

## Evaluación de la variabilidad genética del capulí (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) en tres provincias del Ecuador

Dámaris P. Intriago-Baldeón, María de Lourdes Torres,

Venancio Arahana y José Tobar

Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Edif. Charles Darwin. Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador

ltorres@usfq.edu.ec

Recibido: 24, 06, 2013; aceptado: 19, 09, 2013

**RESUMEN.-** *Prunus serotina* subsp. *capulí* es una especie arbórea, silvestre y tetraploide que se distribuye a lo largo del continente americano y está presente en el callejón interandino ecuatoriano. A pesar de su potencial económico en las industrias alimenticia, maderera y médica, existe poca información acerca de la historia y el cultivo del capulí en el país. Este estudio evaluó la diversidad genética de *P. serotina* en tres provincias de la sierra ecuatoriana. Se analizaron 88 individuos de capulí provenientes de Pichincha, Cañar y Azuay, mediante el uso de ocho marcadores microsatélites heterólogos. Se generó un dendrograma con su respectivo *bootstrap*, un análisis de coordenadas principales (PCoA), un análisis de Mantel y valores del índice de distancia genética (*Fst*). Los resultados muestran un grado moderado de variabilidad genética entre los individuos de capulí analizados, junto con un cierto nivel de diferenciación genética entre individuos siguiendo una distribución norte-sur que no está relacionado con la distancia geográfica entre las muestras analizadas. Se discuten varias hipótesis que tratan de explicar estos resultados.

**PALABRAS CLAVES:** Capulí, *Prunus serotina* subsp. *capulí*, microsatélites, variabilidad genética

**ABSTRACT.-** *Prunus serotina* subsp. *capulí* is a wild arboreal tetraploid species widely distributed throughout America and can be found in the Ecuadorian highlands. Capuli has a high economic potential for food, timber, and medicine; however, there is little information available concerning the history and development of this crop in Ecuador.

This study evaluated the genetic diversity of capulí in three provinces in the Ecuadorian highlands. A total of 88 capulí individuals from Pichincha, Cañar, and Azuay provinces were analyzed using eight heterologous microsatellite (SSR) markers. A dendrogram with its respective bootstrap analyses, a principal coordinate analysis (PCoA), a Mantel test, and *Fst* genetic distance index values were generated. The results show a moderate degree of genetic variability among capulí individuals analyzed and some level of genetic differentiation between individuals following a north-south distribution which is not related to the geographical distance among the evaluated samples. Various hypotheses that attempt to explain these results are discussed.

**KEYWORDS:** Capulí, *Prunus serotina* subsp. *capulí*, SSR markers, genetic variability

## INTRODUCCIÓN

El capulí, *Prunus serotina* subsp. *capulí* (McVaugh), es una especie frutal arbórea, silvestre y de rápido crecimiento que pertenece a la familia Rosaceae (Fresnedo-Ramírez *et al.*, 2011; Paireon *et al.*, 2008; Downey e Iezzoni, 2000; Ulloa y Moller Jorgensen, 1995). Es tetraploide ( $2n = 32$ ) y se considera que se generó a través de un proceso de aloploidización espontánea (Paireon *et al.*, 2008; Downey e Iezzoni, 2000). Tiene flores blancas dispuestas en racimos delgados, las cuales poseen cáliz lobulado semejante a un cono invertido y cinco pétalos redondos. Los frutos son drupas globosas, lampiñas, carnosas, de corteza fina, que poseen una semilla dura. Al inicio de su fase de maduración, el fruto es de color rojo oscuro; luego, adquiere una tonalidad negra rojiza (CONABIO, 2012; Mille, 1942; Popenoe y Pachano, 1922).

Entre los polinizadores principales de *P. serotina* se incluyen varias especies

de moscas (Orden Diptera), una especie de escarabajo (Orden Coleoptera) y algunas especies de abejas con inclusión de la abeja productora de miel (Orden Hymenoptera). Las semillas de capulí se dispersan por aves y mamíferos pequeños; su tasa de germinación aumenta luego de la regurgitación o defecación de estos animales (Mulligan y Munro, 1981).

Se considera que *P. serotina* es originaria de Norteamérica y que desde allí se ha distribuido al resto del continente americano desde el sur de Canadá hasta el sur de Bolivia (Fresnedo-Ramírez *et al.*, 2011; McVaugh, 1951; Popenoe y Pachano, 1922). De hecho, los registros históricos indican que el capulí fue trasladado desde México a diferentes lugares de América Latina luego de la conquista española (Mille, 1942). Sin embargo, los frutos de *P. serotina* de América del Norte son pequeños con un diámetro entre 6 a 10 mm, poco carnosos y carecen de valor comercial; mientras

que las variedades cultivadas en América Central y Sudamérica se caracterizan por producir frutos grandes con un diámetro de entre 2 a 3.5 cm, carnosos y de agradable sabor. Una hipótesis que explicaría este hecho es que las variedades de capulí con frutos grandes fueron el resultado de procesos de domesticación y selección de individuos por tamaño, sabor y calidad del fruto (Downey e Iezzoni, 2000). *P. serotina* también fue introducida en el continente europeo donde ha constituido una opción viable para lograr la forestación de zonas abiertas y el enriquecimiento del suelo (Pairen *et al.*, 2008; Auclair y Cottam, 1971).

En Ecuador, el capulí está presente a lo largo del callejón interandino, entre los 1800 a 3400 m.s.n.m, desde la provincia del Carchi localizada cerca del límite norte hasta la provincia de Loja ubicada al sur. Se concentra principalmente en las provincias centrales desde Cotopaxi hasta Azuay (Mille, 1942).

