

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ACCESIONES DE MANDARINA
CITRUS SPP DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE LA ESTACIÓN
EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE DELINIAP

Autor:

CRISTIAN ALEXANDER ZAMBRANO MENDOZA

Director:

SIMÓN PÉREZ MARTÍNEZ

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Cristian Alexander Zambrano Mendoza** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Manejo de recursos genéticos en la agricultura y ganadería** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Proyecto de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, **22 de mayo del 2024**



Firmado electrónicamente por:
**CRISTIAN ALEXANDER
ZAMBRANO MENDOZA**

Cristian Alexander Zambrano Mendoza

0803852557

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Milagro, 15 de abril del 2024

Por medio de la presente yo PEREZ MARTINEZ SIMON certifico haber acompañado en el desarrollo del trabajo de titulación en calidad de profesor tutor, al maestrante **CRISTIAN ALEXANDER ZAMBRANO MENDOZA**, con el tema: "**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ACCESIONES DE MANDARINA CITRUS SPP DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE DEL INIAP**". En el cual se realizaron 8 tutorías, las mismas que se encuentran registradas en el Sistema de Gestión Académica.

Además, notifico que el Trabajo de Titulación cumple con los parámetros de calidad y forma requeridos por el programa de **MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MODALIDAD HÍBRIDA**, cumpliendo con el porcentaje de originalidad del 1.0%.

Pongo de manifiesto que autorizo la entrega del documento desarrollado a los entes pertinentes para proceder a la revisión y posterior defensa del Trabajo de Titulación presentado por el maestrante.



Atentamente,
PEREZ MARTINEZ SIMON, Msc.
C.I. 0960298784

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
DIRECCIÓN DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. ZAMBRANO MENDOZA CRISTIAN ALEXANDER**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ACCESIONES DE MANDARINA CITRUS SPP DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TROPICAL PICHILINGUE DEL INIAP", las siguientes calificaciones:

| | |
|--------------------|------------------|
| TRABAJO ESCRITO | 51.83 |
| SUSTENTACIÓN | 37.50 |
| PROMEDIO | 89.33 |
| EQUIVALENTE | Muy Bueno |



Firmado electrónicamente por:
**JOSE HUMBERTO VERA
RODRIGUEZ**

Mgs VERA RODRIGUEZ JOSE HUMBERTO
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**LUIS EDUARDO CAGUA
MONTANO**

Mgs CAGUA MONTAÑO LUIS EDUARDO
VOCAL



Firmado electrónicamente por:
**CESAR STALIN GAVIN
MOYANO**

Mgs GAVIN MOYANO CESAR STALIN
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi tutor de tesis, Simón Pérez Martínez, por su invaluable orientación, paciencia y apoyo durante todo el proceso de investigación y redacción de esta tesis. Su conocimiento y experiencia han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Además, a Elisa Quiala y Ricardo Moreira que se han convertido en mis mentores y guías en el arduo camino de la ciencia.

Agradezco a la Universidad Estatal de Milagro UNEMI por brindarme la oportunidad de realizar esta maestría y por el apoyo constante durante mi formación académica.

Mis más sinceros agradecimientos a mis compañeros de clase, cuyo apoyo y camaradería han sido invaluableles durante este viaje.

Finalmente, pero no menos importante, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia. A mi esposa Ruth, a mis padres, Lorgio y Marisela, y a mi hermano, Jonathan, por su amor incondicional, su apoyo constante y su fe en mí. Este logro es tanto suyo como mío.

Resumen

La presente tesis aborda la caracterización molecular de accesiones de mandarina *Citrus spp.* del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP, enfatizando la relevancia de los bancos de germoplasma en la conservación de la diversidad genética y la importancia del cultivo de mandarinas en el país. La caracterización se llevó a cabo mediante el uso de marcadores moleculares cloroplásticos concatenados (*matk*, *rbcL* y *trnH-psbA*). La metodología empleada incluye la extracción de ADN, la amplificación por PCR y la secuenciación de los marcadores seleccionados, lo que facilita la identificación de variaciones genéticas significativas entre las accesiones para analizar la variabilidad genética y la estructura poblacional de las mandarinas.

El objetivo principal es determinar la variabilidad genética dentro de las accesiones e identificar posibles duplicados o clasificaciones erróneas, lo cual es fundamental para el fitomejoramiento y la conservación de recursos genéticos. Los resultados indican una diversidad genética significativa entre las accesiones estudiadas, lo que sugiere un potencial considerable para programas de mejoramiento y conservación. Además, se identificó un caso de clasificación errónea, resaltando la importancia de una caracterización molecular precisa para la gestión eficiente de los bancos de germoplasma. Este estudio contribuye al conocimiento de la diversidad genética de las mandarinas y proporciona una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones en biotecnología agrícola.

Palabras clave: Banco de germoplasma, *Citrus*, marcadores cloroplásticos.

Abstract

This thesis addresses the molecular characterization of mandarin *Citrus* spp. accessions from the germplasm bank of the Tropical Experimental Station Pichilingue of INIAP, emphasizing the relevance of germplasm banks in the conservation of genetic diversity and the importance of mandarin cultivation in the country. The characterization was carried out using concatenated chloroplastic molecular markers (*matk*, *rbcL*, and *trnH-psbA*). The methodology employed includes DNA extraction, PCR amplification, and sequencing of the selected markers, which facilitates the identification of significant genetic variations among the accessions to analyze the genetic variability and population structure of the mandarins.

