



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ**

**FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

## **TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Previo a la obtención del título de:**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**TEMA:**

Identificación de marcadores moleculares microsátélites (SSR) para estudios genéticos en *Annona deceptrix* Westra H Rainer, especie amenazada en la provincia de Manabí

**AUTOR:**

VÉLEZ ALAVA FREDY ADRIÁN

**TUTOR:**

Ing. PICO MENDOZA JOSÉ NEWTHON. PhD.

**SANTA ANA - MANABÍ - ECUADOR**

**2021**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico con mucho cariño a mis queridos padres, cuyo sacrificio y esfuerzo me han hecho alcanzar este nivel de estudios, con gratitud a mis familiares en especial a la familia Ruiz Chávez quienes me han apoyado desde que empecé mis estudios.

**Fredy Adrián Vélez Alava**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco en primer lugar a Dios por darme fuerzas para continuar cada día esforzándome en esta meta y mantenerme firme y dedicado a mis estudios, en segundo lugar, a mis padres por que sin ellos no sería quien soy hoy, agradecido por sus consejos que siempre me han guiado por el buen camino.

Fredy Adrián Vélez Alava

## **CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO**

Yo, Ing. PICO MENDOZA JOSÉ NEWTHON. PhD. Certifico que el trabajo de titulación denominado **“Identificación de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para estudios genéticos en *Annona deceptrix* Westra H. Rainer, especie amenazada en la provincia de Manabí”** redactado y ejecutado por FREDY ADRIÁN VÉLEZ ALAVA, ha completado todos los requerimientos estipulados ante la comisión de titulación.

.....

Ing. PICO MENDOZA JOSÉ NEWTHON. PhD.

**C.C. 1309466371**

# **Certificación de la Comisión de Revisión y Evaluación**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ  
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TEMA: IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSATÉLITES (SSR) PARA ESTUDIOS GENÉTICOS EN *Annona deceptrix*  
Westra H Rainer, ESPECIE AMENAZADA EN LA PROVINCIA DE MANABÍ**

## **TRABAJO DE TITULACIÓN**

Sometida a consideración del Tribunal de Revisión, Sustentación y Legalidad por el  
Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del Título de:  
**INGENIERO AGRÓNOMO**

### **APROBADO POR:**

---

Ing. Pico Mendoza José Newthon PhD.

**TUTOR**

---

**Ing. ....**  
**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

---

**Ing.....**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

**Ing.....**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **DECLARACIÓN SOBRE DERECHOS DE AUTORÍA**

Yo, **FREDY ADRIÁN VÉLEZ ALAVA** con C.C. N° **1315584043**; declaro que el proyecto de titulación denominado **“Identificación de marcadores moleculares microsatélites (SSR) para estudios genéticos en *Annona deceptrix* Westra H. Rainer, especie amenazada en la provincia de Manabí”** se ha desarrollado de manera íntegra, respetando derechos intelectuales de las personas a las cuales han sido incluidas en citas y bibliografías. **Además, estos resultados son parte del proyecto de investigación Estudio de diversidad genética de *Annona deceptrix* (Westra) H. Rainer (Annonaceae), especie amenazada en peligro de extinción, aprobado en la Convocatoria de proyectos de investigación 2018 de la Universidad Técnica de Manabí.**

.....

**FREDY ADRIÁN VÉLEZ ALAVA**

**C.C. 1315584043**



4.5.3.2. AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)	10
4.5.3.3. RAPD (polimórfico amplificado al azar)	10
4.5.3.4. SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido)	10
4.5.3.5. STS (Sitio con marca de secuencia)	10
4.5.3.6. Microsatélites/SSR (Secuencia Simple Repetida)	11
4.6. Secuenciación	11
4.7. Secuenciación de nueva generación/ SNG	12
4.8. PCR o reacción en cadena de la polimerasa	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.5. Zona de muestreo y colecta de material vegetal	14
5.6. Extracción de ADN, Cuantificación y Validación del ADN	14
5.7. Secuenciación de <i>A. deceptrix</i>	14
5.8. Identificación de loci microsatélites y diseño de primers	15
5.9. Reacción de PCR	16
5.10. Análisis de datos	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
6.5. Características de los SSR y amplificación de amplicones	18
6.6. Análisis genéticos	20
6.6.3. Estimación de la diversidad genética por locus	20
6.6.4. Estimación de la diversidad genética en las poblaciones	22
6.6.5. Amplificación de SSR <i>A. deceptrix</i> en otras anonáceas	23
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
8. BIBLIOGRAFÍA	26
9. ANEXOS	34

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características generales de algunos marcadores moleculares .....	12
<b>Tabla 2.</b> Localidad, ubicación y número de muestras por especie, utilizada para la secuenciación de <i>A. deceptrix</i> .....	14
<b>Tabla 3.</b> Gradientes de PCR para la amplificación de SSR en diferentes muestras de <i>A. deceptrix</i> .....	19
<b>Tabla 4.</b> Características de nueve loci microsatélites desarrollados para <i>A. deceptrix</i> ..	20
<b>Tabla 5:</b> Estimación de parámetros genéticos por locus en <i>A. deceptrix</i> : número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivo ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), índice de fijación ( $F_{is}$ ) y proporción de diferenciación entre población ( $F_{st}$ ). .....	21
<b>Tabla 6:</b> Estimación de parámetros genéticos por poblaciones en <i>A. deceptrix</i> : número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivo ( $N_e$ ), heterocigosidad observada $H_o$ , heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), índice de fijación ( $F_{is}$ ).....	23
<b>Tabla 7:</b> Amplificaciones de 9 marcadores SSR en otras anonáceas: Si amplifica (++), No amplifica (--). .....	24

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Amplificación del amplicón AD9 en 15 muestras de <i>A. deceptrix</i> .....	18
<b>Figura 2:</b> Electroferograma de las muestras de <i>A. deceptrix</i> obtenidos de la electroforesis capilar en el desarrollo de marcadores SSR. ....	19
<b>Figura 3:</b> A) amplificación del locus AD9 en muestras de <i>A. conica</i> . B) Electroferograma, resultado de la electroforesis por capilaridad del locus AD9 en una muestra de <i>A. conica</i> . ....	24

## RESUMEN

En la provincia de Manabí, una gran variedad de especies de la familia Annonaceae se encuentran en cierto grado de vulnerabilidad, entre ellas está *Annona manabiensis* Saff. Ex R.E. Fr, *Annona conica* Ruiz & Pav. Ex G. Don y una de las más importantes en este estudio *Annona deceptrix* Westra H. Rainer, donde sus frutos presentan asombrosas características relacionadas (forma, tamaño y color) y que pueden llegar a ser considerados muy importantes dentro de la alimentación humana. El objetivo de este trabajo fue desarrollar marcadores microsatélites SSR en *A. deceptrix* y su aplicación en otras anonáceas para estudios genéticos. Se realizó la extracción de ADN en hojas de brotes jóvenes con el protocolo de extracción CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), a partir de la extracción, se formaron las librerías genómicas utilizando la plataforma Nextera continuando con la identificación de los microsatélites utilizando el software MSATCOMANDER, el desarrollo de los marcadores permitió obtener información muy relevante respecto a su contenido genético, como lo fue en la estimación de la diversidad genética por locus que brindo un promedio en el número de alelo ( $N_a$ ) de 3.481, con un valor mayor en el locus AD8 y AD11 con 6 y 5.6 respectivamente. Por otra parte, el número de alelos efectivos ( $N_e$ ) mostró un promedio de 2.70, siendo el locus AD8 el de mayor número con 4.90, mientras que 1.51 alelos efectivo fue el valor más bajo reportado en el locus AD7, seleccionándose 9 de 12 marcadores ya que estos poseen características polimórficas siendo consistentes en algunas poblaciones evaluadas y demostrando que existen rangos similares de diversidad en estas especies, es decir los marcadores desarrollados en *A. deceptrix* si amplifican en las otras especies probadas como lo fue en *A. conica* con un tamaño de 123/ 133 Pb, manteniendo la teoría de que estos marcadores no sufren de variación ambiental.

**Palabras claves:** *Annona deceptrix* Westra H. Rainer, Annonaceae, marcadores microsatélites, contenido genético, estudios genéticos, locus, diversidad genética, alelos efectivos, polimórficas

## SUMMARY

In the province of Manabí, there are a great variety of species of the Annonaceae family that are in a certain degree of vulnerability, among them is *Annona manabiensis* Saff. Ex R.E. Fr, *Annona conica* Ruiz & Pav. Ex G. Don and one of the most important in this study *Annona deceptrix* Westra H. Rainer, where its fruits have amazing characteristics related in (shape, size and color) and that can be considered very important in the diet of the For this reason, the objective of this work was to develop SSR microsatellite markers in *A. deceptrix* and their application in other Annonaceae for genetic studies, and then proceeded to perform DNA extraction in young shoot leaves with the CTAB extraction protocol (cetyltrimethylammonium bromide) (Doyle & Doyle, 1990), from the extraction, genomic libraries were formed using the Nextera platform, continuing with the identification of microsatellites using the MSATCOMMANDER software, the development of the markers allowed obtaining very relevant information regarding to its genetic content, as it was in the estimation of genetic diversity by locus that provided a pro average in the number of alleles ( $N_a$ ) of 3,481, with a higher value in the AD8 and AD11 locus with 6 and 5.6 respectively, On the other hand, the number of effective alleles ( $N_e$ ) showed an average of 2.70, being the AD8 locus the one with the highest number with 4.90, while 1.51 effective alleles was the lowest value reported in the AD7 locus, selecting 9 out of 12 markers since they have polymorphic characteristics, being consistent in some populations evaluated and demonstrating that there are similar ranges of diversity in these species, that is, the markers developed in *A. deceptrix* if they amplify in the other species tested and do not suffer from environmental variation.