*P. serotina* tiene un óptimo crecimiento en suelos arenosos y de marga aluvial, terrenos altamente arcillosos, laderas secas y rocosas, y áreas sueltas de arenas volcánicas. Estos sitios son comunes en las altiplanicies de la sierra ecuatoriana (Popenoe y Pachano, 1922). Adicionalmente, el capulí es intolerante a la sombra por lo cual se desarrolla mejor en claros. Los árboles de capulí son entes dominantes durante la sucesión secundaria ya que proliferan en terrenos donde recientemente se han producido alteraciones o desastres naturales (CONABIO, 2012).

*P. serotina* tiene un potencial económico importante. Su madera se caracteriza por su dureza, facilidad de manejo, capacidad de adquirir un atractivo pulimento y podría ser incorporada a la industria maderera. El extracto etanólico del fruto posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas por lo cual podría ser empleado como aditivo para alimentos. Además, las infusiones elaboradas a base de sus hojas y corteza tienen propiedades medicinales (Jiménez *et al.*, 2011; Mille, 1942; Popenoe y Pachano, 1922).

En el Ecuador no existen cultivos comerciales de capulí y solo crece en jardines, parcelas familiares y en los bordes de carreteras. También, se lo planta en los bordes de terrenos donde cumple la función de cortina rompevientos. Los campesinos nativos de la región interandina cosechan los frutos de capulí para consumo familiar y comercialización a nivel local (diario "El Comercio", 2012; Palacios, 2011; Downey e Iezzoni, 2000; Popenoe y Pachano, 1922). No existe investigación sobre este frutal en el país que permita aprovechar su potencial.

La determinación de la diversidad genética de *P. serotina* subsp. *capuli* podría constituir el primer paso para conocer sobre esta especie con un uso agrícola-económico potencial en el Ecuador y emprender programas de mejoramiento genético que puedan generar variedades de capulí altamente rentables y competitivas a nivel comercial (Moose y Mumm, 2008; Budak *et al.*, 2004).

Los microsatélites o *Short Tandem Repeats* (SSR) son marcadores moleculares utilizados para realizar análisis de diversidad genética, identificación de cultivares y ejecución de programas de selección asistida por marcadores (Wang *et al.*, 2009). Los SSR se caracterizan por ser abundantes en el genoma, altamente polimórficos, reproducibles e informativos; poseen herencia codominante y son fáciles de analizar mediante PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa) (Mondini *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). A pesar de sus múltiples ventajas, el desarrollo de *primers* SSR puede ser un proceso costoso y laborioso. Este involucra el escaneo de bibliotecas genómicas con sondas marcadas y la secuenciación de los clones hibridados con el fin de poder determinar las secuencias de las regiones flanqueantes del microsatélite. Sin embargo, es posible transferir *primers* SSR entre especies filogenéticamente relacionadas dentro del mismo género o entre especies de diferentes géneros dentro de una misma familia (Wang *et al.*, 2009). Este hecho es altamente beneficioso ya que reduce substancialmente el tiempo y costos invertidos. Esto se ha comprobado en varios estudios previos realizados en distintas especies vegetales, con inclusión de *P. serotina* (Mondini *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Paireon *et al.*, 2008).

El presente estudio evalúa la variabilidad genética de *Prunus serotina* subsp. *capulí* en tres provincias del territorio ecuatoriano, mediante marcadores microsatélites heterólogos provenientes de especies emparentadas filogenéticamente con el capulí.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de estudio y recolección de muestras.-** Se recolectaron muestras de hojas de *P. serotina* subsp. *capulí* en las provincias de Pichincha, Azuay y Cañar. Estas provincias forman parte del “piso temperado o región de los valles interandinos”, que se extiende a lo largo de la cordillera de Los Andes y se caracteriza por una topografía irregular con amplios valles y hoyas separadas por nudos. Se extiende entre los 1 800 a los 3 000 m.s.n.m. (Vargas, 2002; Guevara, 1979).

En general, la temperatura promedio en la región oscila entre los 12 a los 18° C con un nivel de precipitación entre los 500 a los 2 000 mm. En la provincia de Pichincha, las temperaturas oscilan entre 3 y 26° C; en Azuay, entre 0 y 27° C; y en Cañar, entre 3 y 23° C (INAMHI, 2013; Guevara, 1979).

En cada una de las provincias, se identificaron áreas donde había presencia de árboles de capulí en base a la información de campo obtenida de los pobladores de cada lugar. Cabe recalcar que no existen cultivos agrícolas de capulí sino grupos de árboles dispersos dentro de las tres provincias. De cada área identificada, se tomó al azar una muestra de un individuo de capulí. La distancia entre áreas fue de entre 3 a 5 km. En Pichincha, el rango altitudinal de las zonas donde se colectaron las muestras fue de 2 777 a 3 028 m.s.n.m; en Azuay, de 2 252 a 2 700 m.s.n.m: y en Cañar de 2 440 y 3 181 m.s.n.m.

A cada muestra se le asignó un código específico formado por el prefijo de la provincia de origen y el número de colección (e.g. PIC 001= Pichincha 001). Se tomaron datos como lugar, provincia, fecha de colección, altitud y coordenadas geográficas. Las muestras fueron guardadas en fundas ziploc y rotuladas apropiadamente. Durante la fase de campo, las muestras se almacenaron dentro de un cooler con hielo para promover su preservación a corto plazo. A su llegada al laboratorio, las muestras de capulí fueron trasladadas a un congelador a -20° C para su conservación a largo plazo. En total, se colectaron 88 muestras de capulí en las tres provincias: 33 en Pichincha, 25 en Cañar y 30 en Azuay.