The main objective is to determine the genetic variability within the accessions and identify possible duplicates or misclassifications, which is fundamental for plant breeding and the conservation of genetic resources. The results indicate significant genetic diversity among the studied accessions, suggesting considerable potential for breeding and conservation programs. In addition, a case of misclassification was identified, highlighting the importance of precise molecular characterization for the efficient management of germplasm banks. This study contributes to the knowledge of the genetic diversity of mandarins and provides a solid foundation for future research and applications in agricultural biotechnology.

Key words: Germplasm bank, *Citrus*, Chloroplast markers

Índice

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Derechos de autor | 1 |
| Aprobación del director del Trabajo de Titulación | 2 |
| Aprobación del tribunal calificador | 3 |
| AGRADECIMIENTOS | 4 |
| Resumen..... | 5 |
| Abstract | 6 |
| Introducción | 9 |
| Capítulo I: El problema de la investigación | 10 |
| 1.1. Planteamiento del problema | 10 |
| 1.2. Delimitación del problema | 12 |
| 1.3. Formulación del problema | 12 |
| 1.4. Objetivos | 12 |
| Objetivo general | 12 |
| Objetivos específicos | 13 |
| 1.5. Justificación..... | 13 |
| CAPÍTULO II: Marco teórico referencial | 14 |
| 2.1. Antecedentes | 14 |
| 2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación | 16 |
| 2.2.1. Los cítricos y su importancia | 16 |
| 2.2.2. Variabilidad genética de los cítricos | 16 |
| 2.2.2. Utilización de los recursos de los bancos de germoplasma | 18 |
| 2.2.4. Caracterización con marcadores moleculares | 20 |
| 2.2.5. Secuenciamiento Sanger | 24 |
| CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 3.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN CLOROPLÁSTICO DE MANDARINA..... | 24 |
| 3.1.1. Material vegetal | 24 |
| 3.1.2. Extracción de ADN cloroplastídico y PCR | 25 |
| 3.1.3. SECUENCIAMIENTO SANGER Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS | 26 |

| | |
|--------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 27 |
| 4.1 ANÁLISIS DEL ADN CLOROPLÁSTICO..... | 27 |
| 4.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENES | 29 |
| CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 34 |
| 5.1 CONCLUSIONES | 34 |
| 5.2 RECOMENDACIONES | 34 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 36 |
| ANEXOS | 48 |

Introducción

El género *Citrus*, que incluye mandarina, naranja, limón, pomelo y lima, tiene un alto valor económico y nutricional. Este género pertenece a la subfamilia Aurantioideae, que es una de las 7 subfamilias de la familia Rutaceae. Los cítricos son el cultivo frutícola más importante del mundo, con una producción mundial anual de más de 143.8 millones de toneladas (FAO, 2021). De ellas, las mandarinas son el segundo cultivo de cítricos más importante del mundo, poseyendo una mayor adaptación climática entre los cítricos cultivados.

El Ecuador tiene un gran potencial para el cultivo de cítricos, tanto para el consumo local como para la exportación. Además, se cultivan diversas variedades de cítricos incluido de mandarinas (Zabala, 2021). A pesar de esto, existe escasa información a nivel molecular, que se pueda utilizar con fines de caracterización de los bancos de germoplasma presentes en el país para que las distintas variedades puedan ser utilizadas con fines de mejoramiento genético de una manera más eficiente.

Uno de los mecanismos más confiables para identificar especies se basa en el análisis genético y particularmente en el procedimiento de código de barras de ADN que consiste en la comparación de secuencias altamente conservadas ubicadas en el ADN nuclear ribosómico (Sun et al., 2020) o plástidico (Penjor et al., 2013). Al estar altamente conservados, estos fragmentos acumulan mutaciones lentamente y es posible diseñar cebadores universales que puedan usarse para distinguir muchas especies. Además, muchas bases de datos (PubMed, GenBank) recogen y almacenan millones de secuencias, que pueden compararse mediante un software específico (BLAST) con secuencias desconocidas (Steinegger & Salzberg, 2020). Al consultar adecuadamente una base de datos de ADN proporciona, junto con el alineamiento, un índice de similitud que puede ser útil para identificar especies o incluso subespecies, dependiendo de la proximidad de la identidad taxonómica.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en torno a las actividades del proyecto FIASA-EELS-2022-008¹. Específicamente del **Componente 1², Act. 1.9³**. Financiado por el

¹ Fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético mediante herramientas biotecnológicas aplicadas en cinco cultivos de interés agrícola.

² Establecer protocolos de regeneración de plantas vía embriogénesis somática en diferentes cultivos agrícolas de interés económico para el Ecuador

³ Identificación de genotipos de mandarina para la obtención de materiales sin semilla

fondo FIASA (Fondo de Investigación para la Agrobiodiversidad, Semillas y Agricultura Sustentable).

