Contenido de sólidos solubles en la pulpa, Acidez titulable, y Rendimiento) como los descriptores cuantitativos de mayor importancia (Tabla 3.5).

Según Brito (*et al.*, 2006), el contenido de grados Brix óptimo es entre  $21,06 \pm 1,95$ ; en la presente investigación se obtuvo que el 59% de las accesiones se ubicaron en dicho rango mientras que el 8% de las accesiones presenta valores más bajos, siendo los menos apetecibles; por otro lado el 33% restante presenta valores superiores al promedio óptimo.

Si se compara el descriptor peso de fruta con el estudio realizado por Morales (2004), donde se utilizó una tabla de calibre de exportación para la Unión Europea, se observa que el 62,9% de las accesiones son calibre Súper Extras (SE), el 19,6% son calibre Extra (E), el 12,4% son calibre Primera A (1ª A), mientras que el 5,2% restante son calibre Primera B (1ª B).

Cabe resaltar en este estudio, que el elevado número de caracteres de todas las partes de la planta (tallo, hojas flores y frutos) de un total de 65 descriptores tanto cualitativos como cuantitativos en la caracterización morfoagronómica, permitió mayor robustez que los estudios basados en uno o pocos caracteres.

Las accesiones promisorias obtenidas fueron siete, pero según el análisis molecular, las accesiones ch29, ch99, ch112 y ch113 son plantas idénticas que representan al ECU-17461 (Tabla 3.13), lo que reduce la cantidad de cuatro materiales promisorios.

## 4.2 Caracterización Molecular

En la parte molecular, dos accesiones (Ch42 y Ch71) presentaron resultados ambiguos en las tallas de amplificación, por ello no fueron tomadas en cuenta. Se evaluaron 95 accesiones, el total de individuos utilizados, que poseían información tanto morfoagronómica como molecular.

La presencia de alelos con baja frecuencia es el resultado de hibridaciones seguidas de introgresiones (Broyles & Wyatt, 1993). En este caso se encontró que los alelos: LMCH-48 (151 pb), LMCH-48 (157 pb), LMCH-69 (176 pb) y LMCH-122 (207 pb) tuvieron una frecuencia de 0,0053.

Cuando  $H_o$  es menor a  $H_e$  se produce debido: a) la presencia de alelos nulos que provoca que aparentes homocigotos sean heterocigotos, b) cruce de individuos genéticamente cercanos, c) manipulación de variedades provocado por domesticación y d) movimiento restringido de genes (Lozada, 2000). En este estudio el  $H_o$  tuvo un valor de 0,562 y el  $H_e$ , un valor de 0,639.

EL dendograma UPGMA (Figura 3.18) y el Bootstrap de 1000 repeticiones, separan a la accesión ch69 (Zarzero), que posee alelos distintos a los demás y se ubica en un *cluster* asilado. La muestra ch69 posee dos alelos exclusivos: LMCH-48 (149 pb) y LMCH-69 (176 pb) que lo diferencian del resto.

También se observa en el dendrograma otros dos *cluster*: el primero formado por la mayoría de las accesiones y el otro por 14 accesiones ecuatorianas, que se asemeja a lo reportado por Chalampunte (2008) en un estudio similar, donde tampoco existe una estructura genética robusta.

En la parte inferior del dendrograma UPGMA, ubicado en el capítulo III de Resultados (Figura 3.18), se observa la agrupación de 14 accesiones ecuatorianas, las mismas que en el PCoA, ubicado en el capítulo III de Resultados (Figura 3.19) forman el grupo (C), debido tal vez a la diferencia entre algunos alelos, que provocan la separación de este grupo en el espacio cartesiano.

Los porcentajes de varianza extraídos de las coordenadas uno y dos ( 11, 54% y 8,81%), tienen similares resultados a los obtenidos por Barreiro (2007), que reporta 13,47% en la coordenada uno y 8,52% en la coordenada dos, en el estudio con chirimoyas cultivadas y semicultivadas de la provincia de Loja.

Por lo tanto, la heterocigosis que exhibe la chirimoya es tal vez consecuencia de la conducta floral de dicogamia protogínica y la manipulación humana (polinización manual) que promueve la variación a través de la combinación genética (selección).