**Extracción de ADN.-** Se extrajo ADN a partir de las hojas de capulí mediante un protocolo basado en el detergente CTAB (Kieleczawa, 2006). Luego de la extracción, se determinó la concentración y calidad del ADN mediante un espectrofotómetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific) y electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Previo a la ejecución de los análisis moleculares, se realizaron diluciones de las muestras *stock* de ADN hasta alcanzar una concentración de 20 ng/ $\mu$ l.

**Amplificación de ADN y electroforesis.-** Se evaluó la eficiencia de transferibilidad de 12 pares de *primers* SSR

originalmente diseñados para genomas de especies filogenéticamente relacionadas con *P. serotina* subsp. *capulí* como el durazno (*Prunus persica* L. (Batsch)), la cereza dulce ("sweet cherry"-*Prunus avium* (L.) L.) y la cereza agria ("sour cherry"-*Prunus cerasus* L.) (Dirlewanger *et al.*, 2002; Downey e Iezzoni, 2000; Testolin *et al.*, 2000). Los pares de *primers* que generaron productos de amplificación en capulí fueron utilizados para evaluar las 88 muestras.

Las reacciones de PCR tuvieron un volumen final de 10  $\mu$ l y consistieron en 20–40 ng/ $\mu$ l de ADN, *buffer* PCR 1X (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.2 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen), 0.5 mM de dNTP's y 0.2 mM de cada *primer* (F y R) (Downey e Iezzoni, 2000). El programa de amplificación se efectuó en un termociclador T-Personal (Biometra) y consistió de una desnaturalización inicial de 95° C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 45 segundos, *annealing* de 48-63° C (según el primero) por 1 minuto, extensión de 45 segundos a 72° C y una extensión final de 8 minutos a 72° C (Cipriani *et al.*, 1999). Las secuencias de cada uno de los pares de *primers* y sus temperaturas de *annealing* se describen en la Tabla 1. Los productos de PCR fueron resueltos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % y visualizados mediante tinción con nitrato de plata (Benbouza *et al.*, 2006).

**Tabla 1**

Primers SSR heterólogos seleccionados para evaluar la diversidad genética en individuos de *Prunus serotina* subsp. capulí de Pichincha, Cañar y Azuay

Código del Primer y referencia	Secuencia (5'-3')	Especie de origen	Número de alelos*	Temperatura de annealing (°C)
PceGA34 (Downey e Iezzoni, 2000)	F:GAACATGTGGTGTGCTGGTT R:TCCACTAGGAGGTGAAATG	Cereza agria ("Sour Cherry")	10	60
PS12A02 (Downey e Iezzoni, 2000)	F:GCCACCAATGGTTCTTC R:AGCACCAGATGCACCTGA	Cereza dulce ("Sweet Cherry")	4	62
pchpgms3 (Downey e Iezzoni, 2000)	F:ACGCTATGTCCGTACCATCTCCATG R:CAACCTGTGATTGCTCCTATTTAAAC	Durazno	8	60
pchgms2 (Downey e Iezzoni, 2000)	F:GTCAATGAGTTCAGTGTCTACTC R:AATCATAACATCATTAGCCACTGC	Durazno	5	52
UDP98-410 (Testolin <i>et al.</i> , 2000)	F:AATTTACCTATCAGCCTCAAA R:TTTATGCAGTTTACAGACCG	Durazno	4	49
UDP96-001 (Testolin <i>et al.</i> , 2000)	F:AGTTGATTTTCTGATGCATCC R:TGCCATAAGGACCGGGATGT	Durazno	7	56,3
BBPCT-017 (Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002)	F:TTA AGA GTT TGT GAT GGG AAC C R:AAG CAT AAT TTA GCA TAA CCA AGC	Durazno	4	53,2
UDP98-416 (Testolin <i>et al.</i> , 2000)	F:TTT TCT CAG CAG CCA AAC AA R:ATG TTT CGT GCT TCT GCT CC	Durazno	7	56

\*Este número se refiere a los alelos encontrados en este estudio

**Análisis de datos.-** Los alelos de los loci evaluados fueron visualizados como fragmentos de apariencia doble y documentados como (0) para ausencia y (1) para presencia. Se elaboró una matriz binaria con los datos moleculares de los individuos de las tres provincias. Se empleó el software NTSYS-pc 2.11 (Rohlf, 2008) para generar un dendrograma mediante matrices de similitud y el método UPGMA con el fin de poder determinar agrupamientos entre individuos. Para el análisis de *Bootstrap*, se empleó el programa WINBOOT (Yap y Nelson, 1996) con el propósito de evaluar el nivel de confiabilidad de los agrupamientos mostrados por el dendrograma. El software DARwin 5.0.158 (*Dissimilarity Analysis and Representation for Windows*) (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) fue utilizado para realizar un análisis de coordenadas

principales (PCoA) que permite ver la dispersión de los individuos en un eje de coordenadas. Además, se empleó el programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 1997) para calcular el índice *Fst* que indica los niveles de diferenciación genética entre los individuos de las tres provincias estudiadas. Finalmente, se utilizó el paquete estadístico GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) para realizar un análisis de Mantel que permite evaluar la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética presente entre los individuos colectados.