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1. Planteamiento del problema

En el Ecuador, se ha evidenciado un notable aumento en la producción de cítricos en los últimos años de 22.886 Ha en 2016 a 27.474 Ha en 2019, así mismo un aumento en la producción anual teniendo un incremento de 104.215 Ton hasta 153.360 Ton en 2019 (Orrego et al., 2021). Esto debido al gran potencial agrícola que posee nuestro país cuya optimización se plantea como ente dinamizador para reducir la pobreza en los sectores rurales (Viteri & Tapia, 2018), en este caso los cítricos han demostrado poder aprovechar ese potencial. Posee potencial para producir cítricos, se cultiva tanto en provincias de la costa y de la sierra, en orden descendente las provincias que poseen una mayor producción son: Manabí, Los Ríos, Bolívar, Guayas, Pichincha y Tungurahua (Valarezo et al., 2014)

Según el MAG, (2017) la producción de mandarinas a nivel nacional fue de 40,318 toneladas. Aunque no se dispone de datos exactos sobre la cantidad de mandarinas producidas en 2022, se puede hacer una estimación aproximada basándose en los datos disponibles. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), los agricultores pueden producir entre 50.000 y 70.000 unidades de mandarinas por hectárea. La producción de mandarinas es un componente que puede dinamizar la economía agrícola del país para lo cual el aprovechamiento de la diversidad genética en los bancos de germoplasma enfocada en trabajos de fitomejoramiento se vuelve un eje fundamental. Pero para poder aprovechar el recurso fitogenético es necesario una caracterización molecular de los bancos de germoplasma.

Los bancos de germoplasma juegan un papel crucial en la conservación de la diversidad genética de las especies. Estas instalaciones, conservan y proporcionan acceso a material vegetal vivo, como semillas, bulbos, polen y esporas. Los bancos de germoplasma son esenciales para salvaguardar el patrimonio genético florístico y proteger nuestra seguridad alimentaria. Además, ofrecen una fuente invaluable de material genético para la investigación y el mejoramiento de cultivos (Peres, 2016)

La conservación tanto de la flora se desarrolla en dos principales vías: dentro del hábitat natural (conservación *in situ*) y fuera del mismo (conservación *ex situ*). La conservación *ex situ*, en colecciones, es la aplicación de una amplia variedad de recursos, técnicas e infraestructuras especializadas que contribuyen a la recuperación y sobrevivencia de

individuos o poblaciones fuera de su hábitat. Los bancos de germoplasma desempeñan un papel fundamental en la preservación (Lascuráin et al., 2009). Garantizando la conservación a largo plazo de la diversidad genética, con la finalidad de facilitar el acceso para fines de investigación y mejoramiento genético (Priyanka et al., 2021). Como lo mencionan Morales et al., (2022) una de las claves para llevar un adecuado proceso de fitomejoramiento es: la identificación de los parentales adecuados y la selección de características deseables en plantas, como resistencia a enfermedades (Tiwari et al., 2022), adaptación a condiciones ambientales cambiantes (Henry, 2020) y mejor rendimiento agrícola (Khaki et al., 2020).

En el caso de los cítricos, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) posee un banco de germoplasma que cuenta con 69 accesiones de *Citrus* spp (Tapia et al., 2008). con 6 accesiones de mandarinas (Tabla 1). Teniendo en consideración el potencial económico de los cítricos en el país (Valarezo et al., 2014) y la importancia de los bancos de germoplasma en cuanto al mejoramiento genético, se vuelve crucial una adecuada caracterización de cada una de las accesiones, desde el punto de vista agronómico y molecular. Un punto crucial para la conservación de cualquier especie es la comprensión de su estructura genética (Carreras et al., 2020).

Los cítricos representan uno de los cultivos más significativo a nivel mundial, generando una producción mundial anual que supera los 143.8 millones de toneladas (FAO, 2021). Entre ellos, las mandarinas se posicionan como el segundo cultivo de cítricos más destacado globalmente, destacándose por su adaptabilidad climática superior en comparación con otros cítricos cultivados.

A escala mundial, las mandarinas presentan la tasa de crecimiento más elevada, con un promedio anual del 5,5%. Bajo estas circunstancias, los productores de cítricos enfrentan la necesidad de nutrir los bancos de germoplasma para ayudar a la conservación y al mejoramiento. Ecuador cuenta con un potencial para la producción de mandarinas, debido a su diversidad geográfica, permitiendo cosechas a lo largo de todo el año según las diversas variedades disponibles (Zabala, 2021).

En el Ecuador existe escasa información en relación a estudios de diversidad genética de cítricos, además de no ser conocida la variabilidad genética ni la estructura poblacional de las accesiones de las mandarinas localizadas en los bancos de germoplasma. La caracterización molecular es una herramienta esencial en los programas de mejoramiento genético. Ya que, permite un mejor uso de los recursos genéticos al proporcionar una comprensión detallada de la diversidad genética de una población (Plaza et al., 2015). Los

marcadores moleculares, como los que se utilizarán en este trabajo (*matk*, *rbcL* y *trnH-psbA*), son ideales para estudios de diversidad genética y para la identificación distintos cultivos vegetales, ya que han sido previamente validados en el género *Citrus* (Gori et al., 2019).

1.2. Delimitación del problema

Esta investigación se enfoca en la caracterización molecular de 6 accesiones de mandarinas *Citrus* spp. del banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue. La caracterización molecular con la ayuda de tres marcadores de tipo cloroplástico, va a ayudar a caracterizar filogenéticamente a nivel molecular cada una de las accesiones de mandarinas del banco de germoplasma del INIAP.

1.3. Formulación del problema

El banco de germoplasma del INIAP localizado en la estación experimental tropical Pichilingue cuenta con 69 accesiones de cítricos de las cuales 6 corresponden a mandarinas. Como ya se mencionó el cultivo de cítricos presenta un gran potencial económico para nuestro país, pero para explotar adecuadamente ese potencial y optimizar los trabajos de mejoramiento genético es necesario comprender la estructura genética de las accesiones localizadas en el banco de germoplasma. Un punto crucial para la conservación de cualquier especie es la comprensión de su estructura genética.