**Keywords:** *Annona deceptrix* Westra H. Rainer, Annonaceae, microsatellite markers, genetic content, genetic studies, locus, genetic diversity, effective alleles, polymorphic

## 1. INTRODUCCIÓN/PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

Ecuador es considerado como un país mega diverso con alto grado de endemismo, sin embargo, posee una alta tasa de amenaza, tanto así, que el 78% de su flora endémica posee algún grado de vulnerabilidad; donde el 46% de esta vegetación está catalogada como vulnerable, 24% en peligro y 8% en peligro crítico (León-Yáñez *et al.*, 2011). Actividades antropogénicas como la deforestación, han provocado una disminución en la abundancia y frecuencia de la flora nativa de la provincia y del país, incidiendo hasta su posible desaparición de los ecosistemas (Ranta *et al.*, 2006).

Dentro de la vegetación vulnerable, existen especies que muestran utilidad para el hombre, ejemplo de ello son las especies que están contenidas en familias como las Caricaceae, que presentan 17 de 19 especies dentro del territorio ecuatoriano (León-yáñez *et al.*, 2011). También están las especies de la familia Annonaceae, con aproximadamente 200 géneros y 2500 especies que se distribuyen en áreas subtropicales y tropicales en Australia, África y América (Doyle & Thomas, 2012; Doyle & Thomas, 1996; Doyle, 1996), cuyo género de mayor importancia comercial y ecológica es la *Annona* contando con alrededor de 19 especies que se encuentran en todo el Ecuador, y distribuidas por la cordillera de los Andes (León-Yáñez *et al.*, 2011; Safford, 1914).

En la provincia de Manabí, se reportan varias especies de Annonaceae que tienen cierto grado de vulnerabilidad, como *Annona manabiensis* Saff. Ex R.E. Fr, *Annona conica* Ruiz & Pav. Ex G. Don y *Annona deceptrix* Westra, donde sus frutos presentan características deseables (forma, tamaño y color) que pueden formar parte de la dieta de las personas, incluso, pueden llegar a ser considerados como alimentos funcionales por los atributos que poseen (Brandão & Santos, 2015). Sin embargo, la diversidad genética de estas especies aún no están cuantificada, desconociendo su composición genética, y basándonos en especies descritas como *Annona cherimola*, especie diploide 2(n) con 7 pares de cromosomas, por lo que se hace necesaria la evaluación a través de herramientas biotecnológicas que nos permita inferir en su acervo génico (González, 2013).

En este sentido, los marcadores moleculares son herramientas clave usados para describir patrones genéticos e incluso permite identificar genes relacionados con caracteres de interés (Godoy, 2014; Jain & Mohan, 2000). Un marcador es un carácter que permite identificar una región de un gen, estos pueden ser: marcadores bioquímicos,

morfológicos y moleculares, como los SSR (Cornejo, 2014; Andrade-Torres & Solís-Ramos, 2015).

Los marcadores moleculares SSR aportan con la obtención de un conjunto de secuencias genómicas, logrando conocer parte de la genética de una especie (Pandey & Sharma, 2013; Zane *et al.*, 2002). Estos revelan variaciones cortas de las secuencias, por lo general de dos a tres repeticiones, permitiendo la detección de alelos múltiples.

### **Planteamiento de problema**

Ecuador cuenta con especies endémicas de gran importancia dentro de sus ecosistemas, entre ellas *A. deceptrix*, que se encuentra en un estado de vulnerabilidad en peligro (EN) (Baillie *et al.*, 2004; León-yáñez *et al.*, 2011). Esta es una especie subutilizada que presenta atributos agronómicos que la destacan de otras Annonaceae, como la forma, color, olor y sabor de sus frutos. Además, presenta interacción con la fauna silvestre, resaltando su importancia ecológica. Sin embargo, no existen estudios que den la pauta para la conservación de este recurso fitogenético y mucho menos herramientas biotecnológicas que permitan evaluar, describir y cuantificar el acervo genético de *A. deceptrix*. Estas limitaciones pueden repercutir en que esta especie desaparezca de su entorno natural, privándonos de sus beneficios y bondades.

**¿Con el desarrollo de marcadores moleculares específicos de la especie, se podrá evaluar el pool génico en poblaciones naturales de *A. deceptrix*?**

## 2. JUSTIFICACIÓN

La UICN reporta que Ecuador posee una flora muy extensa con especies endémicas muy importantes para los ecosistemas, de las cuales, un gran porcentaje se encuentra amenazada por diversos factores, como la deforestación y el cambio de uso del suelo (Baillie *et al.*, 2004). Esta actividad ha reducido áreas importantes para muchas especies, provocando que estas disminuyan sus densidades poblacionales y asumiendo el riesgo de llegar a su extinción (Sierra *et al.*, 1999). En este sentido, las Annonaceae endémicas han sido uno de las especies con mayor afectación, y muchas de ellas están catalogada en diferentes estados de vulnerabilidad.

Las Annonaceae, poseen especies que se han caracterizado por tener frutos agradables, aromáticos, de buena presencia y que en su estructura contienen aceites esenciales de gran importancia (Rabelo *et al.*, 2015) y con buen valor nutricional (Brandão & Santos, 2015; Wongs-Aree & Noichinda, 2011). Entre esa diversidad de especies de anonáceas, *A. deceptrix*, posee característica distintiva en sus frutos, ya que es de forma cónica, amarillenta, olor y sabor intenso, cuyos atributos le hacen destacar de otras especies.

*A. deceptrix* se encuentra en un estado de vulnerabilidad preocupante denominado por la UICN como en peligro (EN). Desfavorablemente los esfuerzos por conservarla son pocos, por lo que es necesario ejercer programas donde se incluya una valoración integral de la especie, estudiando su ecológica, distribución, biología reproductiva y sobre todo su acervo genético, orientados a su conservación y uso (León-Yáñez *et al.*, 2011).

Esta valoración genética es importante realizarla a través de marcadores moleculares, en especial aquellos con características codominantes como los microsatélites, estos permiten obtener información sobre la diversidad y estructura genética de las poblaciones, condición que nos ayuda en la toma de decisiones y a inferir en los demás con mayor variabilidad (Setsuko *et al.*, 2005).

El propósito de este trabajo fue el de desarrollar marcadores microsatélites SSR específicos de *A. deceptrix*, con la intención de obtener mayor información sobre el acervo genético debido a las características codominante que estos presentan.

### **3. OBJETIVOS**

#### **a. OBJETIVO GENERAL**

- Desarrollar marcadores microsatélites SSR en *A. deceptrix* y su aplicación en otras anonáceas para estudios genéticos

#### **b. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Identificar marcadores microsatélites SSR específicos polimórficos en *A. deceptrix* para la evaluación del contenido génico
- Validación de marcadores microsatélites SSR de *A. deceptrix* como marcadores heterólogos en otras especies de Annonaceae

## 4. MARCO REFERENCIAL

### 4.1. Distribución, ecología y conservación de las algunas especies de anonácea

La ampliación espacial de las poblaciones humanas destinadas para áreas de cultivos y minería, provoca una reducción en las poblaciones de plantas, viéndose afectada la biodiversidad, fecundidad y supervivencia de las especies, reduciendo la heterogeneidad de las poblaciones (Ranta *et al.*, 2006).

Durante años de estudios se observó que las plantas, animales y organismos tenían la capacidad de poder adaptarse a otras condiciones que no fueran propias a su endemismo, pudiendo adaptarse a otros lugares, técnica aplicada como conservación *ex situ* que es muy utilizada, sin embargo, tiene como desventaja que al pasar el tiempo en estas especies pudieran disminuir su diversidad genética (Godoy, 2014; Guerrant *et al.*, 2013).

En los bancos de germoplasma se almacena gran variedad de material vegetal como una estrategia de conservación *ex situ*, almacenando colecciones vivas, estacas, polen, rizomas, que a diario son usados por los fitomejoradores y ecólogos, empleándolos para investigaciones (Guerrant *et al.* 2013; Murray 2016).

La conservación de las plantas endémicas del Ecuador, sigue en riesgo, cuyos niveles según su estado de amenaza definidos por la IUCN, alrededor de un 78% de plantas se encuentran amenazadas, lo que corresponde a tomar medidas para afrontar esta situación que a diario amenaza con extinguir ciertas especies de plantas (Baillie *et al.*, 2004; León-Yáñez *et al.*, 2011).

#### 4.1. *Annona deceptrix* (Westra) H. Rainer

El género *Annona* se difunde desde los tiempos pasados renombrándose como especie importante, ya que su distribución está dada en los trópicos de Sudamérica, aunque también algunas especies fueron introducidas a Sudamérica provenientes de África tropical (Safford, 1914).

En Ecuador se reporta que al menos 19 especies de la familia Annonaceae son endémicas, entre ellas árboles, a excepción de *Annona conica* Ruiz & Pav. ex G. Don y *Guatteria occidentalis*, que son arbustos, estrechamente distribuidos a un costado de la cordillera de los Andes (León-Yáñez *et al.*, 2011). Existen reportes sobre especies y sinónimos de *A. deceptrix*, distribuyéndose en zonas de Manabí y Guayas, detalles

generados en monografías antiguas, sin embargo, son detalles muy relevantes, pero que no han sido estudiados y corroborados nuevamente (Rainer, 2016).