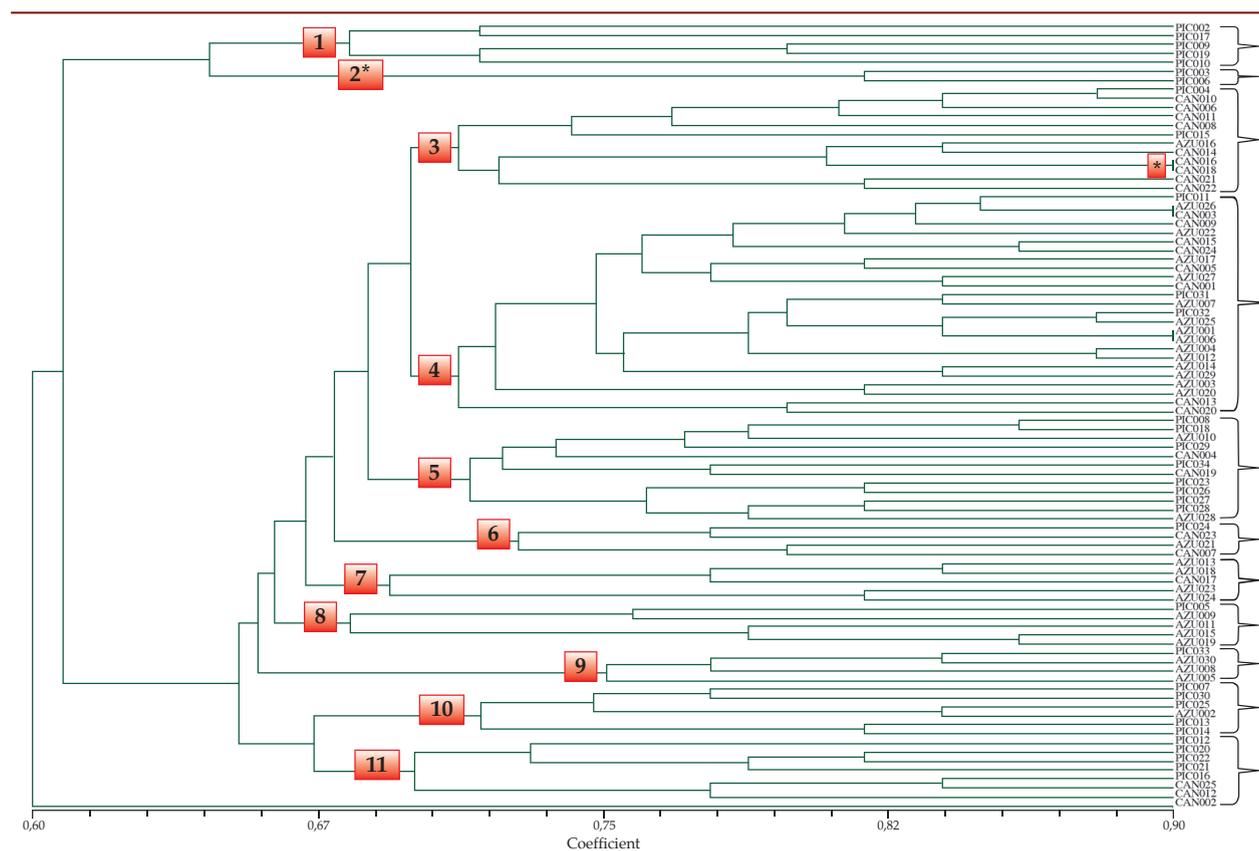
## RESULTADOS

Ocho de los doce (66.7 %) pares de primers SSR heterólogos probados mostraron amplificación exitosa en los 88 individuos colectados.

En los 88 individuos, provenientes de las tres provincias, se encontró un total de 49 alelos. El número de alelos por locus osciló entre 4 y 10 y es el par de *primers* PceGA34 proveniente de *P. cerasus* L., el más informativo con 10 alelos y los pares de *primers* PS12A02, UDP98-410, y BBPCT-017, provenientes de *P. avium* (L.) L. y *P. persica* L. (Batsch), los menos informativos con cuatro alelos cada uno. El promedio de alelos para los ocho loci SSR fue de 6.13 alelos por locus (Tabla 1).

se agrupan de forma estricta de acuerdo con su provinciadeorigen. Delos 11 clústeres encontrados, solo dos incluyen individuos provenientes de una misma provincia. El resto de clústeres están formados por mezclas de individuos provenientes de dos o tres provincias. El índice de similitud es de 0.694. Los valores de *bootstrap* indican que solo dos de los agrupamientos presentes en el dendrograma (uno formado por dos individuos de Pichincha y el otro formado por dos individuos de Cañar) son confiables (>70 %) (Baldauf, 2003).