Para una adecuada identificación genética de cada uno de los genotipos, es necesario utilizar métodos fiables, por lo cual el empleo de técnicas de biología molecular proveyendo datos más fiables, incrementando la precisión de la caracterización varietal, dado que los marcadores moleculares ofrecen información a nivel de nucleótidos. En el Ecuador existe escasa información en relación a estudios de diversidad genética de cítricos y en específico de mandarinas, de tal modo no es conocida la variabilidad genética ni la estructura poblacional de las accesiones de mandarinas localizadas en el banco de germoplasma. La implementación de marcadores moleculares además de ayudar a la organización de las accesiones puede ayudar a evitar duplicados o una incorrecta clasificación en las introducciones.

1.4. Objetivos

Objetivo general

Caracterizar molecularmente la diversidad genética del banco de germoplasma de mandarina de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.

Objetivos específicos

1. Determinar la variabilidad genética de las accesiones de mandarinas de banco de germoplasma de la EETP a del uso de marcadores moleculares.
2. Identificar duplicados y accesiones erróneas las diferentes variedades de mandarinas identificadas en el banco de germoplasma de la EETP del INIAP.

1.5. Justificación

En nuestro país se cultivan diversas variedades de mandarinas, tanto como para el comercio local como para exportación. Además, tomando en cuenta que las distintas variedades son cultivadas bajo las más diversas condiciones climáticas y en distintos pisos altitudinales. Existe escasa información a nivel molecular, que se pueda utilizar con fines de caracterización o mejoramiento genético de las variedades cultivadas en el país. Por lo cual este trabajo de investigación propone la realización de la una caracterización molecular de las distintas variedades de mandarinas del banco de germoplasma de la EETP, la caracterización molecular será llevada a cabo con cebadores previamente utilizados y reportados en la bibliografía para el establecimiento de árboles filogenéticos en cítricos.

La utilización de marcadores moleculares se erige como un recurso esencial para esclarecer las variaciones genéticas presentes entre las introducciones de mandarinas en el banco de germoplasma de cítricos de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP en Ecuador. Este enfoque también brinda herramientas cruciales para la identificación a nivel molecular de accesiones duplicadas dentro del banco de germoplasma del INIAP. Esta capacidad resulta fundamental para racionalizar las labores de conservación, permitiendo una gestión óptima de los recursos humanos y financieros disponibles en nuestro contexto local. Adicionalmente, la comprensión de la taxonomía, las relaciones filogenéticas y la diversidad genética del género *Citrus* adquiere especial relevancia para proyectar trabajos de mejoramiento genético.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1. Antecedentes

Los bancos de germoplasma son instalaciones que resguardan la diversidad genética de especies vegetales, actuando como repositorios vivos de la historia evolutiva y el potencial adaptativo de las plantas (FAO, 2021). Su importancia se fundamenta en tres pilares: Conservación de la biodiversidad, Seguridad alimentaria y Mejora genética.

En nuestro país se han llevado a cabo estudios de caracterización de diferentes especies de importancia local en distintos bancos de germoplasma del país: tomate de árbol *Cyphomandra betacea* (Chalampunte & Prado, 2005), Capuli (*Prunus serótina*) (Monteros et al., 2013), café robusta (*Coffea canehora*) (Plaza et al., 2015), quinua (*Cephanodium quinoa*) (Murillo et al., 2002), uvilla (*Physalis peruviana L.*) (Vaca, 2006), frejol arbustivo (*Phaseolus vulgaris L.*) (Hermosa, 2010), maní (*Arachis hypogaea L.*) (Izurieta, 2010), ají (*Capsicum spp.*) (Cervantes, 2007), maíz (*Zea mays*) (Cruz, 2003), pastos amazónicos (Benítez et al., 2017) y papa nativa (*Solanum tuberosum*) (Carranza et al., 2015). Los estudios de nuestro país se han llevado a cabo con dos enfoques, la caracterización para un adecuado manejo de las accesiones y la caracterización como base para trabajos de mejoramiento genético (Plaza et al., 2015).

La caracterización molecular de bancos de germoplasma y es fundamental para la conservación y gestión de recursos genéticos vegetales. La aplicación de marcadores moleculares en este contexto permite elucidar la diversidad genética, filogeografía y relaciones evolutivas de las especies (Wu et al., 2018). Entre los marcadores cloroplásticos utilizados para tales fines, se encuentran: el gen *rbcL*, el espaciador intergénico *trnH-psbA* y el gen *matk*.

El gen *rbcL*, que codifica para la subunidad grande de la enzima rubisco, ha sido ampliamente empleado en estudios filogenéticos de plantas debido a su conservación y utilidad como marcador de ADN cloroplástico (Li et al., 2019). Asimismo, el espaciador intergénico *trnH-psbA* ha sido destacado por su alta variabilidad y capacidad para resolver relaciones filogenéticas a diferentes niveles taxonómicos en plantas (Taberlet et al., 1991). Por otro lado, el gen *matk*, que codifica para la subunidad *matk* de la ADN polimerasa, ha sido reconocido por su elevada tasa de variación y su papel en la delimitación de especies y estudios de filogenia (Hilu et al., 2003).