La obtención de duplicados a partir de la similitud entre los alelos de cada una de las accesiones, coincide con la identificación en campo, salvo algunas excepciones como las accesiones: ch28 (Manteca D [a]) y ch118 (San José de Minas M1 [e]), las cuales morfológicamente son diferentes. Tal vez existió un error de etiqueta de las muestras que ocasionó dicho resultado (Tabla 3.13).

Cabe resaltar que aunque existe duplicados de algunos ecotipos que son molecularmente iguales, a veces no se encuentran dentro de los mismos grupos morfoagronómicos, debido a que si bien, el ambiente puede influir en las características fenotípicas haciendo que existe una variación entre duplicados del mismo ecotipo y produjo que se hayan agrupado accesiones similares en características morfoagronómicas, esto no

influye en la parte molecular, la cual nos brinda una información puntual y veraz sobre las accesiones en estudio.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

En el aspecto externo de la planta, no presenta mayor diferencia salvo en el color de las hojas jóvenes y color de la rama joven, pero la posición del ápice del fruto, la uniformidad en el tamaño de los frutos, el color de la epidermis del fruto, la resistencia a la abrasión y la forma del fruto, constituyen la estructura más importante en la planta para la descripción sistemática y diferenciación preliminar entre grupos, en donde se observa la variabilidad en las diferentes accesiones estudiadas en esta especie.

De los 33 descriptores cualitativos evaluados, 10 resultaron ser de alto poder discriminante: Color de la rama joven, Forma del ápice de la lámina foliar, Color de las hojas jóvenes, Uniformidad en el tamaño de los frutos, Posición del ápice del fruto, Fibra en la pulpa, Forma de fruto, color de la epidermis, Resistencia a la abrasión y Textura de la pulpa, coincidiendo con algunos descriptores discriminantes señalados por Bioiversity (2008), constituyendo variables útiles para la descripción de germoplasma, y herramientas importantes para futuros trabajos de mejoramiento.

De los 32 descriptores cuantitativos evaluados, en el presente estudio dos fueron altamente discriminantes (peso de la flor y peso del pétalo) y ocho discriminantes (ancho de pétalo, porcentaje de flores que ocurren en brotes de la rama del año, número de venas primarias en el haz, longitud de pedúnculo, número de semillas, contenidos de sólidos solubles en la pulpa, acidez titulable y rendimiento), pero los dos altamente discriminantes fueron de poca importancia ya se refieren tan solo a la flor, entonces los ocho discriminantes pueden ser usados para estudios posteriores.

Mediante la distancia de Gower (1967) y el análisis multivariado jerárquico de Ward (1963) se pudo establecer la existencia de tres grupos dentro de la colección de chirimoya.

Mediante esta investigación se logró estudiar la variabilidad genética existente en la colección de germoplasma de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) del INIAP, obteniendo la identificación de cinco morfotipos, cada uno con caracteres específicos.

Con los procesos de caracterización morfológica utilizados se pudo obtener cuatro posibles materiales promisorios (ECU-17464, ECU-17503, ECU-17507 y ECU-17514) por sus características óptimas como longitud, ancho y peso de fruto, textura y oxidación de pulpa, grados °Brix tipo de epidermis impresa, las cuales se pueden utilizar en programas de fitomejoramiento.

Existe diversidad genética en la chirimoya. El  $H_o$  y el  $H_e$  son buenos indicadores de diversidad, siendo las accesiones de chirimoya, heterocigotas en un 60% de sus locus. Además el valor PIC de 0,59 muestra que las chirimoyas son moderadamente polimórficas.

La baja variabilidad se debe a que las distancias genéticas identificadas en los dendrogramas morfoagronómico y molecular son cercanas

La falta de correlación entre la caracterización morfoagronómica y molecular ( $r=0,04$ ) se debe principalmente a la variación morfoagronómica presente en la población.

La colección del INIAP posee 63 genotipos que representan la colección núcleo de chirimoya, las cuales ahora poseen un código ECU, que permite su mejor identificación en campo o si fuera el caso, en el banco de germoplasma.

## **CAPÍTULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

Se debe realizar una nueva evaluación morfoagronómica en aquellos caracteres que presentaron altos coeficientes de variación para validar los datos obtenidos en el presente estudio.