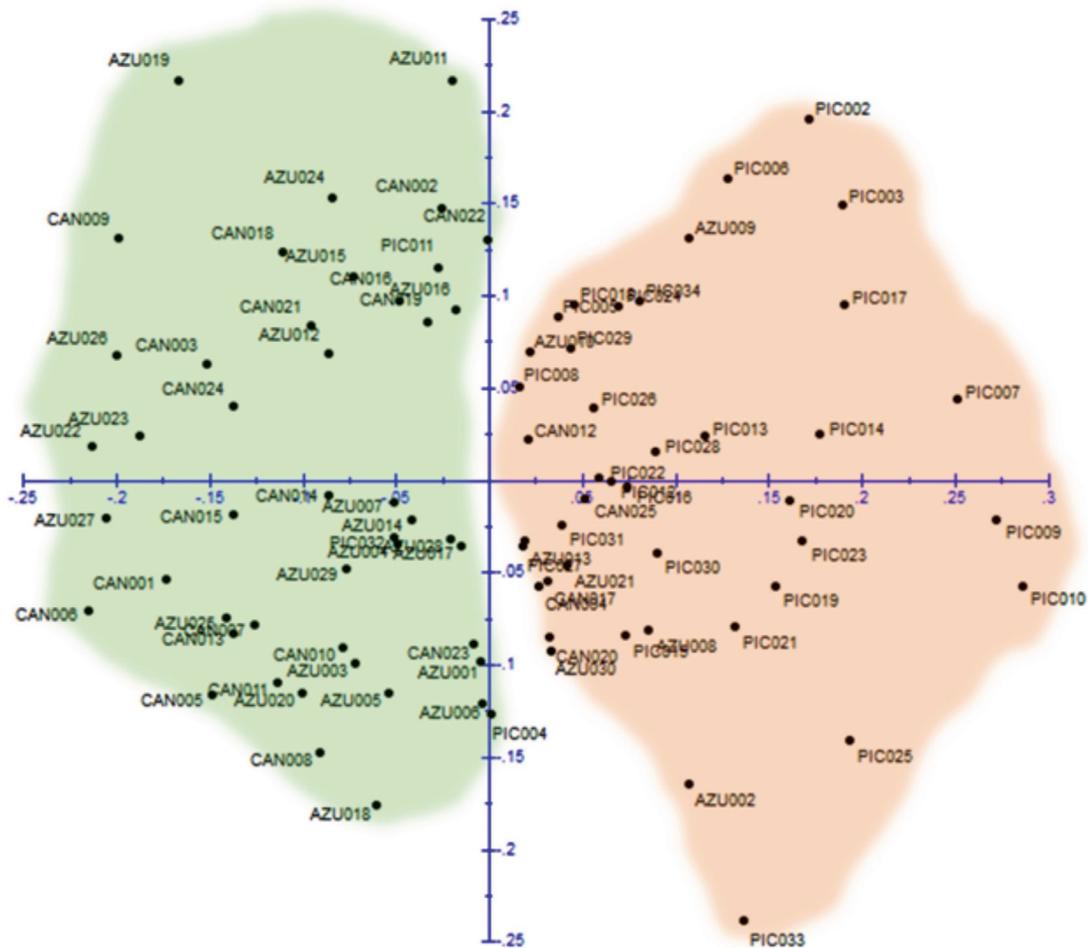
El dendrograma UPGMA de similitud (Figura 1) muestra que los individuos no



**Figura 1.** Dendrograma de similitud UPGMA que muestra el agrupamiento de los individuos de *P. serotina* subsp. *capuli* de Pichincha, Cañar y Azuay. El coeficiente de similitud global aproximado fue de 0.694. Se identificaron 11 grupos y las provincias que los conforman se detallan al lado derecho del gráfico. Se usó el "software" NTSYS-pc 2.11. PIC = Pichincha, CAN = Cañar, y AZU = Azuay. \*Agrupamientos con *Bootstrap* significativo.

El análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 2) muestra una dispersión amplia de los individuos a lo largo de los dos ejes (X: -0.25 a 0.25 y Y: -0.25 a 0.25). Se visualiza una tendencia de agrupación de individuos provenientes de Cañar y Azuay en los cuadrantes superior e inferior izquierdos del gráfico, mientras que la

mayoría de los individuos de Pichincha ocupan los cuadrantes superior e inferior derechos del gráfico. Estos resultados podrían sugerir una posible diferenciación de los individuos de las tres provincias en dos grupos de acuerdo con su distribución geográfica norte-sur.



**Figura 2.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) que muestra el grado de dispersión de los individuos de *P. serotina* subsp. *capulí* provenientes de Pichincha (PIC), Cañar (CAN), y Azuay (AZU) en un eje de coordenadas XY. Se usó el "software" DARwin 5.0.158.

Según los parámetros de interpretación propuestos por Balloux y Lugon-Moulin, (2002), los valores del índice  $F_{st}$  de diferenciación genética entre los individuos de las tres provincias ( $\alpha = 0.05$ ) indican que no existe un nivel significativo de diferenciación genética entre los capulíes de Cañar y Azuay ( $F_{st} = 0.053$ ,  $p = 0.144$ ) mientras que hay un alto nivel de diferenciación genética entre los capulíes de Pichincha y Cañar ( $F_{st} = 0.218$ ,  $p = 0.000$ ) y un moderado nivel de diferenciación genética entre Pichincha y Azuay ( $F_{st} = 0.081$ ,  $p = 0.000$ ).

Finalmente, el análisis de Mantel mostró una ausencia de correlación ( $R^2 = 0.064$ ,  $p = 0.001$ ) entre las variables distancia geográfica y distancia genética de los capulíes provenientes de las tres provincias estudiadas.

## DISCUSIÓN

Estudios previos han constatado la alta eficiencia de transferibilidad de *primers* SSR dentro de las especies del género *Prunus*. También se ha observado que el nivel de transferibilidad se reduce en cierta proporción si se emplean estos *primers* para analizar especies pertenecientes a otros géneros dentro de la familia Rosaceae (Wang *et al.*, 2012; Mnejja *et al.*, 2010). El grado de transferibilidad de los *primers* SSR heterólogos seleccionados para este estudio (66.7 %) se acerca a los niveles registrados por investigaciones previas realizadas con este mismo propósito dentro del género *Prunus* (Wang *et al.*, 2012; Mnejja *et al.*, 2010; Downey e Iezzoni, 2000).