En conjunto, el uso de las secuencias *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* han sido reportados para la caracterización molecular a nivel de especies, híbridos y variedades de diferentes especies y géneros, como es el caso de *Actinia* que es un género particularmente difícil de trabajar pero en el estudio realizado por Weihong et al., (2018), determinaron la eficiencia de este grupo de marcadores cloroplásticos que fueron trabajados en combinación, como él es caso de *matk + rbcL* que mostró un nivel de caracterización a nivel intraespecífico, resultados similares fueron reportados en los géneros *Calamus* (H. Yang et al., 2012), resultados similares se observaron en cuanto la familia *Actinidia* (Weihong et al., 2018b), Apocynaceae (Cabelin & Alejandro, 2016a), *Camelia* (Ho et al., 2023).

Del mismo modo y a nivel de subespecie tienen un alto grado discriminatorio en subespecies de *Rye* (Skuza et al., 2019) y de un modo más específico a nivel de cultivares como es el caso de *Ficus larica L.* (Castro et al., 2015). En cítricos este grupo de marcadores ya ha sido reportado en estudios a nivel de especie lo hicieron (Gori et al., 2019; Mahadani & Ghosh, 2014; Viglietti et al., 2019), del mismo modo se ha estudiado la diversidad genética y filogenia del género *Citrus*. Por ejemplo, Wu et al. (2018) emplearon en conjunto los marcadores *rbcL* y *matk* para investigar la filogeografía de las mandarinas silvestres en China, revelando patrones de divergencia genética y migración histórica. Del mismo modo, estudios como el de Li et al. (2019) utilizaron el espaciador *trnH-psbA* para identificar variedades de mandarinas y evaluar su diversidad genética en diferentes regiones.

Hablando de los trabajos realizados en mandarinas, Wu et al. (2018) utilizaron los marcadores moleculares *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* para reconstruir la filogenia del género *Citrus*. El estudio encontró que las mandarinas se ubican en un clado hermano del grupo de las naranjas y de las toronjas. Por otro lado, diversos tipos de marcadores han sido utilizados ya sea de manera independiente; SSR (Froelicher et al., 2008b), RAM's (Martinez, 2013), ISSR (Castañeda et al., 2021) y de manera conjunta: morfológica y molecular (RFLP y RAPD) (Koehler-Santos et al., 2003), SSR y SRAP (Kacar et al., 2013) y del conjunto de marcadores morfológicos y marcadores moleculares AFLP (E. Tapia et al., 2005).

La utilización del genoma cloroplástico no solo es útil para la caracterización molecular, sino también para estudios más específicos como es el caso de la identificación de genes asociados a la resistencia a factores tanto bióticos como abióticos, en este sentido un estudio realizado por Liu et al. (2020) utilizó los marcadores moleculares *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* para mapear genes de resistencia a la tristeza de los cítricos en mandarinas. El estudio

encontró que dos genes, uno ubicado en el cromosoma 1 y otro en el cromosoma 9, estaban asociados con la resistencia a la enfermedad. Los resultados del estudio pueden ser utilizados para desarrollar nuevas variedades de mandarinas resistentes a esta enfermedad.

2.2. Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1. Los cítricos y su importancia

Los cítricos representan uno de los cultivos más significativo a nivel mundial, generando una producción mundial anual que supera los 143.8 millones de toneladas (FAO, 2021). Entre ellos, las mandarinas se posicionan como el segundo cultivo de cítricos más destacado globalmente, destacándose por su adaptabilidad climática superior en comparación con otros cítricos cultivados.

A escala mundial, las mandarinas presentan la tasa de crecimiento más elevada, con un promedio anual del 5,5%. Bajo estas circunstancias, los productores de cítricos enfrentan la necesidad de nutrir los bancos de germoplasma para ayudar a la conservación y al mejoramiento.

Ecuador cuenta con un potencial para la producción de mandarinas, debido a su diversidad geográfica, permitiendo cosechas a lo largo de todo el año según las diversas variedades disponibles (Zabala, 2021). El país cultiva una amplia gama de mandarinas destinadas tanto al consumo local como a la exportación. Provincias como Manabí, Los Ríos, Bolívar, Guayas, Pichincha y Tungurahua lideran la producción de cítricos (Caicedo, 2020). Además, es importante tener en cuenta que las diversas variedades se cultivan en condiciones climáticas y altitudes variadas.

2.2.2. Variabilidad genética de los cítricos

Un factor clave para la adaptabilidad de las especies frente a factores bióticos y abióticos es la variabilidad en la diversidad genética de las poblaciones (Yonekura et al., 2007). La diversidad se manifiesta por diferencias, a nivel de fenotipo o de genotipo, y en el caso de las variaciones en el genotipo, estos cambios se dan a nivel de nucleótido (Sallam et al., 2018). De este modo, estos cambios producen diferencias en las secuencias de aminoácidos que pueden verse reflejados en variaciones estructurales de las proteínas transcritas, lo que finalmente representa cambios morfológicos o de comportamiento que causan diferencias en la tasa reproductiva, sobrevivencia o comportamiento individual (Rousselle et al., 2020)

Dentro de especies, las diferencias interpoblacionales son bastantes variables. Estas dependen de la especie, la biología reproductiva, la diversidad ambiental y los rasgos específicos de los genes (Buckley et al., 2022). La diversidad en la estructura poblacional, resulta relevante para la conservación de los recursos genéticos, ya que determina la forma en la cual la variación genética es dividida entre y dentro de poblaciones (Ipinza et al., 2011). En plantas, las características que podrían influenciar la distribución de la variación genética incluirían:



Figura 1. Semilla poliembriónica de mandarina. De izquierda a derecha se muestra la manera en la que una semilla poliembriónica de mandarina se fracciona en distintos segmentos.