*A. deceptrix* tiene la particularidad de ser un árbol pequeño con ramas glabras, de hojas alternas, su inflorescencia es extra axilar o terminal, constituido de 1 a 5 flores y con un fruto baciforme, conteniendo en su interior de 20 a 25 semillas (Westra, 1995). Caracterizándose por tener un gran endospermo de testa blanda, particularmente en la zona más baja de este arbusto, pose hojas un poco diferentes a la de la zona apical (Safford, 1914; Westra, 1995).

Por otra parte Pico-Mendoza *et al.*, (2020) realizaron un estudio relacionado con la capacidad de germinación de *A. deceptrix* donde se ejecutó un experimento el cual tenía algunos tratamientos para evaluar la germinación de las semillas aplicando técnicas físicas y químicas, que permitieron determinar que *A. deceptrix* tiene limitaciones en su reproducción natural y que requiere de un proceso previo como la escarificación o inmersión en ácido giberélico para promover su germinación.

#### **4.2. Relevancia de los recursos fitogenéticos**

La conservación de los recursos fitogenéticos es de gran importancia porque de ello depende la alimentación mundial, expresándose de tal manera que “cualquier material genético de origen vegetal de valor real o potencial para la alimentación y la agricultura”, frase descrita por la FAO (2013) emitida en el Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura

Se podrá promover con un enfoque integrado de la prospección, conservación y utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura tomándose en consideración algunos detalles como:

- a) Se realizará estudios e inventarios de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, teniendo en cuenta la situación y el grado de variación de las poblaciones existentes, incluso los de uso potencial y, cuando sea viable
- b) Se promoverá la recolección de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura y la información pertinente relativa sobre aquéllos que estén amenazados o sean de uso potencial

- c) Se apoyará, cuando proceda los esfuerzos de los agricultores y de las comunidades locales encaminados a la ordenación y conservación en las fincas de sus recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura
- d) Se promoverá la conservación in situ de plantas silvestres afines de las cultivadas y las plantas silvestres para la producción de alimentos, incluso en zonas protegidas, apoyando, entre otras cosas, los esfuerzos de las comunidades indígenas y locales;
- e) Se cooperará en la promoción de la organización de un sistema eficaz y sostenible de conservación ex situ, prestando la debida atención a la necesidad de una suficiente documentación, caracterización, regeneración y evaluación, y promoverá el perfeccionamiento y la transferencia de tecnologías apropiadas al efecto, con objeto de mejorar la utilización sostenible de los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura
- f) Se supervisará el mantenimiento de la viabilidad, el grado de variación y la integridad genética de las colecciones de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura (FAO, 2013).

### **4.3. Mejoramiento genético**

El mejoramiento genético se da desde tiempos inmemorables, empezando con el hombre cuando él hacía una selección de semillas de los mejores individuos con caracteres promisorios, muchas veces los cruzaba entre si y en otros casos no era posible cruzarlos, siendo la genética vegetal la que ofreció al mejorador los conocimientos para hacer más eficiente el trabajo y así poder observar comportamientos y componentes ambientales, genéticos y su interacción entre ambos, en general se podría decir que las primeras especies entre plantas y animales en ser mejoradas genéticamente fueron las plantas (Cornide, 2001; Bandera & Pérez, 2015).

En el caso de las especies vegetales fueron mejorando gracias al avance tecnológico que permitió realizar estudios genéticos basados en la morfología y ADN, el cual permitía conocer a mayor amplitud sobre cómo era el comportamiento de las especies y su evolución (Cornide, 2001).

Siendo usada por primera vez la técnica basada en marcadores morfológicos, por otra parte prevaleció técnicas que estaba en uso, como era la del Polimorfismo de

Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) enmarcando a gran escala el inicio de mapeos genéticos basados en marcadores moleculares (Botstein *et al.*, 1980).

La aplicación de herramientas biotecnológicas ha beneficiado a la conservación de las especies (Berumen-Varela *et al.*, 2019) destacando la aplicación de marcadores moleculares SSRs los cuales han contribuido en estudios sobre descripción de genomas (Jain & Mohan, 2000), ecología y demografía de especies (Godoy, 2014; Pandey & Sharma, 2013).

El desarrollo de marcadores moleculares provee de una biblioteca de información genómica (Escribano *et al.*, 2004; Berumen-Varela *et al.*, 2019) que da facilidad a estudios de caracterización molecular (Ellegren, 2004; Mokhtar & Atia, 2019), consiguiendo ser utilizados para intercambio de material vegetal e inclusive en programas de conservación y mejoramiento genético (Escribano *et al.*, 2008<sup>a</sup>; Pereira *et al.*, 2008).

Por otra parte, también se han realizado estudios en otras especies de las familias Magnoliaceae (Setsuko *et al.*, 2005), tales como Ericaceae, Asteraceae y Fabaceae, con el fin de conseguir una descripción sobre la caracterización genética, conservación de germoplasma, así como el determinar la estructura genética de las poblaciones (Sonnante *et al.*, 2008; Siise & Massawe, 2013).

No obstante, los marcadores microsatélites han sido de gran ayuda en el sector forestal, su aplicación en programas de mejoramiento y conservación ha sido amplia, obteniendo individuos con características deseables para obtener material que permita generar ingresos a la industrias madereras (Teza *et al.*, 2012).

#### **4.4. ¿Qué es un Marcador?**

Un marcador se describe como un carácter o un gen que puede ser usado para establecer la presencia de otro gen, es decir, una característica cualquiera como el color de flor, forma de la hoja, u otras expresiones como tolerancia a plagas (Andrade-Torres & Solís-Ramos, 2015).

#### **4.5. Tipos de marcadores**

##### **4.5.1. Marcadores bioquímicos**

##### **4.5.1.1. Isoenzimas o Aloenzimas**

Estos marcadores fueron unos de los primeros marcadores usados para conocer sobre la genética de las plantas, teniendo variantes de una misma enzima, por ejemplo, diferentes individuos de una misma población pueden tener variantes en sus proteínas en los que se refiere a su forma, situación dada a factores genéticos o epigenéticos (Azofeita-Delgado, 2006).

El análisis es realizado mediante la extracción de las enzimas del tejido vegetal, continuando con su separación por medio de la electroforesis y su respectiva visualización en gel de agarosa con colorantes específicos, sin embargo su uso se ve limitado por que hay un número escaso de colorantes enzimáticos para su tinción (Azofeita-Delgado, 2006).

#### **4.5.2. Marcadores morfológicos**

Estos marcadores fueron considerados como una de las primeras técnicas para identificación de especies y para estimar la variación morfológica y reproducción, caracterizándose por describir características visibles o fenotípicas fácilmente detectables en las especies vegetales y animales (Andrade-Torres & Solís-Ramos, 2015) y que pueden manifestarse en los primeros días de desarrollo o inclusive pueden presentarse cuando el individuo haya completado su desarrollo (Rey, 2008).

#### **4.5.3. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN que se consideran como marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma, y no están influenciados por condiciones ambientales (Torales *et al.*, 2005; Andrade-Torres & Solís-Ramos, 2015).

##### **4.5.3.1. RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción)**

Los marcadores **RFLP** son un tipo de polimorfismo que resulta de la variación en la secuencia de ADN reconocida por las enzimas de restricción que se utilizan como marcadores en los mapas genéticos. Por lo general, para visualizar los RFLPs se utiliza la electroforesis en gel para conocer cuáles son los alelos que se diferencian en la secuencia cuando existen fragmentos de DNA de bajo peso molecular, pero cuando es utilizada con fragmentos mayores se usan sondas específicas para visualizar ciertos fragmentos en la secuencia (Marsan & Oldenbroek, 2010; Raza *et al.*, 2016).

#### **4.5.3.2. AFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados)**

Los AFLPs son considerados como marcadores bialélicos dominantes que se desarrollaron en 1995, estos combinan enzimas de restricción y oligonucleótidos para PCR, son ventajosos porque son capaces de crear algunos marcadores en una reacción. Sin embargo, un inconveniente es que suele mostrar una cierta codominancia de transmisión que reduce su efectividad en análisis genéticos de poblaciones (Marsan & Oldenbroek, 2010).

#### **4.5.3.3. RAPD (polimórfico amplificado al azar)**

Es una técnica muy antigua y es considerada una de las más versátiles, se usa para amplificar mediante la PCR zonas específicas distribuidas al azar en la secuencia, su pequeñez asegura que se unan una serie de secuencias permitiendo amplificar muchos fragmentos. Es cómoda y requiere de poco DNA y no necesariamente debe estar puro, siendo una de la más utilizadas en la catalogación de frutos y selección de líneas clonales (Raza et al., 2016).

#### **4.5.3.4. SNP (Polimorfismo de un solo nucleótido)**

Estos marcadores de tipo II detectan variaciones en nucleótidos únicos y no cambian su longitud en la secuencia de DNA en la región amplificada, la mayoría de los SNP son localizadas en regiones no codificantes y prácticamente no tienen un impacto en el fenotipo de un individuo, algunos pueden generar mutaciones en las secuencias expresadas (Marsan & Oldenbroek, 2010).