Las semillas, producto de la caracterización de los frutos, deben ser conservadas hasta un año después de la extracción fuera del fruto y pasar por procesos de monitoreo de viabilidad de la semilla para su ingreso al banco de germoplasma.

Con la información molecular generada se podría en un mediano plazo, definir estrategias de ampliación de la base genética mediante utilización de accesiones silvestres.

Se debe desarrollar investigaciones en la producción de plántulas *in vitro* o en invernadero reproducidas de forma asexual, las cuales conservan los rasgos deseables de la planta progenitora para desarrollar plantas con características de calidad.

## CAPÍTULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

#### TEXTOS:

Abascal, F. (2006). Introducción a la filogenia Molecular. Resumen de la presentación. Centro Nacional de Biotecnología. Madrid. 3-4.

Cruz, E. (2002). Cultivo de Anona [CD-ROM]. CENTA. San Salvador. 10.

Enríquez, G. (1991). Descripción y evaluación de los recursos genéticos. *In: Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales.* Castillo, R.; Estrella, J.; Tapia, C. eds. Quito: Editorial Porvenir. 116-160.

Ferreira, M., y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: EMBRAPA-Cenargen. 55 – 62.

González, M., y Cuevas, J. (2006) *Cantaridofilia en Annona cherimola ¿Puede el hombre hacerlo mejor que el escarabajo en la polinización del chirimoyo?.* Segundas Jornadas de Polinización en plantas Hortícolas. Almería. 16 .

Guirado E., Hermoso, J. M., Pérez, M. A., y Farré, J. M. (2004). Introducción al cultivo del chirimoyo. Granada. 7.

León, J., y Herrera, G. (2006). Manual de Cultivo de Chirimoya. Tumbaco. 21-23.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2002). Biología Celular y Molecular. Madrid: Médica Panamericana. 246.

Martín, L. (1993). Descripción pomológica y análisis de componentes del fruto en la colección de cultivares de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill). Sevilla. 56

Mendoza - Herrera, A., y Simpson, J. (1996). Uso de marcadores moleculares en la agronomía. Avances y Perspectivas. Irapuato: CINVESTAV. 53-57.

Morillo, E. (2002). Protocolos de Marcadores Moleculares. Estación Experimental Santa Catalina. 22-23.

Pinto, A. C de Q., Cordeiro, M. C. R., de Andrade, C. R. M., Ferreira, F. R., Filguiera, H. A. de C., Alves, R. E., & Kinpara, D. I., (2005). Annona Species [CD-ROM]. University of Southampton. 70.

Rosell, P. (2001). Cultivo de Chirimoyo en Canarias [CD-ROM]. Canarias. p 3.

Sevilla, R., y Holle M. (2004). Recursos Fitogenéticos Vegetales. Luís León Asociados Editores. Lima: Azul. 283.

Universidad Católica de Valparaíso (UCV). (1988). Proyecto “Estudio de técnicas de conservación y comercialización de chirimoya para exportación”. Informe final Convenio de Investigación. Facultad de Agronomía: Autor. Quillota. 23 -26

Wolf, K. (1998). Natural selection in *Plantado* species: a genetical analysis of Groningen. The Netherlands. 15.

## **REVISTAS CIENTÍFICAS**

Alstad, D., Hotchkiss, S., & Corbin, K. (1991). Gene flow estimates implicated selection as a cause of scale insect population structure. Evolutionary Ecology, 5, 88-92.

Brito, B., Rodríguez, M., Samaniego, I., Jaramillo, M., Vaillant, F. (2006). Characterising polysaccharides in chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) pureé and their enzymatic liquefaction. European Food Research and Technology, 1, 62 -66.

Broyles, S. B., & Wyatt, R. (1993). Allozyme diversity and genetic structure in southern Appalachian population of poke milkweed, *Asclepias exaltata*. Systematic Botanic, 18(1), 18-30.

Cautín, R., & Agustí, M. (2005). Phenological growth stages of the cherimoya tree (*Annona cherimola* Mill.). Scientia Horticulturae, 105, 491-497.