En el género *Citrus* se clasifica de manera general con el esquema taxonómico de Swingle (Ollitrault et al., 2020). Basándose en características morfológicas y componentes químicos de distintas estructuras morfológicas como: hojas, flores y frutos, la clasificación de Swingle divide al género *Citrus* en dos subgéneros: *Citrus* (10 especies) y *Papeda* (6 especies).

Algunas de las características de las especies del género *Citrus* son la reproducción asexual dada por las características de sus semillas poliembriónicas *Fig1.* que contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones nucelares que son apomíticas genéticamente idénticas a la planta madre (Davis y Albrigo, 1994), alta frecuencia de mutaciones y, además todas las especies del género *Citrus* son sexualmente compatibles, existiendo hibridación interespecífica (Kim et al., 2020; Wang et al., 2022). Debido a estas características, existe una gran diversidad alélica y heterocigosidad dentro del género (Froelicher et al., 2008a). Fenotípicamente, las mandarinas destacan como uno de los grupos más diversos dentro del género *Citrus*. La variabilidad genética constituye un elemento fundamental en la biodiversidad, y su importancia se reconoce ampliamente en el ámbito de las plantas cultivadas desempeñando un papel crucial en los procesos de mejora genética (Salgotra & Chauhan, 2023).

2.2.2. Utilización de los recursos de los bancos de germoplasma

La elaboración de programas destinados al perfeccionamiento genético centrado en una o múltiples características específicas requiere la existencia de un germoplasma debidamente caracterizado, lo cual facilita una planificación efectiva. No solo contribuyen a la mejora genética, sino que los bancos de germoplasma enriquecen las investigaciones en diversas disciplinas como la fisiología, biología y fitopatología. Los resultados obtenidos en estas áreas pueden, a su vez, abrir nuevas vías de investigación para los programas de mejoramiento, generando un impacto significativo en los programas de mejoramiento.

El INIAP ha desarrollado acciones en favor de la conservación ex situ de la agrobiodiversidad desde 1978. Este instituto oficializó la investigación, conservación y servicio a la comunidad en el tema de la agro-biodiversidad, con la creación del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF) en 1990 (Paredes et al., 2018), ha conformado el Banco de Germoplasma que conserva 28 000 accesiones de 290 géneros y más de 500 especies de plantas cultivadas y sus parientes silvestres.

La diversidad de los recursos genéticos son un bien preciado teniendo en consideración la seguridad alimentaria y la capacidad productiva de un país, debido a esto su conservación, se debe considerar como prioritaria y necesaria (Muluneh, 2021). En el año 2001, se firmó el Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, en el cual se resalta la importancia de conservación y uso de los recursos Fitogenéticos, así como actividades de incremento, caracterización, evaluación y registro para la producción de alimentos con un enfoque de diversificación, razón por la cual los bancos de germoplasma se constituyen en el actor principal para la conservación de estos recursos (Sonnino, 2017)

2.2.3. Caracterización de recursos fitogenéticos

Una de las responsabilidades centrales asociadas a los bancos de germoplasma es llevar a cabo una caracterización meticulosa de los materiales presentes. Esta tarea es esencial para la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad agrícola. La caracterización de los recursos fitogenéticos implica la determinación de un conjunto de caracteres a través de la aplicación de descriptores específicos definidos para cada especie (Hernández, 2013)

En el ámbito del manejo de recursos fitogenéticos, el término "descriptor" hace referencia al conjunto de parámetros diseñados para definir unidades de datos (Hernández, 2013) Este proceso riguroso permite la identificación precisa de las características genéticas, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las especies vegetales. La caracterización morfológica, a pesar de ser una práctica tradicional, es fundamental para la identificación y clasificación de las variedades según rasgos visibles como la forma, el tamaño y el color de las plantas (Apaza, 2021).

Por otro lado, la caracterización bioquímica, que implica el análisis de compuestos como proteínas y enzimas, proporciona información valiosa sobre los procesos metabólicos y la composición química de las plantas, lo que resulta crucial para identificar rasgos nutricionales o farmacológicos (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2014). En paralelo, la caracterización fisiológica evalúa la capacidad de las plantas para sobrevivir y prosperar bajo diversas condiciones de estrés, como la sequía o la salinidad, información vital para el desarrollo de variedades resistentes y adaptadas al cambio climático (Mahajan & Tuteja, 2005)

En el ámbito agronómico, la caracterización se enfoca en la evaluación de la productividad, calidad de la cosecha y adaptabilidad a diferentes sistemas de cultivo, datos fundamentales para los programas de mejoramiento genético que buscan desarrollar cultivos con rendimientos superiores y mayor calidad (Moose & Mumm, 2008). Además, la citogenética proporciona información sobre la estructura y función de los cromosomas, crucial para comprender la herencia genética y posibles alteraciones cromosómicas que pueden afectar el desarrollo de las plantas (Sarvamangala et al., 2011).

La caracterización morfológica, aunque útil, puede ser influenciada por factores ambientales, lo que resalta la necesidad de complementarla con métodos más estables como los marcadores moleculares (Poczai et al., 2013) Estos últimos, que incluyen técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el análisis de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs), proporcionan una visión detallada de la diversidad genética y permiten la identificación de características genéticas específicas relacionadas con la resistencia a enfermedades o la adaptabilidad a condiciones ambientales adversas (Jarma-Orozco et al., 2023)

La integración de todas estas técnicas ofrece una comprensión completa de los recursos fitogenéticos, esencial para su conservación y uso sostenible. La información obtenida a través de la caracterización es una herramienta invaluable para científicos y mejoradores, que trabajan incansablemente para garantizar la seguridad alimentaria y el desarrollo de cultivos resilientes ante los desafíos actuales y futuros.