#### **4.5.3.5. STS (Sitio con marca de secuencia)**

Técnica desarrollada en 1989 que aprovecha secuencias conocidas dentro de un genoma al ser amplificadas por la PCR, se encuentra fácilmente cuando estos están siendo amplificados por intrones en vez de exones, y posee una ventaja la cual es la velocidad en la que se puede realizar el análisis y se asemejan en la rapidez con los marcadores RAPD y la especificidad de los RFLP en la manera de determinar los oligonucleótidos, generalmente son usados para construir mapas físicos (Marsan & Oldenbroek, 2010).

#### **4.5.3.6. Microsatélites/SSR (Secuencia Simple Repetida)**

Los microsatélites también conocidos como secuencia simple repetida (SSRs) están formados por repeticiones de 1 a 6 nucleótidos, clasificados como puros, perfectos e interrumpidos, y son de carácter mendeliano, codominante y polimórficos (Cornejo *et al.*, 2014; Lagoda & Jarne, 1996).

Estos marcadores moleculares son herramientas útiles para conocer el pool génico de las especies (Vilanova *et al.*, 2012), y sirven de base para trabajos en mejoramiento genético (Edwards & Batley, 2010) y otros aspectos de interés (García *et al.*, 2018). Además, los marcadores microsatélites tiene una ventaja ya que son utilizados en la genética de conservación, permitiendo diferenciar la homocigocidad y heterocigocidad entre individuos, convirtiéndolos en unos de los sistemas más empleados (Sirvent & Belén, 2012).

Los marcadores al tener un alto grado de polimorfismo se les ha atribuido dos procesos de mutación que son: el deslizamiento en el apareamiento de las hebras de DNA y el entrecruzamiento desigual. Estos pueden brindar información importante a distintos niveles, debido a la diversidad de los tipos de microsatélites (Vázquez & Morales, 2011).

#### **4.6. Secuenciación**

A partir del descubrimiento del ADN se han suscitado técnicas para realizar secuenciaciones de especies tanto de bacterias como de eucariontes, en pocas palabras que secuenciar consiste en determinar en qué orden se encuentran los nucleótidos (A, T, G, C) los cuales conforman la molécula de ADN, al inicio de las secuenciaciones se podían obtener de 5 a 10 nucleótidos en un fragmento de secuencia, pero con el pasar del tiempo los avances tecnológicos y científicos han permitido obtener mayor cantidad de nucleótidos por fragmento (Márquez *et al.*, 2014).

La secuenciación ha permitido asociar enfermedades según la función de los genes, tanto en el ámbito de la agricultura y la salud humana permitiendo avanzar en conocimientos relacionados a la genómica, y que hoy en día abarca un gran rango de aplicaciones en diferentes áreas (Márquez *et al.*, 2014; Rodríguez, 2009).

Uno de los primeros métodos usados para secuenciar ADN fue el de Maxam y Gilbert en 1977, señalando que es un método químico de primera generación, hace que

la molécula de ADN tengas varias rupturas, permitiendo secuenciar el ADN original y detectar modificaciones en su estructura (Marwati *et al.*, 1977).

Por otra parte, está el método de Sanger y uno de los más populares y utilizado en la genómica, comúnmente conocido como didesoxi o secuenciación por terminación en cadena, desarrollado por Fred Sanger en 1977, este método es enzimático y permite determinar la secuencia del molde a medida que se desarrolla toda la hebra (López, 2016).

**Tabla 1. Características generales de algunos marcadores moleculares** (Azofeita-delgado, 2006; Becerra & Paredes, 2001)

Características	Marcadores				
	RAPD	AFLP	RFLP	SNP	SSR
<b>Polimorfismo</b>	Medio-alto	Medio-Alto	Medio	Medio- Alto	Alto
<b>Estabilidad ambiental</b>	Alta	Moderada	Alta	Alta	Moderada
<b>Nº loci</b>	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
<b>Expresión alélica</b>	Dominante	Dominante	Dominante	Codominante	Codominante
<b>Reproducibilidad</b>	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta
<b>Costo</b>	Alto	Intermedio	Alto	Medio- Alto	Bajo

#### 4.7. Secuenciación de nueva generación/ SNG

Durante el desarrollo de marcadores se han ido perfeccionando programas informáticos que permiten construir bases de datos de búsqueda y creación de microsatélites (Lianming *et al.*, 2013; Kofler *et al.*, 2007; Avvaru *et al.*, 2018), abaratando costos y siendo capaces de crear cientos de secuencias, reduciendo el uso de reactivos.

La información de contenido genético de los diferentes organismos, es muy importante para la traducción del genoma, y a su vez que esta información sea almacenada en micromatrices para estudios genéticos (Schena *et al.*, 1998), conteniendo dentro de los secuenciadores a las herramientas tecnológicas tales como; Roche/454, Illumina, Nextera (Soto & López, 2012; Caruccio *et al.*, 2009).

Estas herramientas utilizadas dentro de las secuenciaciones pertenecen a lo que ahora se le denomina como secuenciación de nueva generación (NGS), permitiendo una mayor lectura de nucleótidos, logrando trabajar con un mayor número de muestras que irían desde 24-96 muestras por secuenciación, resultando eficiente y optimizando su rendimiento (Soto & López, 2012; Shendure & Ji, 2008).

#### **4.8. PCR o reacción en cadena de la polimerasa**

Se describe a PCR o reacción en cadena de la polimerasa como una técnica *in vitro* para el desarrollo y duplicación de secuencias de ADN, tecnología que utiliza secuencias de oligonucleótidos que dan origen y sintetizan fragmentos de ADN que son variables y no tienen más de 6 kb (Azofeita-delgado, 2006).

Este método se basa en la ejecución de un gran número repetitivo de ciclos en los cuales son conocidos como ciclos térmicos, donde resulta: la desnaturalización de ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y su respectiva síntesis, a partir de un cebador o primer de una doble cadena a través de la acción de la polimerasa (Azofeita-delgado, 2006; Robertson & Walsh-Weller, 1998).

Reducido a sus términos más básicos, la PCR simplemente implica combinar una muestra de ADN con cebadores oligonucleotídicos, desoxinucleótidos trifosfatos y la Taq polimerasa ADN termoestable que es un tampón adecuado, luego de calentarse y enfriarse repetidamente la mezcla durante varias horas hasta lograr la cantidad deseada de amplificación (Erlich, 1989).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.5. Zona de muestreo y colecta de material vegetal

Se colectaron hojas de brotes nuevos de 19 individuos de la familia Annonaceae. 15 individuos de *A. deceptrix* pertenecientes a tres localidades del cantón Pedernales, tres individuos de *A. conica* y un individuo de *A. manabiensis* (Tabla 2). Posterior a la colecta, se conservaron en un cooler a 4°C durante el muestreo, y posteriormente (en el menor tiempo posible) se congelaron a -80 ° C, luego se disecaron en silica gel para eliminar la humedad de las muestras, mismas que fueron trasladadas al Departamento de Biotecnología de la EESC (Estación Experimental Santa Catalina), INIAP, Quito.

**Tabla 2. Localidad, ubicación y número de muestras por especie, utilizada para la secuenciación de *A. deceptrix***

Localidad	Especies	Ubicación	Nº de muestras	Provincia
Tachina	<i>A. deceptrix</i>	N 00° 01.842' W 079° 57.216'	5	Manabí
Humedad	<i>A. deceptrix</i>	N 00°02.609' W 079°56.706'	3	Manabí
Nalpe	<i>A. deceptrix</i>	N 00°01.854' W 079°57.192'	3	Manabí
Ayampe	<i>A. deceptrix</i>	S 1°34.45,4' W 80° 42.25,2''	4	Manabí
Buena Fe	<i>A. conica</i>	S 0° 34' 12'' W 79° 21'42''	3	Los Ríos
Lalo loor	<i>A. manabiensis</i>	N 00°05.616' W080°08.947'	1	Manabí

### 5.6. Extracción de ADN, Cuantificación y Validación del ADN

La extracción de ADN se realizó en hojas de brotes jóvenes con el protocolo de extracción CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Doyle & Doyle, 1990), realizando la verificación del ADN extraído en geles de agarosa al 1%. La concentración y pureza de las muestras extraídas se determinó mediante lecturas de absorbancia 260-280 en espectrofotómetro en el equipo para microplacas EPOCH™ de Biotek®, empleado el programa GEN5 para lo cual se realizaron diluciones de las muestras 2:98 (ADN: agua destilada estéril).

### 5.7. Secuenciación de *A. deceptrix*

Se consideraron cuatro individuos de *A. deceptrix* de dos zonas diferentes, dos individuos en el cerro Pata de Pájaro-Pedernales y dos del bosque seco Ayampe-Puerto López. A partir de estos individuos, se formaron las librerías genómicas utilizando la

plataforma Nextera ya que esta presentó ventajas con el resto de plataformas entre ellas tenemos que:

- No requiere un genoma de referencia
- La secuenciación que se realiza es masiva
- Admite genomas de menos de 5 Mb.
- Requiere solo 1 ng de ADN de entrada
- Utiliza la etiquetación, una reacción enzimática, para fragmentar el ADN y agregar secuencias adaptadoras parciales en solo 5 minutos.
- Los cebadores de Nextera son compatibles con Illumina y pueden ser usados juntos

La secuenciación de *A. deceptrix*, se realizó en el laboratorio genómica AUSTRAL-omics de la Universidad Austral de Chile siguiendo los protocolos del fabricante y las respectivas medidas de calidad.