Creste, S., Tulmann, N., Figueira, A. (2001). Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining. Plant Molecular Biology Report, 19, 299-306.

Cochran, W. (1954). Some methods for strengthening the common  $X^2$  tests. Biometrics, 10, 417-451.

Ellstrand, N.C., & Lee, J. M. (1987). Cultivar identification of *cherimoya* (*Annona cherimola* Mill.) using isozyme markers. Scientia Horticulturae, 32, 25-31.

Escribano, M. P., Viruel, M. A., y Hormaza, J. I. (2003). Desarrollo y aplicación de microsatélites en chirimoyo. X congreso Nacional de Ciencias Hortícolas. Mejora Genética. Acta de Horticultura No 39.

Engels, J. (1983). A systematic description of cacao clones.1. The discriminative value of quantitative characteristics. Euphytica, 32, 387-396.

Farré, J. M., Hermoso, J. M., y Guirado, E. (1999). Técnicas de cultivo del chirimoyo en España. En Primer Simposio Internacional sobre Chirimoya. Acta Horticultural No 497, 105-108.

Felsenstein J, (1993). PHYLIP (phylogeny Inference Package) Version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington.

Gower, J. (1967). A comparison of some methods of cluster analysis. Biometrics, 23, 623-637.

Hermoso-González, J. M., Pérez De Oteyza, M. A., Ruiz-Nieto, A., Farré-Massip, J. M. (1999). El banco español de germoplasma de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Acta Horticulturae, 497, 239-253.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K. V., Ayad, W. G., & Hodgkin, T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin, N° 2, 47

Kikuchi, S., & Isasi, Y. (2002). Microsatellite genetic variability in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* spp japonica. Nature: Heredity, 88, 313–321.

Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. Cancer Res, 27, 209-220.

Morales, R., Cueva, B., y Aquino, S. (2004). Diversidad genética y distribución geográfica de la chirimoya *Annona cherimola* Mill en el Sur de Ecuador. Lyona: A Journal of ecology and application, 7(2), 162.

Morales, R., Medina, A., Criollo, L., Castro, P. (2006). Interpretive results in the inheritance of some characters of quality of the fruit of the Cherimoya (*Annona cherimola* Mill [CD-ROM]).

Nava-Díaz, C., Osada-Kawasoe, S., Rendón-Sánchez, G., y Ayala-Escobar, V. (2000). Organismos asociados a chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) en Michoacán, México. Agrociencia, 34, 217-226.

Pascual, L., Perfectti, F., Gutiérrez, M., & Vargas, A. M. (1993). Characterizing isozymes of Spanish cherimoya cultivars. HortScience, 28, 845-847.

Perfectti, F., & Pascual, L. (1998). Characterization of cherimoya germplasm by isozyme markers. Fruit Varieties Journal, 53, 53-62.

Rahman, M. S. M., Shimada, T., Yamamoto, T., & Yoshida, M. (1998). Genetical diversity of cherimoya cultivars revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis. Breeding Science, 18, 5-10.

Ronning, C. M., Schnell, R. J., & Gazit, S. (1995). Using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify *Annona* cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 120, 726-729.

Scheldeman, X., Ureña, V., & Van Damme, P. (1999). Collection and characterization of cherimoya (*Annona cherimolla* Mill) in Loja Province, southern Ecuador. Proceedings of the First Internacional Symposium on cherimoya [CD-ROM].

Scheldeman, X., Van Damme, P., & Ureña J. V. (2002). Improving cherimoya (*Annona cherimola* Mill) cultivation exploring its center of origin. *Acta Horticulturae*, 575.

Scheldeman X, Ureña J, Van Damme, V., & Van Damme, P. (2003). Potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill) in southern Ecuador [CD-ROM]. *Lyonia*, 5(1), 81-90.

Van Damme, J., & Scheldeman, X. (1999b). Promoting cultivation of cherimoya in Latin America. *Unasylya* 198, 50, 43.

Ward, J. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 236-244.

Whitlock, M., McCauley, D. (1999). Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{st} \neq 1/(4Nm+1)$  [CD-ROM].