En seis de los ocho pares de *primers* SSR utilizados en este estudio (Tabla 1), el número de alelos es menor que el documentado para estos mismos seis pares de *primers* en tres estudios previos que analizaron individuos de *P. serotina*, *P. pérsica* L. (Batsch) y *P. persica* var. *nucipersica* (Dippel). Así, cuatro de los ocho pares de *primers* empleados en esta investigación fueron utilizados también por Downey e Iezzoni (2000) para evaluar 66 individuos de *P. serotina* provenientes del Estado de Michigan (Estados Unidos) (6), México (50), y Ecuador (10) y encontraron un número mayor de alelos (*primer* PceGA34, 14 alelos; *primer* PS12A02, 12 alelos; *primer* pchpgms3, 19 alelos; y *primer* pchgms2, nueve alelos). Otros tres pares de *primers* fueron evaluados también por Dirlewanger *et al.* (2002), en 27 cultivares de *P. persica* L. (Batsch) originarias de Estados Unidos (15), Francia (11) e Italia (1) y en el caso del par de *primers* BBPCT-017 encontraron un mayor número de alelos (5). El par de *primers* UDP98-410 fue utilizado también por Testolin *et al.* (2000) para evaluar 50 cultivares de importancia en los mercados occidentales de *P. persica* L. (Batsch) y *P. persica* var. *nucipersica* (Dippel), y encontraron ocho alelos. Solo dos pares de *primers* (UDP96-001 y UDP98-416) dieron un número de alelos mayor en la presente investigación que en el estudio realizado por Testolin *et al.* (2000). Para el *primer* UDP96-001, ese estudio reportó seis alelos, mientras que para el *primer* UDP98-416 se reportaron cuatro alelos.

Esto podría indicar que el *pool* genético de *P. serotina* en las tres provincias de la

sierra ecuatoriana posee una base genética más estrecha que la reportada para otras latitudes y especies.

La información alélica obtenida durante este estudio sugiere que existe un grado moderado de variabilidad genética en el capulí en las tres provincias analizadas. Sin embargo, se requiere ampliar este estudio preliminar con inclusión de individuos de las otras provincias que también conforman el callejón interandino con el fin de adquirir una visión más acertada sobre la diversidad genética de *P. serotina* en la sierra ecuatoriana.

El dendrograma de similitud UPGMA (Figura 1) no muestra una tendencia general de agrupamiento de individuos por su lugar de origen. Solo dos clústeres están conformados por individuos de una misma provincia. Este patrón también ha sido observado en estudios moleculares realizados en otras especies del género *Prunus* como *P. mume* Sieb. et. Succ. (conocido como albaricoque japonés o ciruela china), *P. armeniaca* (Lam.) Koch (albaricoque) y *P. davidiana* (Carr.) Franch (Cheng *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2004; Zhebentyayeva *et al.*, 2003), en los cuales siguiendo una lógica similar a la del presente estudio, se incluyeron individuos procedentes de distintas áreas geográficas que fueron analizados con *primers* SSR y no se pudo identificar agrupamientos por área de origen.

Cheng *et al.* (2011) evaluó 192 accesiones de *P. davidiana* (Carr.) Franch, provenientes de siete poblaciones distintas,

originarias de cuatro provincias de China. Además, Gao *et al.* (2004) analizó diecinueve cultivares de *P. mume* Sieb. et. Succ. provenientes de China y cinco originarios de Japón. Finalmente, Zhebentyayeva *et al.* (2003) evaluó 74 accesiones de *P. armeniaca* (Lam.) Koch provenientes de cuatro regiones geográficas: Europa (15), la zona Irano-Caucásica (10), China (11) y Asia Central (32). Los autores de los estudios mencionados, concluyeron que los resultados obtenidos sugerían que las progenies del mismo lugar provenían de diferentes progenitores y que habría entrecruzamiento entre poblaciones.

En esta investigación se encontró solo dos grupos con valores de *bootstrap* superiores al 70 %, por lo cual la inclusión de otros marcadores moleculares para analizar más *loci* dentro del genoma del capulí podría contribuir a obtener dendrogramas que posean un mayor número de agrupamientos con altos valores de confiabilidad (Koskinen *et al.*, 2004).

En el análisis de coordenadas principales (PCoA) (Figura 2), se observa una gradiente de diversidad con tendencia a la formación de dos grupos. Un grupo que incluye a individuos de Pichincha y otro con individuos de Cañar y Azuay. Cabe recalcar que estos no son grupos discretos ya que pocos individuos de Pichincha están presentes en el grupo de Cañar y Azuay, mientras que algunos individuos de Cañar y Azuay forman parte del grupo de Pichincha. Esto reflejaría un cierto grado de diferenciación genética entre la provincia

del norte (Pichincha) y las del sur (Cañar y Azuay). Los valores *Fst* encontrados en este estudio respaldan este patrón de distribución. El análisis de Mantel no encontró una correlación estadísticamente significativa entre las distancias geográficas y genéticas existentes entre los individuos de capulí analizados.

Al interpretar los resultados obtenidos en este estudio, se puede sugerir un cierto grado de diferenciación genética entre individuos pertenecientes a la provincia del norte (Pichincha) con los de las provincias del sur (Cañar y Azuay). No obstante, la distancia geográfica no es el factor que explica la distancia genética encontrada entre ambas zonas. Este análisis tendría que corroborarse con un estudio más amplio que abarque individuos del capulí del resto de las provincias de la sierra ecuatoriana.