### **5.8. Identificación de loci microsatélites y diseño de primers**

La identificación de los microsatélites se realizó utilizando el software MSATCOMMANDER (<http://code.google.com/p/msatcommander/>) para la localización de microsatélites. Este software localiza repeticiones de microsatélites dentro de secuencias con formato rápido o archivos de consenso y buscará todas las repeticiones de di-, tri-, tetra-, penta y hexa-nucleótidos.

El diseño de primers o cebadores se realizó a través del programa Primer3 (versión 2.0.0) (Rozen & Skaletsky, 2000), adoptando criterios generales para el diseño, tales como:

- 1) Contenido de GC superior al 30%;
- 2) temperaturas de fusión de 58 a 65 °C;
- 3) los dos últimos nucleótidos 3' G o C (GC " abrazadera");
- 4) máximo poli-N de cuatro nucleótidos.

La selección de marcadores SSR se basó en el grado de polimorfismo molecular que se pueden detectar, al menos 3 alelos polimórficos/por marcador. Considerando un

mínimo de 30 alelos polimórficos para comenzar con el análisis genético a nivel de población (Delmas *et al.*, 2011).

### **5.9. Reacción de PCR**

Las reacciones de PCR para la genotipificación masiva, se realizó de acuerdo con las condiciones estándar de cada par de primer.

La amplificación del fragmento de PCR y la validación de los SSR seleccionados se realizaron siguiendo el método desarrollado que utiliza tres cebadores: un cebador directo con una cola M13 (-21) en su extremo 5', un cebador inverso normal y el cebador universal M13 (-21) imprimación marcada con fluorocromos FAM, VIC, PET y NED.

Las reacciones de PCR se realizaron en una mezcla de reacción de 20  $\mu$ L con 10 ng de tampón de reacción de polimerasa; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 0,025  $\mu$ M de ADN para moldes, 0,15 mM de cada dNTP; 1  $\times$  imprimación de polietileno Taq; Cebador inverso 0,1  $\mu$ M; Cebador M13 0,1  $\mu$ M y ADN polimerasa Taq 0,35 U.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un Applied Biosystems Veriti (Life Technologies), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 ° C durante 5 min; 30 ciclos de 30 s (s) a 94 ° C, temperatura de hibridación específica para cada par de cebadores durante 45 s, extensión a 72 ° C durante 45 s, seguidos de 8 ciclos de 30 s a 94 ° C, hibridación a 53 ° C durante 45 s, extensión a 72 ° C durante 45s y una extensión final a 72 ° C durante 30 min.

Los productos de PCR se generaron de la siguiente manera: se mezclaron 2  $\mu$ L de productos de PCR con 10  $\mu$ L de formamida HiDi (Applied Biosystems) y 0,2  $\mu$ L de estándar de tamaño GeneScan 500LIZ (Life Technologies, Foster City, CA) y se separaron mediante electroforesis capilar en un ABI 3130xl Prism Genetic Analizador con polímero POP-7 (Life Technologies, Foster City, CA) en el laboratorio de AUSTRAL-ómic de la Universidad Austral de Chile. Los tamaños de los alelos se calcularon automáticamente con el software GeneMapper v4.0 y se verificaron manualmente.

### **5.10. Análisis de datos**

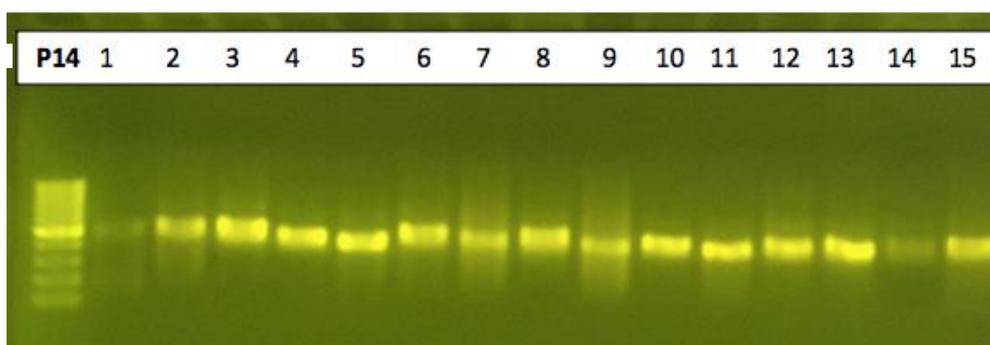
A través de matrices de frecuencias alélicas, se analizaron parámetros como el número observado de alelos (Na) heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) en el software PopGene. El coeficiente de consanguinidad (FIS) se determinó utilizando

Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se determinó con GENEPOP v 4.2.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.5. Características de los SSR y amplificación de amplicones

En su totalidad, se desarrollaron nueve marcadores denominados; AD2, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12 y se probaron en 19 individuos; 15 individuos de *A. deceptrix*, tres individuos de *A. conica* y un individuo de *A. manabiensis*. La primera prueba consistió en seleccionar los mejores SSR que mostraron amplificación en las diferentes muestras en un gel de agarosa al 2%, después de la electroforesis, se seleccionaron los SSR para su posterior desarrollo y análisis. Los cebadores se consideraron exitosos cuando se detectó una banda clara. Luego de realizar la PCR para cada microsatélite seleccionado, se verificaron los amplicones en todas las muestras en un gel de agarosa al 1,5% en Buffer TAE 1x (**Figura 1**). Las muestras fueron observadas utilizando la sonda de detección Sybr Gold. Se cargaron 1.5uL de producto PCR, se utilizó como marcador GeneRuler 100 pb DNA Ladder y Buffer de carga 6X DNA Loading Dye de Thermo scientific.



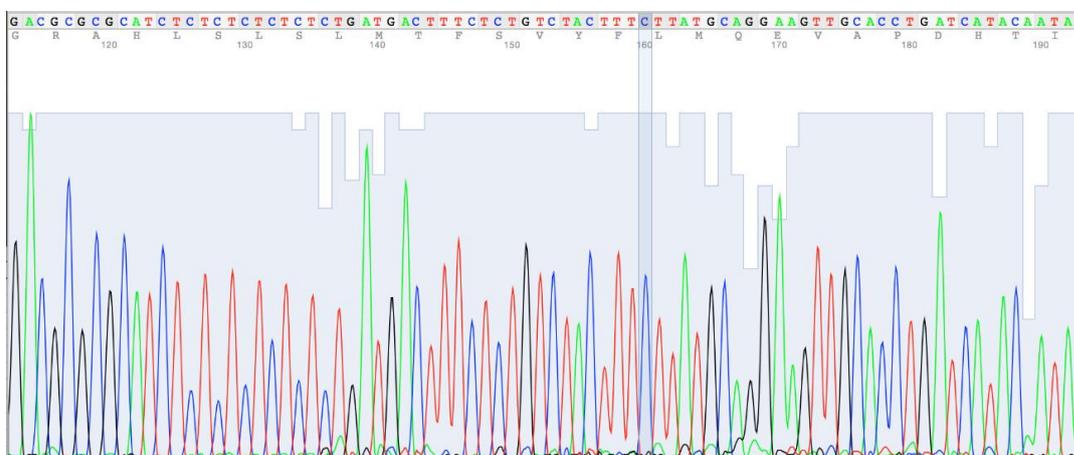
**Figura 1.** Amplificación del amplicón AD9 en 15 muestras de *A. deceptrix*

La segunda reacción de PCR realizadas para la amplificación en todas las muestras fueron realizadas utilizando “GoTaq® DNA Polymerase” de promega. La reacción se realizó en un volumen total de 14uL con 7.5uL de H<sub>2</sub>O, 2.8uL de BufferFlexi colorless (5x), 0.75uL de dNTP Mix (10 mM), 0.5uL de MgCl<sub>2</sub>, 0.1uL Primer Forward, 0.4uL Primer Reverse, 0.4uL Primer M13 (FAM/VIC/NED/PET), 0.05uL Go Taq DNA Polymerase (5 U/μL) y 1.5uL de producto 1°PCR. Las muestras amplificadas bajo los gradientes de PCR se muestran en la **tabla 3**.

**Tabla 3. Gradientes de PCR para la amplificación de SSR en diferentes muestras de *A. deceptrix***

	10 ciclos			10-8 ciclos			
95°C	95°C	60°C	72°C	95°C	53°C	72	72°C
5m	30s	45s	45s	30s	45s	45s	1 min

Los productos de PCR cargados en la placa ABI, contenían: 2 µL del primer M13 VIC, 5 µL del primer M13 NED, 1 µL del primer M13 FAM y 5ul del primer M13 PET y fueron separados por electroforesis capilar en ABI 3130xl Prism Genetic Analyzer with POP-7 polymer (Life Technologies, Foster City, CA) en el laboratorio Austral-omics de la Universidad Austral de Chile afirmando de tal manera lo descrito por Morillo & Miño (1998) donde detallan que con esta técnica de marcaje fluorescente se facilita registrar la información de manera confiable. Por otro lado, el tamaño de alelos fue determinado automáticamente con el software Geneious v2020 y visualizado a través electroferogramas (**Figura 2**).



**Figura 2:** Electroferograma de las muestras de *A. deceptrix* obtenidos de la electroforesis capilar en el desarrollo de marcadores SSR.

En la **tabla 4** se muestran las características de los marcadores SSR desarrollados para *A. deceptrix*, con tamaño del producto y su respectivo motivo repetitivo. Se probaron doce marcadores SSR para su posterior desarrollo y análisis. A partir de estos loci microsatélites, nueve fueron seleccionados por presentar un alto grado de polimorfismo,

condición que concuerda con lo referido por Azofeita-Delgado (2006), donde menciona que las secuencias seleccionadas deben ser altamente polimórficas y detectables para ser utilizados en estudios de genotipificación.