## **FUENTES ON LINE**

Agencia de Servicios Agropecuarios/Ministerio de Agricultura y Ganadería (SICA/MAG). (2006a). Estimación de la Producción (TM) – 2001. Región Sierra. Extraído el 28 de abril, 2006, de [http://www.sica.gov.ec/agro/docs/pr\\_sf\\_2001.htm](http://www.sica.gov.ec/agro/docs/pr_sf_2001.htm).

SICA/MAG. (2006b) Estimación de la Producción (TM) – 2002. Región Sierra. Extraído el 28 de abril, 2006, de <http://www.sica.gov.ec/agro/docs/CUADRO6%202002.htm>.

SICA/MAG. (2006c) Estimación de la Producción (TM) – 2003. Región Sierra. Extraído el 28 de abril, 2006, de <http://www.sica.gov.ec/agro/docs/CUADRO6%202003.htm>.

SICA/MAG. (2006d) Estimación de la Producción (TM) – 2006. Región Sierra. Extraído el 28 de abril, 2006, de [http://www.sica.gov.ec/agro/docs/CUADRO6ecuador\\_estimaci%C3%B3n\\_de\\_la\\_produccion%202006.htm](http://www.sica.gov.ec/agro/docs/CUADRO6ecuador_estimaci%C3%B3n_de_la_produccion%202006.htm)

Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicación en frutales del trópico. Extraído el 19 de septiembre, 2007, de [http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia\\_Mesoamericana/Vol.%2017\(2\)%202006/re\\_v\\_bibliografica/Azofeifa-marcadores.pdf](http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia_Mesoamericana/Vol.%2017(2)%202006/re_v_bibliografica/Azofeifa-marcadores.pdf)

Beerli, P. (2003). Estimation of migration rates and population sizes in geographically structured populations. University of Washington – USA. Extraído el 12 de octubre, 2008, de <http://evolution.genetics.washington.edu/PBhtmls/NATO/PBChap.pdf>

Cherla, (2006). Resumen: Autor. Extraído el 21 de febrero, 2007, de <http://www.cherla.com/introduccion.shtml>

Dobrowolsky, M. (2002). Three clonal lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia revealed by Microsatellites. Extraído el 2 de febrero, 2008, de [www.apsnet.org/phyto/pdfs/2003/0408-01R.pdf](http://www.apsnet.org/phyto/pdfs/2003/0408-01R.pdf)

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. (2003). Guía de Consultas Botánica II. Extraído el 13 de junio, 2007, de <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/3.%20Anonnaceae.pdf>

Figueras, S. (2000). Introducción al Análisis Multivariante. Extraído el 24 de diciembre, 2006, de <http://www.5campus.com/leccion/anamul>

He, G., Meng, R., Newman, M., Gao, G., Pittman, N. R., & Prakash, C. S. (2003). Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). Bio Med Center Plant Biology. Extraído el 23 de mayo, 2008, de <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/3>

Instituto Nacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). (2002). EL IPGRI en las Américas. Informe Regional 1999 – 2000: Autor. Extraído el 16 de abril, 2006, de [http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pubsurvey.asp?id\\_publication=782](http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pubsurvey.asp?id_publication=782)

IPGRI, Cornell University, (2003a). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje: Autor. Extraído el 24 de enero, 2007, de [http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-1/MolMarkers\\_es/PDF/VOL1/I.Introduccion.pdf](http://www.ipgri.cgiar.org/Training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/I.Introduccion.pdf)

IPGRI, Cornell University. (2003b). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje: Tecnologías basadas en el ADN. Extraído el 25 de enero, 2007, de [http://www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers\\_es/PDF/VOL1/IV.4.STS.pdf](http://www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.4.STS.pdf)

Jordano, P. (2000). Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación de especies. Extraído el 17 de marzo, 2008, de <http://ebd10.ebd.csic.es/pdfs/resumen.pdf>

Owens K, 2003. Genetic diversity of *Annona cherimola* Mill in South Bolivia. Extraído el 27 de septiembre, 2007, de <http://peacecorps.mtu.edu/people/1999/owensKristina.pdf>

Page, R. (2001). TreeView 1.6.1.6. Extraído el 25 de agosto, 2008, de <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>