Las formas de dispersión de las semillas de capulí donde intervienen factores biológicos y antropogénicos podrían explicar parcialmente los resultados obtenidos en esta investigación. Un factor biológico a considerar es la dispersión de semillas de *P. serotina* a través de las aves o pequeños mamíferos. Esta dinámica ecológica ya ha sido descrita en investigaciones previas realizadas en América del Norte (Morden-Moore y Willson, 1982; Mulligan y Munro, 1981). Sin embargo, no hay estudios que hayan documentado estas interacciones biológicas en el Ecuador.

Entre los factores antropogénicos que podrían estar involucrados en la

dispersión de semillas de capulí en la sierra ecuatoriana, se puede mencionar al comercio regional de frutos de capulí. Se ha reportado que los campesinos de la región interandina recogen frutos de *P. serotina* que crecen en sus parcelas o en campos abiertos y luego los llevan a los mercados. Además, algunas personas conservan semillas de individuos de capulí que provienen de otras provincias y que producen frutos de buena calidad para sembrarlas en los jardines de sus casas. Finalmente, los consumidores de esta fruta compran los frutos de *P. serotina* provenientes de diferentes provincias y botan las semillas en distintos terrenos (J. Tobar, comunicación personal, 22 abril 2013; diario "El Comercio", 2012; Downey e Iezzoni, 2000; Mille, 1942; Popenoe y Pachano, 1922).

Se requieren estudios ecológicos, datos económicos y reportes antropológicos sobre el uso y manejo del capulí en la sierra ecuatoriana para corroborar las ideas propuestas en este estudio.

La información de este estudio debería ampliarse al análisis de individuos de *P. serotina* provenientes del resto de provincias del callejón interandino. De esta forma, se podría tener un panorama completo acerca de la diversidad genética del capulí en Ecuador. Los resultados de estas investigaciones podrían ser empleados posteriormente para determinar la factibilidad de programas de mejoramiento genético de este frutal que posee un interesante potencial agrícola y económico para el país.

## CONCLUSIONES

- En esta investigación, se comprobó la eficiencia de amplificación de regiones microsatélites en *Prunus serotina* subsp. *capulí*, con el empleo de *primers* SSR provenientes de especies filogenéticamente relacionadas con el capulí.

- Se encontró un nivel moderado de variabilidad genética en las 88 muestras de individuos de capulí provenientes de Pichincha, Cañar y Azuay y un cierto grado de diferenciación genética entre los individuos de capulí de la provincia del norte (Pichincha) y las provincias del sur (Cañar y Azuay) los cuales no están relacionados con la distancia geográfica.

- Factores biológicos como la dispersión de semillas entre provincias por medio de aves y pequeños mamíferos junto con factores antropogénicos como la movilización de semillas por el comercio regional de frutos de capulí y los sembríos esporádicos de *P. serotina* en jardines de casas y otros terrenos podrían explicar los resultados obtenidos.

- Se requieren investigaciones acerca de la ecología y dinámicas humanas que giran en torno al capulí en Ecuador para poder corroborar las ideas propuestas en este estudio.

- Un análisis de diversidad genética que abarque individuos de todas las provincias de la sierra ecuatoriana contribuiría a entender mejor la distribución de *P. serotina* en el Ecuador.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la IFS, *International Foundation For Science* (Suecia), y por la Universidad San Francisco de Quito USFQ (Ecuador) (*Chancellor Grant* 2012). Agradecemos a Juan José Guadalupe por su valioso apoyo y contribuciones durante la ejecución de este proyecto. A Bernardo Gutiérrez y Jennifer Fiallos por sus comentarios a este manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Auclair A y Cottam G. 1971. Dynamics of black cherry (*Prunus serotina* Erhr.) in Southern Wisconsin oak forests. *Ecological Monographs*, **41** (2): 153–177.
- Baldauf SL. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *TRENDS in Genetics*, **19**: 345-351.
- Balloux F y Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**: 155–165.
- Benbouza H, Jacquemin J-M, Baudoin J-P y Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap, and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, **2**: 77–81.
- Budak H, Bolek Y, Dokuyucu T y Akkaya A. 2004. Potential Uses of Molecular Markers in Crop Improvement. KSU

- Journal of Science and Engineering*, **7**: 75–79.
- Cheng Z, Gasic K, Wang Z y Chen X. 2011. Genetic diversity and genetic structure in natural populations of *Prunus davidiana* germplasm by SSR markers. *Journal of Agricultural Science*, **3**: 114–125.
- Cipriani G, Lot G, Huang W-G, Marrazzo MT, Peterlunger E y Testolin R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* (L) Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**: 65–72.
- Comisión Nacional para el conocimiento y el uso de la biodiversidad (CONABIO). 2012. *Prunus serotina*. Página de Internet: [www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arbolesdoctos/60rosac6m.pdf). Consultada 24-febrero-2013.
- Diario “El Comercio”. 2012. El capulí es un fruto andino que se desarrolla y degusta en la serranía. Página de internet [www.elcomercio.com/agromar/capuli-andino-desarrolla-degusta-Serrania\\_0\\_652134912.html](http://www.elcomercio.com/agromar/capuli-andino-desarrolla-degusta-Serrania_0_652134912.html). Consultada 21-agosto-2013.
- Dirlewanger E, Cosson P, Tavaud M, Aranzana, MJ, Poizat C, Zanetto A, Arus Py Laigret F. 2002. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, **105**: 127–138.
- Downey SL, y Iezzoni AF. 2000. Polymorphic DNA Markers in Black Cherry (*Prunus serotina*) Are Identified Using Sequences from Sweet Cherry, Peach, and Sour Cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **125**: 76–80.
- Fresnedo-Ramírez J, Segura S y Muratalla-Lua A. 2011. Morphovariability of capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) in the central-western region of Mexico from a plant genetic resources perspective. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **58**: 481–495.
- Gao Z-H, Shen Z-J, Han Z-H, Fang J-G, Zhang Y-M y Zhang Z. 2004. Microsatellite markers and genetic diversity in Japanese Apricot (*Prunus mume*). *HortScience*, **39**: 1571–1574.
- Guevara, RD. 1979. Capítulo Séptimo-Región de los Valles Interandinos. En: *Principios Fundamentales de Ecología Ecuatoriana*: 57-70. Gráficas MediaVilla HNOS. Quito.
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI). 2013. Mapas Climáticos del Ecuador. Página