**Tabla 4. Características de nueve loci microsatélites desarrollados para *A. deceptrix***

Locus	Tamaño de producto	Secuencia	Motivo repetitivo	Tamaño (Pb)	Dye	Ta(°c)
AD2	318	F: TCATGTTGTGGATGTGGAGC R:TCTTTGGGAACCATCAGACC	AG <sup>7</sup>	200-213	NED	59.9
AD5	139	F: TTCACTGCATGCCATAGAAGA R:GTAATGGCCCGGAAGAGTATC	AAAC <sup>5</sup>	324-343	NED	59.8
AD6	145	F:TGAAGATTTCTGTATTCCATGGTT R:TCTTGCCCGTGGTACTCAAT	AT <sup>6</sup>	135- 146	FAM	58.9
AD7	201	F:AAACGTAAGCAGACGCCAAC R:AAGATTCCGACCCAACACAG	AC <sup>6</sup>	152-163	FAM	60.3
AD8	172	F:AAGAGAGGCAGAAATCACGG R:CGATGAGACTGAGGTGGTCA	AG <sup>14</sup>	326-353	PET	59.4
AD9	113	F:GCGCAAATTGTGAGAAATGA R:GCCTCCACGGAAATTGTTT	AAC <sup>7</sup>	196-216	FAM	59.9
AD10	222	F:TAACGATGAGCAAATCGACG R:ATCTTTCGTGTCGTGCTTCC	AT <sup>10</sup>	257-270	NED	60.2
AD11	165	F:CTCTGACCAATGTCAACGGAT R:ATTCTGCAGGACAATCCCAA	AG <sup>7</sup>	357-370	PET	60.4
AD12	206	F:TCGTTTCTTCTATTTATCCCGAA R:GCCGGGAGACTTGATTCTTT	AGC <sup>7</sup>	145-165	PET	60.5

## 6.6. Análisis genéticos

### 6.6.3. Estimación de la diversidad genética por locus

Después de la selección de los loci SSR, seis de ellos son dinucleótidos, dos son trinucleotido y un solo locus es tetranucleotido (**Tabla 5**). El promedio en el número de alelo ( $N_a$ ) fue de 3.481. El valor mayor se observó en el locus AD8 y AD11 con 6 y 5.6 respectivamente, mientras que los valores más bajos fueron detectados en los loci AD5 AD10 y AD12, todos con dos alelos. Por otra parte, el número de alelos efectivos ( $N_e$ )

mostró un promedio de 2.70, siendo el locus AD8 el de mayor número con 4.90, mientras que 1.51 alelos efectivo fue el valor más bajo reportado en el locus AD7.

Respecto a la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) el promedio fue de 0.49 y 0.52 respectivamente. La  $H_o$  tuvo un rango de 0 en el locus AD10 a 0.917 en el locus AD9. Mientras que los valores esperados más altos se mostraron en el locus AD8 y AD11 con 0.769 y 0.748, valores observados que son mayores a los esperados encontrándose con niveles apropiados en el equilibrio Hardy Weinberg (Pereira *et al.*, 2008).

Referente al índice de fijación (Fis) mostraron valores negativos los locis AD2 AD5 AD7 AD9 Y AD12, asumiendo un exceso de heterocigotos y los valores más acercados a 1 o positivos indican una deficiencia de heterocigotos (De Vicente *et al.*, 2004), siendo usados en ocasiones para determinar especies de poseen alta depresión endogámica (Viruel *et al.*, 2012).

No obstante, el locus AD10, no mostró heterocigosis, coincidiendo con lo reportado en sus valores de  $H_o$ . Los valores de diferenciación entre poblaciones (Fst) mostraron valores desde 0.046 (AD7) hasta 0.241(AD5) sugiriendo una moderada a alta diferenciación (**Tabla 5**). De los nueve loci SSR, cuatro se desvían significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg (AD7 AD8 AD10 y AD11).

**Tabla 5:** Estimación de parámetros genéticos por locus en *A. deceptrix*: número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivo ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), índice de fijación (Fis) y proporción de diferenciación entre población (Fst).

	NA	NE	HO	HE	FIS	FST
<b>AD2</b>	4.000	3.231	0.728	0.661	-0.101	0.116
<b>AD5</b>	2.000	1.776	0.478	0.355	-0.344	0.241
<b>AD6</b>	2.667	1.842	0.422	0.454	0.071	0.097
<b>AD7</b>	2.667	1.519	0.372	0.304*	-0.224	0.046
<b>AD8</b>	6.000	4.905	0.450	0.769*	0.415	0.142
<b>AD9</b>	4.333	3.402	0.917	0.699	-0.312	0.128
<b>AD10</b>	2.000	1.757	0.000	0.421*	1.000	0.231
<b>AD11</b>	5.667	4.153	0.628	0.748*	0.160	0.168
<b>AD12</b>	2.000	1.749	0.411	0.350	-0.175	0.182
<b>PROMEDIO</b>	3.481	2.704	0.490	0.529	0.054	0.150

Desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg: \* $p < 0,05$ ;

#### 6.6.4. Estimación de la diversidad genética en las poblaciones

Nueve marcadores específicos fueron probados en 19 muestras, 15 individuos de *A. deceptrix* pertenecientes a tres poblaciones, tres individuos de *A. conica* y una muestra de *A. manabiensis*. El número de alelos varió entre 1 (AD5 y AD12 en Machalilla) a 8 (AD8 en Tachina), con un promedio de 3 alelos. Mientras que el número de alelos efectivos presentó un rango de 1 (AD5, AD7 y AD12 en Machalilla) a 7.14 (AD8 en Tachina) cuyas medias por población fue de 2.68, 2.45 y 2.9 para Machalilla, Pedernales y Tachina respectivamente.

En los individuos colectados en Machalilla, la heterocigosidad observada fue mayor en los locis AD5, AD9 Y AD11 mostrando un valor de 0.75 para cada uno de ellos, mientras que los loci AD5 AD10 y AD12 no presentaron heterocigosidades. En Pedernales los valores más altos sobre heterocigosidad observada se mostraron en los loci AD2 AD5 y AD12 con un valor de 0.83, mientras que en Tachina el locus AD8 presentó el mayor valor de heterocigosidad observada de 0.94, estos datos tienen similitud a la  $H_o$  reportada por Escribano *et al.*, (2008b) donde los valores generados variaron de 0.73 y 0.84.

No obstante, la diversidad genética o heterocigosidad esperada presentaron un promedio de 0.53 para Machalilla y 0.61 para las poblaciones de Pedernales y Tachina, mismos valores son altos y similares a los valores de los estudios realizados en otras especies como lo ha mencionado Escribano *et al.*, (2008a) al evaluar 52 SSR en 23 accesiones de chirimoya de diferentes áreas geográficas obteniendo valores de  $H_e = 0.50$ . El locus AD2 EN Machalilla presentó los valores de heterocigosidad esperada más alto, con 0.89, al igual que el locus AD8.

Esta información está sujeta a lo mencionado por De Vicente *et al.* (2004), que la heterocigosidad esperada es la probabilidad de que en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí y se calcula al restar de una las frecuencias esperadas de homocigotos en un locus, esta se puede aplicar con cualquier marcador ya sea este dominante o codominante y su valor va de 0 a 1 y se logra maximizar cuando hay un gran número de alelos con frecuencias iguales.

Sin embargo, este locus (AD8) se desvía del equilibrio de Hardy Weinberg en las poblaciones de Machalilla y Tachina. En Pedernales, los loci AD10 y AD11 no están en equilibrio (**Tabla 6**).

**Tabla 6:** Estimación de parámetros genéticos por poblaciones en *A. deceptrix*: número de alelos (Na), número de alelos efectivo (Ne), heterocigosidad observada Ho, heterocigosidad esperada (He), índice de fijación (Fis).

Locus	Machalilla					Pedernales					Tachina				
	Na	Ne	Ho	he	Fis	Na	Ne	Ho	He	Fis	Na	Ne	Ho	He	Fis
<b>AD2</b>	5	4.5	0.75	0.89	0.181	3	2.18	0.83	0.58	-0.47	4	2.94	0.6	0.73	0.20
<b>AD5</b>	1	1	0	0	-	2	1.94	0.83	0.53	-0.66	3	2.38	0.6	0.64	0.07
<b>AD6</b>	2	2	0.50	0.57	0.142	3	1.67	0.16	0.43	0.64	3	1.85	0.6	0.51	-0.20
<b>AD7</b>	2	1	0.25	0.25	0.0	4	2.05	0.66	0.56	-0.21	2	1.21	0.2	0.2	0.0
<b>AD8</b>	5	4.5	0.25	0.89*	0.75	4	3	0.5	0.72	0.33	4	7.14	0.6	0.95*	0.40
<b>AD9</b>	3	2.9	0.75	0.75	0.0	5	3.13	1	0.74	-0.39	5	4.16	1	0.84	-0.21
<b>AD10</b>	2	2	0	0.57	1.00	2	1.8	0	0.48*	1.0	2	1.47	0	0.35	1.00
<b>AD11</b>	6	5.3	0.75	0.92	0.217	6	4	0.33	0.81*	0.61	5	3.12	0.8	0.75	-0.06
<b>AD12</b>	1	1	0	0	-	3	2.32	0.83	0.62	-0.38	2	1.93	0.4	0.53	0.27
<b>Promedio</b>	3	2.68	0.36	0.53		3.66	2.45	0.57	0.61		3.77	2.9	0.53	0.61	

Desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg: \*p<0,05

### 6.6.5. Amplificación de SSR *A. deceptrix* en otras anonáceas

El determinar si los marcadores desarrollados para *A. deceptrix* puedan servir para estudiar parte del genoma de otras especies emparentadas con el género, sería de gran beneficio, por el alto costo y trabajo en desarrollar marcadores específicos, y que estos loci desarrollados puedan ser considerados heterólogos entre especies del mismo género.