Perera, L., Rusell, J. R., Provan, J., & Powell, W. (1999). Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). Extraído el 16 de marzo, 2007, de [http://article.pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ppv/RPViewDoc?\\_handler\\_=HandleInitialGet&articleFile=g99-079.pdf&journal=gen&volume=43](http://article.pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ppv/RPViewDoc?_handler_=HandleInitialGet&articleFile=g99-079.pdf&journal=gen&volume=43)

Roca, W., y Ramírez, H. (1999). Introducción a la biotecnología vegetal. Curso de mejoramiento molecular de plantas. CIAT, Octubre 4-29. Extraído el 25 de noviembre, 2006, de <http://www.monografias.com/trabajos19/musaceas/musaceas.shtml>

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, 2003. Guía de Consultas Botánica II (UNNE): Autor. Extraído el 18 de agosto, 2007, de <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/3.%20Anonnaceae.pdf>

Universidad de Navarra (UNAV). (2008). Glosario de términos de genética: Autor. Extraído el 18 de agosto, 2008, de <http://www.unav.es/genetica/glosarioOQ.html>

University of California. (2008). Agriculture and Natural Resources: Autor. Extraído el 22 de mayo, 2008, de <http://ceventura.ucdavis.edu/Agriculture265/Cherimoya.htm>

Van Damme, P y Scheldeman, X. (1999c). Fomento del cultivo de la chirimoya en América Latina. Revista internacional de silvicultura e industrias forestales. Dirección de Información, FAO, Viale delle Terme di Caracalla. Consultado el 26 de septiembre, 2007, de <http://www.fao.org/docrep/x2450s/x2450s09.htm>

Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2003). Development, characterization and analysis of microsatellites in lychee (*Litchi chinensis* Sonn., Sapindaceae). Extraído el 9 de agosto, 2008, de <http://www.springerlink.com/content/tan33heegx1tmwru/>

Wikipedia (2008). Wahlund effect. Extraído el 28 de agosto, 2008, de [www.wikipedia.org/wiki/Wahlund\\_effect](http://www.wikipedia.org/wiki/Wahlund_effect)

## TESIS

Barreiro, J. M. (2007). Evaluación de la diversidad de *Annona cherimola* en la provincia de Loja. Tesis de Licenciatura. PUCE. Quito – Ecuador. p 29.

Cholota, N., y Quito, C. (1999). Estudio de la vida útil de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola*) mínimamente procesada. Tesis de Ingeniería en Alimentos, UTA. Ambato – Ecuador. 2 – 20.

García, K. (2008). Estudio de la diversidad genética de *Phaseolus lunatus* L. en zonas silvestres y cultivadas en la provincia de Imbabura – Ecuador mediante el uso de microsatélites. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí – Ecuador. p 41.

Lozada, T. (2000). Caracterización de la diversidad genética de una colección de variedades amazónicas de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz). Tesis de licenciatura en Ciencias Biológicas. PUCE. Quito – Ecuador. 23,26,35.

Morales, K. (2003). Evaluación y caracterización morfológica y molecular por microsatélites de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) de altura, INIAP. Tesis de Doctorado en Biología. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias de la Educación, Escuela de Biología y Química. Quito - Ecuador. p 125.

Moreno, J. C. (1987). Polinización artificial del chirimoyo (*Annona cherimola* Mill), comparación de técnicas de conservación y aplicación del polen, acción de los insectos y test de variabilidad. Sevilla. 11-34.

Park, S. D. E. (2001). Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection [ Ph.D. thesis (in prep.)], University of Dublin.

Peña, G. (2003). Caracterización morfológica de 57 accesiones de cacao (*Theobroma cacao* L.) Tipo nacional de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue. Tesis de Ingeniería Agronómica. Portoviejo – Ecuador. p 21

Scheldeman, X. (2002). Distribution and potential of cherimoya (*Annona Cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* Spp.) in Ecuador [CD-ROM]. Tesis Ph D en Ciencias Biológicas Aplicadas. Ghent - Bélgica. 12.

Sosa, J. P. (2006). Caracterización de 12 ecotipos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) provenientes de los valles subtropicales de la zona interandina del Ecuador. PUCE. Tesis de licenciatura en Ciencias Químicas especialidad Química Analítica. Quito – Ecuador. 55,57, 59,72, 73.