2.2.4. Caracterización con marcadores moleculares

En el siglo XIX y principios del XX, los primeros marcadores empleados por los seres humanos se fundamentaban en rasgos fenotípicos hereditarios, regulados por genes. En esa época, estos marcadores se concebían como entidades abstractas que influían en la transmisión de características hereditarias de padres a descendientes (Patwarhan et al., 2014). A partir de estudios basados en la disposición nucleotídica, nace un nuevo tipo de marcadores, fácilmente detectables, no influenciados por el ambiente y que se encuentran a lo largo de un genoma. Surgen así, los marcadores moleculares, definidos simplemente como sitios de algún tipo de variación neutral del ADN (Adhikari et al., 2017).

En la actualidad, existen muchos tipos de marcadores, que son producidos por una amplia variedad de técnicas y usados en proyectos de diversidad, mapeo genómico y selección asistida por marcadores. La mayoría de los códigos de barras de ADN vegetal se encuentran en el genoma del cloroplasto, ya sea dentro de secuencias codificantes como *rbcLa* y *matk* o en regiones intergénicas *trnH-psbA*, aunque algunos loci nucleares también se han utilizado como códigos de barras de ADN vegetal (Dong et al., 2012).

2.2.4.1. Marcadores moleculares basados en el genoma cloroplástico

El genoma cloroplástico es una secuencia de ADN circular bicatenario, con un tamaño de entre 120 y 180 kb, que codifican principalmente enzimas implicadas en la fotosíntesis. Tiene una estructura cuatripartita integrada por la región LSC (*Large Single Copy*), la región SSC (*Small Single Copy*), las regiones IR (*Inverted Repeats*) y la región IGS (*Intergenic Spacer*) (Turudić et al., 2021). La región LSC, la más extensa, alberga genes fundamentales para la fotosíntesis y otras funciones vitales del cloroplasto, incluidos genes como *rbcL*, *psbA*, *matk* y *atpA*. Por otro lado, la región SSC contiene genes relacionados con la expresión génica y la traducción, como *rpoA*, *rps16* e *infA* (Dobrogojski et al., 2020). Las regiones IR, presentes en dos copias idénticas e invertidas, contribuyen a la estabilidad del genoma plastidial y facilitan la recombinación homóloga. Mientras tanto, la región IGS,

situada entre las regiones LSC y SSC, contiene genes implicados en la regulación de la expresión génica y la respuesta al estrés (Jost & Wanke, 2024).

Estas secuencias son específicas para el ADN del cloroplasto y, por tanto, se usan como marcadores que permite identificar diferencias genéticas entre accesiones de mandarinas a un nivel más preciso que los marcadores nucleares (Yang et al., 2021). El ADN del cloroplasto tiene una tasa de evolución más rápida que el ADN nuclear (C. Li et al., 2020; Sun et al., 2020), lo que significa que los marcadores moleculares cloroplásticos son más sensibles para detectar diferencias genéticas entre accesiones de mandarinas (Orduz et al., 2010)

Los marcadores moleculares cloroplásticos se heredan únicamente de la madre, lo que permite realizar estudios de linaje materno y comprender mejor la historia evolutiva de las mandarinas (Yang et al., 2021). En conjunto, los marcadores moleculares cloroplásticos *matK*, *rbcL* y *trnH-psbA* son herramientas poderosas para la caracterización de germoplasma de mandarinas. La información generada por estos marcadores puede ser utilizada para la conservación del germoplasma, el desarrollo de nuevas variedades de mandarinas y la mejora de la competitividad del sector cítrico (Cabelin & Alejandro, 2016a).

2.2.4.2. Región Matk

El gen *matK*, también conocido como “*Maturase K*” o *orfK*, desempeña un papel fundamental en la investigación filogenética y la exploración de la diversidad genética en plantas. Este gen se encuentra en el genoma cloroplástico y reside en la región de copia única grande (LSC) (Udensi et al., 2017). Codifica una proteína esencial para la maduración del cloroplasto y la biosíntesis de clorofila. Además de su función en la maduración del cloroplasto, el gen *matK* codifica la enzima *Maturase*, que contribuye a la conformación y maduración de un ARN de transferencia específico en los cloroplastos (Diaz & Quilachamin, 2023). La posición del gen *matK* es especialmente interesante: se encuentra entre los exones 5' y 3' de *trnK* (tRNA-lisina) dentro de un intrón del Grupo II. La función principal del gen *matK* es codificar una proteína que facilita el empalme in vivo de intrones. Esto es esencial para la expresión génica adecuada en los cloroplastos (Callano, 2022). Su denominación como “*Maturase K*” refleja su papel como Maturasa de intrones en los cloroplastos. La longitud del gen *matK* varía según la especie, pero generalmente abarca alrededor de 1,550 pb (Aristya et al., 2020).