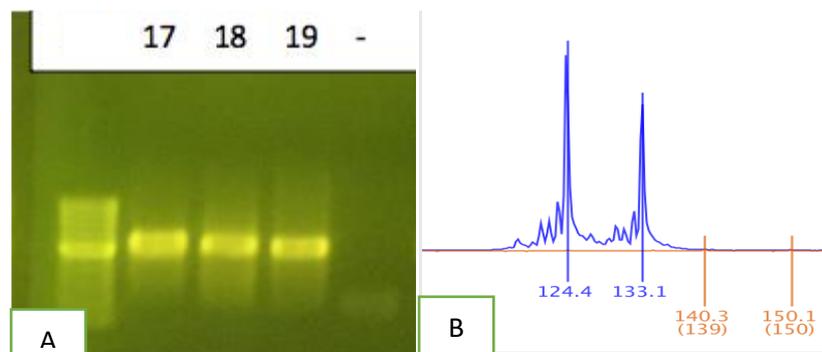
Los resultados generados por los marcadores genéticos SSR demuestran que existen rangos similares de diversidad en estas especies, es decir los marcadores desarrollados en *A. deceptrix* si amplifican en las otras especies (**Tabla 7**), tal y como ejemplo lo indica la **figura 3**, la amplificación del marcador AD9 en tres individuos de *A. conica*, identificados como; 17, 18, 19 con un tamaño de 124/133 Pb esto se debe a su relación en su entorno y cercanía, donde podrían generar un cruce y posibles migraciones, por otra parte, las amplificaciones en *A. manabiensis* tuvieron un tamaño de 286 pb, información similar se encuentra en estudios establecidos en otras especies de anonáceas, realizados por Escribano *et al.*, (2004; 2008a), donde realizaron amplificaciones de marcadores en otras especies emparentadas mostrando alta transportabilidad de genes entre especies, teniendo como ventaja su uso ya que este tipo de marcadores porque no tiene variación ambiental, sin embargo, algunos autores sugieren que la comparación entre especies se debe hacer de manera minuciosa debido al número de loci limitados presentes, escrito por (Pither *et al.*, 2003) mencionado por (Hilje, 2008) (**Figura 3**).

Al mismo tiempo los resultados obtenidos dentro de este trabajo sirven como una referencia de valores de diversidad, ya que no existen reportes en la literatura sobre la diversidad genética de *A. deceptrix* en el territorio ecuatoriano ni en ningún otro territorio del mundo.

**Tabla 7:** Amplificaciones de 9 marcadores SSR en otras anonáceas: Si amplifica (++), No amplifica (--).

Locus	<i>A. conica</i>	<i>A. manabensis</i>
AD2	++	++
AD5	++	++
AD6	++	++
AD7	++	++
AD8	++	++
AD9	++	++
AD10	++	++
AD11	++	++
AD12	++	++

**Figura 3:** A) amplificación del locus AD9 en muestras de *A. conica*. B) Electroferograma, resultado de la electroforesis por capilaridad del locus AD9 en una muestra de *A. conica*.



## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- De los 12 marcadores SSRs, nueve fueron seleccionados por tener características polimórficas siendo consistentes en algunas poblaciones evaluadas.
- Una de las poblaciones que encuentra más amenazada es la de Machalilla en la provincia de Manabí, ya que presenta menor diversidad genética
- La población que posee mayor diversidad genética se encuentra en el cantón Perdernales
- Los marcadores desarrollados si amplificaron y funcionan en especies emparentadas, entre ellas están *Annona manabiensis* y *Annona conica*.

### Recomendaciones:

- Este es un estudio pionero que provee datos muy importantes acerca esta especie, que hasta el momento se encuentra de manera natural en algunos ecosistemas y que está en peligro, sin embargo, se recomienda hacer estudios donde incluya otros aspectos y otros sitios de muestreo en donde se encuentren poblaciones naturales de *A. deceptrix*.
- Es recomendable estudiar más a fondo diversos factores, ya sean ecológicos, químicos, ambientales y moleculares que pueden estar jugando un papel importante en la diversidad y la estructura genética de esta especie y porque no, tratar de que esta especie llegue a ser domesticada ya que posee propiedades promisorias que le hacen adaptarse a una variabilidad de ambientes y localidades.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade-Torres, Antonio; Solís-Ramos, L. (2015). ¿Qué son los marcadores moleculares?, (July).
- Avvaru, A. K., Sowpati, D. T., & Mishra, R. K. (2018). Sequence analysis PERF : an exhaustive algorithm for ultra-fast and efficient identification of microsatellites from large DNA sequences, (January), 1–6.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx721>
- Azofeita-Delgado, A. (2006). Revisión Bibliográfica Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; Aplicaciones En Frutales Del Trópico 1. *Agronomía Meso Americana*, 17(2), 221–246.
- Azofeita-delgado, Á. (2006). Uso De Marcadores Moleculares En Plantas ; *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43717210%0Ahttp://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43711209>
- Baillie, J. E. M., Hilton-taylor, C., & Stuart, S. N. (2004). *2004 IUCN Red List of Threatened Species*. Retrieved from <http://data.iucn.org/dbtw-wpd/edocs/RL-2004-001.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/FDA1BB48-419E-4503-9DBF-3E12B03AA768>
- Bandera, E., & Pérez, L. (2015). MEJORAMIENTO GENÉTICO DE GUAYABO (*Psidium guajava* L.). *Cultivos Tropicales*, 36, 96–110.
- Becerra, V., & Paredes, M. (2001). USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA, *01046*, 2–4.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. (1996). GENETIX 4.04, Logiciel sous Windows TM pour la genetique des Population. Laboratorios Genoma, Poblaciones, Interacciones, CNRS UMR 5000. Montpellier, Francia: Universite de Montpellier II; 1996-2004.
- Berumen-Varela, G., Hernández-Oñate, M. A., & Tiznado-Hernández, M. E. (2019). Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata* L.). *Scientia Horticulturae*, 245(October 2018), 269–273.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.028>

- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.
- Caruccio, N., Grunenwald, H., Syed, F., & Biotechnologies, E. (2009). Nextera™ Technology for NGS DNA Library Preparation : Simultaneous Fragmentation and Tagging by In Vitro Transposition. *October, 16*(October), 4–6.
- Cornejo, Amelia, Serrato, Alejandra ., Rendon, Beatriz ., Roche, M. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*.
- Cornide, M. (2001). La Genética Vegetal, El Mejoramiento Y La Sociedad. *Cultivos Tropicales*, 22(3), 73–82.
- De Vicente, M. C., López, C., & Fulton, T. (2004). Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje. *Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI)*, 207. Retrieved from [https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/Molecular\\_Markers\\_Volume\\_2\\_es.pdf](https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_es.pdf)
- Delmas, C. E. L., Lhuillier, E., Pornon, A., & Escaravage, N. (2011). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. *American Journal of Botany*, (5), e120–e122. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000533>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Doyle, J. A. (1996). Implications d'une analyse cladistique dans l'histoire géographique des Annonaceae: Famille d'Angiospermes primitives. *Phytogéographie Tropicale, Réalités et Perspectives*, (3), 171–180.
- Doyle, James A., & Le Thomas, A. (1996). Phylogenetic analysis and character evolution in Annonaceae. *Bulletin Du Muséum National d'histoire Naturelle. Section B, Adansonia*, 18(3–4), 279–334. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2540176>
- Doyle, James A., & Le Thomas, A. (2012). Phylogeny and Geographic History of Annonaceae. *Phylogénie et histoire géographique des Annonaceae*. Phylogenie und