Tapia, C. (1998). Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. del CATIE. Tesis de maestría. Costa Rica. 130.

## **BOLETIN DIVULGATORIO**

Biodiversity, (2008). Descriptores para chirimoyo *Annona cherimola* Mill, *Roma Italia*. 25-32.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). (2003). Reporte anual 2002 Proyecto SB-2: Asesoramiento y utilización de agrobiodiversidad a través de la biotecnología. p 1.

Chalampunte, D. (2008). “Promoción y sistemas de producción sostenible de chirimoya en Latinoamérica a través de la caracterización, conservación y uso de diversidad local de germoplasma” Proyecto Cherla. Informe Final. 22.

Christopher, M., Cordeiro, G., Waters, D., & Henry, R. (2004). Marker assisted selection in rice improvement. Rural Industries Research and Development Corporation. p 2.

Corporación de Fomento de la Producción (CORFO). (1989). Situación y cultivo de chirimoyo, papayo y lúcumo en Chile. Gerencia de Desarrollo. Chile. 92-96

González, M., Hueso, J., Alonso, F., y Cuevas, J. (2007). Documentos Técnicos: Mejora de la productividad y calidad del fruto mediante el control de la polinización en Chirimoyo [CD-ROM]. Fundación Cajamar.

IPGRI. (1995). Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of IPGRI Workshop: Author. Roma - Italia. p 137.

Kendall, M., & Stuart, A. (1979). The advanced theory of statistics. Macmillian Publishing Company, Inc, New York: Volumen 2.

Martínez L, 2002. Agroexportación de productos no tradicionales. Fundación Aliñambi. Quito – Ecuador. Pp 2.

Pagano, E. M., Rosso, B., Rimieri, P. y Ríos, R. D. (2007). Aplicación de marcadores moleculares al estudio de la variabilidad genética en el género *Bromus*. Avances de investigación en Recursos Fitogenéticos en el Cono Sur II. Región Sur. Red de Recursos Genéticos del Cono Sur. Montevideo – Uruguay. 57 – 62.

Proyecto de Aumento de la Productividad (PROFUT). (1997). El cultivo de chirimoyo, aspectos de la producción, manejo en postcosecha y comercialización. Lima. Boletín técnico No 11: 6 – 7.

Seminario Taller - “La Biotecnología en el Ecuador: Estado actual y perspectivas futuras”, 2006. Universidad San Francisco de Quito. EC. p 7.

Taba, S. (1991). II Reunión Nacional sobre Recursos Fitogenéticos: caracterización y evaluación de germoplasma. 39.

Van Damme, J. (1999a). Proceedings of the first international Symposium on Cherimoya. p 108.

Viteri, P., León, J., Vásquez, W., Herrera, G., y Valencia, S. (2004). El Cultivo de Chirimoyo (*Annona cherimola* Mill), en el Ecuador. Boletín Informativo – INIAP. Estación Experimental Santa Catalina. p 3.

## **OTROS**

Escribano, P, Viruel M.A. y Hormaza, I. (2007). Selección de 20 SSRs de chirimoyo. [ihormaza@eelm.csic.es](mailto:ihormaza@eelm.csic.es). Algarrobo-Costa, Málaga - España.

Hormaza, J. I. (2006). Extracción Protocolo de secuenciación de muestras. [ihormaza@eelm.csic.es](mailto:ihormaza@eelm.csic.es). Algarrobo-Costa, Málaga – España.

Liu, J. (2005). Powermaker Version 3.0. Manual.

Rohlf, J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York.

SAS Institute. (1990). SAS/STAT user's guide, 6<sup>th</sup> ed. SAS Institute, Cary, NC.

Tartarini S, (2003). Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plants and animal breeding? Session I: MAS in plants.

Tineo Canchari, J. (2003). Descriptores de germoplasma de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.). Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Estación Experimental Canaan, Dirección General de Investigación Agraria. INIA, Ayacucho- Peru.

Viruel, M. A y Hormaza, J.I. (2006). Extracción de ADN en tubos Eppendorf- Mini preparación, [ihormaza@eelm.csic.es](mailto:ihormaza@eelm.csic.es). Algarrobo-Costa, Málaga - España.