- de Internet: [www.inamhi.gob.ec/index.php/tiempo/mapas](http://www.inamhi.gob.ec/index.php/tiempo/mapas). Consultada: 30-agosto-2013.
- Jiménez M, Castillo I, Azuara E y Beristain CI. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp. *capulí*) extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **10**: 29–37.
- Kieleczawa J. 2006. DNA Sequencing II Optimizing Preparation and Cleanup. Jones and Bartlett Publishers. Ontario. 362 pp.
- Koskinen MT, Hirvonen H, Landry P-A y Primmer CR. 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas*, **141**: 61–67.
- McVaugh R. 1951. A revision of the North American Black Cherries (*Prunus serotina* Ehrh. and Relatives). *Brittonia*, **7**: 279–315.
- Mnejja M, Garcia-Mas J, Audergon J-M, y Arus P. 2010. *Prunus* microsatellite marker transferability across rosaceous crops. *Tree Genetics & Genomes*, **6**: 689–700.
- Morden-Moore AL y Willson MF. 1982. On the ecological significance of fruit color in *Prunus serotina* and *Rubus occidentalis*: field experiments. *Canadian Journal of Botany*, **60**: 1554–1560.
- Mille L. 1942. El Capulí. En: *FLORA*, **2**:50–51. Instituto de Ciencias Naturales del Ecuador. Quito.
- Mondini L, Noorani A y Pagnotta M. 2009. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. *Diversity*, **1**: 19–35.
- Moose S y Mumm R. 2008. Molecular Plant Breeding as the Foundation for 21<sup>st</sup> century crop improvement. *Plant Physiology*, **147**: 969–977.
- Mulligan GA y Munro DB. 1981. The biology of Canadian weeds. 51. *Prunus virginiana* L. and *P. serotina* Ehrh. *Canadian Journal of Plant Science*, **61**: 911–992.
- Pairon M., Jacquemart A y Potter D. 2008. Detection and Characterization of genome specific Microsatellite markers in Allotetraploid *Prunus serotina*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **133**: 390–395.
- Palacios W. 2011. Árboles del Ecuador-Ministerio del Ambiente del Gobierno Nacional de la República del Ecuador. Primera edición. Grupo Comunicacional Efigie. Quito. 923 pp.
- Peakall R y Smouse P E. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Página de Internet: [www.biology.anu.edu.au/GenA1Ex/Welcome.html](http://www.biology.anu.edu.au/GenA1Ex/Welcome.html). Consultada 28-agosto-2013.

- Perrier X, Jacquemoud-Collet, JP. 2006. Darwin software. Página de Internet: [www.darwin.cirad.fr](http://www.darwin.cirad.fr). Consultada 21-febrero-2013.
- Popenoe W y Pachano A. 1922. The capulin cherry. *Journal of Heredity*, **13**: 50–62.
- Rohlf, FJ. 2008. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.20*. Exeter Publishing. Ltd. Setauket.
- Schneider S, Kueffer J-M, Roessli D y Excoffier L. 1997. ARLEQUIN ver. 1.1. A software for population genetics data analysis. Página de Internet: [www.anthropologie.unige.ch/arlequin](http://www.anthropologie.unige.ch/arlequin). Consultada 4-Marzo-2013.
- Testolin R, Marrazzo T, Cipriani G, Quarta R, Verde I, Dettori MT, Pancaldi M y Sansavini S. 2000. Microsatellite DNA in peach and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, **43**: 512–520.
- Ulloa Ulloa C y Moller Jorgensen P. 1995. *Árboles y arbustos de Los Andes del Ecuador*. Segunda edición. Ediciones Abya Yala. Quito. 329 pp.
- Vargas M. 2002. *Ecología y Biodiversidad del Ecuador*. Primera edición. E. P. Centro de Impresión. Quito. 232 pp.
- Wang H, Walla JA, Zhong S, Huang D y Dai W. 2012. Development and cross-species/genera transferability of microsatellite markers discovered using 454 genome sequencing in chokecherry (*Prunus virginiana* L.). *Plant Cell Reports*, **31**: 2047–2055.
- Wang M, Barkley N y Jenkins T. 2009. Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology. *Genes, Genomes, and Genomics*, **3**: x-y.
- Yap VI y Nelson RJ. 1996. *WINBOOT: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms*. International Rice Research Institute. Manila.
- Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Gorina VM y Abbott AG. 2003. Simple sequence repeats (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, **106**: 435–444.