- geographische Geschichte der Annonaceae. *Géographie Physique et Quaternaire*, 51(3), 353. <https://doi.org/10.7202/033135ar>
- Edwards, D., & Batley, J. (2010). Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 8(1), 2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00459.x>
- Egydio Brandão, A. P. M., & Santos, D. Y. A. C. (2015). *Nutritional Value of the Pulp of Different Sugar Apple Cultivars (Annona squamosa L.)*. *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00009-X>
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6), 435–445. <https://doi.org/10.1038/nrg1348>
- Erlich, H. A. (1989). *Principles and Applications for DNA Amplification*.
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2004). Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 746–748. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00809.x>
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2008a). Comparison of different methods to construct a core germplasm collection in woody perennial species with simple sequence repeat markers. A case study in cherimoya (*Annona cherimola*, Annonaceae), an underutilised subtropical fruit tree species. *Annals of Applied Biology*, 153(1), 25–32. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00232.x>
- Escribano, P., Viruel, M. A., & Hormaza, J. I. (2008b). Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Transferability to related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. *Molecular Ecology Resources*, 8(2), 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01941.x>
- FAO. (2013). Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura, Claudio de Morisson CLÁUDIO DE MORISSON Claudio De Morisson Tupinambá, Miguel Simonetti, Antonioalerian Heilbron, MONICA de Almeida, Julio Cesar Horta César Hor. *Journal of Petrology*, 369(1), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- García, R., Pico, J., Quiroz, K., Carrasco, B., Cáceres, P., Pérez, B. C., ... Caligari, P. D. S. (2018). Development and characterization of microsatellite markers in *Gaultheria pumila* Lf. (Ericaceae). *Biological Research*, 1–4.  
<https://doi.org/10.1186/s40659-018-0193-4>
- Godoy, J. (2014). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies, (August).
- González, M. (2013). Revisión bibliográfica CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Miller), FRUTAL TROPICAL Y SUB-TROPICAL DE VALORES PROMISORIOS Review Cherimoya (*Annona cherimola* Miller), fruit-bearing tropical and subtropical of promissory values, *34*(3), 52–63.
- Guerrant, O. Havens, K., Maunder M., Donald, F. (2013). Ex Situ Conservation of Plant Genetic Resources of Major Vegetables (p. 3,21,67). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3776-5>
- Hilje Rodríguez, I. (2008). Diversidad genética del árbol *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) utilizando microsatélites como marcadores moleculares.
- Jain and S. Mohan, S. C. M. (2000). *Molecular biology of woody plants*. Kluwer Academic Publishers. ISBN: ISBN 0-7923-6012-5. Printed in Netherlands (Vol. 1). Retrieved from [http://agriculture.purdue.edu/fnr/html/faculty/Meilan/documents/Skinner\\_2000\\_Mol\\_Bio\\_Woody\\_Plants.pdf](http://agriculture.purdue.edu/fnr/html/faculty/Meilan/documents/Skinner_2000_Mol_Bio_Woody_Plants.pdf)
- Kofler, R., Schlötterer, C., & Lelley, T. (2007). SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics*, *23*(13), 1683–1685.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm157>
- Lagoda, P., & Jarne, P. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back, *5347*(October). [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- León-yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*.
- Lianming, Yuzhi Li, XiuYue zhang Yue, Bisong, D. (2013). MSDB: A User-Friendly Program for Reporting Distribution and Building Databases of Microsatellites from

- Genome Sequences, *104*(1), 154–157. <https://doi.org/10.1093/jhered/ess082>
- López de Heredia, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, *64*, 7–31. <https://doi.org/10.21630/mcn.2016.64.07>
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*, 231–249. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>
- Marsan, P., & Oldenbroek, con K. (2010). *LA SITUACIÓN DE LOS RECURSOS ZOOGENÉTICOS MUNDIALES PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-a1250s.pdf>
- Marwati, S., Academy, T., Academy, R., Trakt, S. S., Kaufmann, B. Y. K., Educational, O., ... M.M. Thackeray, P. J. J. and L. A. de P. (1977). Secuenciacion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *6*(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.06.007>
- Mokhtar, M. M., & Atia, M. A. M. (2019). SSRome : an integrated database and pipelines for exploring microsatellites in all organisms, *47*(October 2018), 244–252. <https://doi.org/10.1093/nar/gky998>
- Morillo, L., & Miño, G. (1998). INIAP -Estación Experimental Santa Catalina. *Variedades de Papa Cultivadas En El Ecuador*, 35.
- Murray, B. G. (2016). *Plant Diversity, Conservation and Use. Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00047-2>
- Pandey, M., & Sharma, J. (2013). Efficiency of microsatellite isolation from orchids via next generation sequencing. *Open Journal of Genetics*, *02*(04), 167–172. <https://doi.org/10.4236/ojgen.2012.24022>
- Pereira, M. F., Bandeira, L. F., Blanco, A. J. V., Ciampi, A. Y., & Coelho, A. S. G. (2008). Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. *Molecular Ecology Resources*, *8*(6), 1329–1331. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02275.x>

- Pico-Mendoza, J., Pinoargote, M., Madrid, L., Flor, J., Álava, J., Sancán, G., ... Quiroz, K. (2020). Germination Capacity of *Annona deceptrix* (Westra) H. Rainer (Annonaceae) an Endemic and Endangered Species in Manabí, Ecuador. *Indian Journal Of Agricultural Research*, 54(of), 329–335.  
<https://doi.org/10.18805/ijare.a-481>
- Pither, R., Shore, J. S., & Kellman, M. (2003). Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. *Heredity*, 91(3), 307–313. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800299>
- Rabelo, S. V., Quintans, J. de S. S., Costa, E. V., Guedes da Silva Almeida, J. R., & Quintans, L. J. (2015). *Annona species (Annonaceae) oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00024-9>
- Rainer, H. (2016). Nomenclatural and taxonomic notes on *Annona* ( Annonaceae )  
 Author ( s ): H . Rainer Source : *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien* . Serie B für Botanik und Zoologie Published by : Naturhistorisches Museum  
 Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/>, (2001), 513–524.
- Ranta, Esa; Lundberg, P. K. V. (2006). Ecology of Populations. In *CAMBRIDGE* (Vol. 1, p. 389).
- Raza, S., Shoaib, M. W., & Mubeen, H. (2016). Genetic Markers: Importance, uses and applications. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(3), 221–2250. Retrieved from [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)
- Rey, C. (2008). Marcadores genéticos, 576–577. Retrieved from [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_Agri/Agri\\_2008\\_909\\_576\\_577.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Agri/Agri_2008_909_576_577.pdf)
- Robertson, J. M., & Walsh-Weller, J. (1998). An introduction to PCR primer design and optimization of amplification reactions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 98(12), 121–154. <https://doi.org/10.1385/0-89603-443-7:121>
- Rodríguez, G. (2009). La secuenciación de ácidos nucleicos: una carrera contrarreloj. *Artículos de Divulgación: La Ciencia Al Alcance de La Mano*, 1–2.  
[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_RPC.2009.09.1](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_RPC.2009.09.1)

- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer 3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ. Humana Press, 132, 365–386.
- Safford, W. E. (1914). Classification of the genus *Annona* with descriptions of new y imperfectly known species. *Smithsonian Institution*, 18(1), 68.
- Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E., & Davis, R. W. (1998). platform for functional genomics, 16(July), 301–306.
- Setsuko, S., Ueno, S., Tsumura, Y., & Tomaru, N. (2005). Development of microsatellite markers in *Magnolia stellata* (Magnoliaceae), a threatened Japanese tree. *Conservation Genetics*, 6(2), 317–320. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7826-6>
- Shendure, J., & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Sierra, R., Campos, F., & Chamberlin, J. (1999). *Areas Prioritarias Para La Conservacion De La Biodiversidad En El Ecuador Continental: Un Estudio Basado En La Biodiversidad De Ecosistemas Y Su Ornitofauna*.
- Siise, A., & Massawe, F. J. (2013). Microsatellites based marker molecular analysis of Ghanaian bambara groundnut ( *Vigna subterranea* ( L .) Verdc .) landraces alongside morphological characterization, 777–787. <https://doi.org/10.1007/s10722-012-9874-y>
- Sirvent, P., & Belén, M. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR : Marcadores SSR o STR ( Simple Sequence Repeats or Short Tandem Repeats ). Microsatélites.
- Sonnante, G., Vittoria, Æ. A., Paolis, A. De, & Pignone, Æ. D. (2008). Identification of artichoke SSR markers : molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies, 1029–1046. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9310-5>
- Soto, J., & López, C. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Red de Revistas Científicas de America Latina, El Caribe, España y Portugal*, 16, 101–113.

- <https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216009> Cómo
- Teza, V. G., Fonseca, M. I., Walantus, L. H., Davalos, P., Toro, A. A., Cariagamartinez, A. E., ... Zapata, P. D. (2012). Estandarización de marcadores moleculares microsatélites para su uso en la industria forestal de Misiones , Argentina Standarization of microsatellite molecular markers for Misiones ( Argentina ) forest industry, *XIV*(1).
- Torales, S., Marcicci, S., & Harrand, L. (2005). Identificación Genética de Clones en Eucalyptus grandis Utilizando Microsatelites. *Instituto de Recursos Biologicos, CNIA,INTA Castelar*.
- Vázquez, A., Yurén, L., & Morales García, A. E. (2011). Microsatélites. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, (Hancock 1999), 75–100. Retrieved from <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/microsatelites.pdf>
- Vilanova, S., Cañizares, J., Pascual, L., Blanca, J. M., Díez, M. J., Prohens, J., & Picó, B. (2012). Application of Genomic Tools in Plant Breeding. *Current Genomics*, *13*, 179–195. <https://doi.org/10.2174/138920212800543084>
- Viruel, A., Van, P., Zonneveld, M. Van, Scheldeman, X., Escribano, P., & Siguen, M. (2012). Mapping Genetic Diversity of Cherimoya ( Annona cherimola Mill .): Application of Spatial Analysis for Conservation and Use of Plant Genetic Resources, *7*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029845>
- Westra, L. Y. T. (1995). Studies in Annonaceae. XXIV. A taxonomic revision of Raimondia Safford. *Botanische Jahrbücher Für Systematik, Pflanzengeschichte Und Pflanzengeographie*, *117*(Safford 1914), 273–297.
- Wongs-Aree, C., & Noichinda, S. (2011). *Sugar apple (Annona squamosa L.) and atemoya (A. cherimola Mill. × A. squamosa L.)*. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (Vol. 4). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857092618.399>
- Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation *Mol Ecol* 2002.pdf, *11*, 1–16. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>

## 9. ANEXOS