La región 3' del gen es relativamente conservada, mientras que la región 5' es menos conservada. Esta variabilidad permite utilizar dos conjuntos de caracteres en diferentes niveles taxonómicos. Es útil para investigaciones en filogenia ya que, a pesar de la divergencia evolutiva considerable entre grupos de plantas, el gen *matK* proporciona información filogenética robusta y confiable (Aristya et al., 2020). Su alta tasa de sustitución nucleotídica en ciertas secciones lo convierte en un marcador valioso para inferir relaciones filogenéticas (Diaz & Quilachamin, 2023). Además, la secuencia de este gen es fácilmente amplificable mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), lo que simplifica su uso en estudios de diversidad genética en grandes conjuntos de muestras vegetales (Cabelin & Alejandro, 2016b).

2.2.4.3. Region *rbcL*

El gen *rbcL*, también conocido como el gen de la subunidad grande de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO), desempeña un papel crucial en la biología de las plantas. Este gen se encuentra en el genoma cloroplástico de las células vegetales y codifica la subunidad grande de RuBisCO (Yao et al., 2019). RuBisCO es una enzima esencial en el proceso de fijación de carbono durante la fotosíntesis en plantas, algas y cianobacterias. Su función principal es catalizar la unión de dióxido de carbono (CO₂) a ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP) para formar compuestos orgánicos, una reacción esencial para la fijación de carbono y la producción de azúcares en las plantas (Sen et al., 2011).

Aunque el tamaño exacto del gen *rbcL* puede variar entre diferentes especies, generalmente se encuentra en el rango de los 1500 pares de bases, codificando una proteína de aproximadamente 475 aminoácidos (Lin et al., 2013). Su secuencia es fácilmente amplificable mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), lo que simplifica su uso en estudios de diversidad genética en grandes conjuntos de muestras vegetales (Bowman et al., 2013).

Debido a su alta conservación y su importancia funcional, el gen *rbcL* es útil como un marcador molecular en estudios filogenéticos para entender las relaciones evolutivas entre diferentes especies de plantas (Zhao et al., 2017). La secuencia del *rbcL* se utiliza para inferir relaciones filogenéticas entre diferentes taxones vegetales y para investigar patrones de evolución y divergencia en grupos de plantas. Además, la disponibilidad de secuencias de *rbcL* en bases de datos genéticas públicas facilita su uso en comparaciones a gran escala y en análisis de biogeografía y conservación. Sin embargo, su capacidad para distinguir entre

especies estrechamente relacionadas puede ser limitada debido a su alta conservación (Benson et al., 2006). Por lo tanto, a menudo se utiliza en combinación con otros marcadores moleculares para obtener una imagen más completa de la diversidad genética y la estructura filogenética (Dong et al., 2012).

2.2.4.4. Región trnH-psbA

El marcador molecular trnH-psbA es una región del genoma cloroplástico ampliamente utilizada en estudios de filogenia y diversidad genética en plantas. Esta región consiste en la secuencia del gen trnH (ARN de transferencia de histidina) y el gen psbA (subunidad A del fotosistema II), que están separados por un corto intergénico (Abdullah et al., 2020). El marcador trnH-psbA ha demostrado ser valioso debido a su variabilidad, lo que permite la diferenciación entre diferentes especies vegetales (Ya-Na et al., 2023).

El tamaño del marcador trnH-psbA puede variar entre diferentes especies, pero típicamente abarca alrededor de 268 a 614 pb (Loera-Sánchez et al., 2020). Esta longitud moderada facilita su amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su secuenciación posterior (Pang et al., 2012). En términos de composición nucleotídica, el marcador trnH-psbA puede presentar regiones altamente conservadas y regiones variables, lo que proporciona información útil para la reconstrucción de relaciones filogenéticas entre diferentes taxones vegetales (Loera-Sánchez et al., 2020).

La función principal del marcador trnH-psbA no está relacionada con la codificación de proteínas, sino que se utiliza principalmente para la identificación de especies en estudios de biodiversidad. Debido a su alta variabilidad inter-específica y baja variabilidad intra-específica, el marcador trnH-psbA es ideal para la identificación de especies (Whitlock et al., 2010).

El gen trnH codifica para un ARN de transferencia que participa en la traducción del código genético del ARN mensajero a proteínas en el ribosoma, mientras que el gen psbA codifica para la subunidad A del fotosistema II, que desempeña un papel crucial en la captura de energía luminosa durante la fotosíntesis (Abdullah et al., 2020). Por lo tanto, el marcador trnH-psbA no solo proporciona información sobre la diversidad genética de las plantas, sino que también puede ayudar a comprender aspectos funcionales del cloroplasto y la fotosíntesis.

2.2.5. Secuenciamiento Sanger

El secuenciamiento Sanger, también conocido como secuenciación de terminación de cadena, revolucionó el campo de la genética molecular al permitir la determinación precisa de la secuencia de nucleótidos en el ADN (Valencia et al., 2013). Desarrollado por Frederick Sanger y su equipo, este método se basa en la síntesis de una cadena complementaria de ADN marcada, deteniendo su elongación de manera controlada mediante la incorporación de nucleótidos marcados con dideoxinucleótidos (ddNTPs), los cuales carecen del grupo 3'-OH. Para finalmente, visualizar las bandas de fragmentos bajo luz ultravioleta, los fragmentos de ADN se separan según su tamaño utilizando electroforesis en gel. La longitud de los fragmentos de ADN se determina según su posición en el gel. La lectura de las bandas de fluorescencia permite reconstruir la secuencia de nucleótidos original de la cadena de ADN.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

La siguiente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS, Guayas) y en el banco de germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP, Pichincha) del INIAP.

3.1 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN CLOROPLÁSTICO DE MANDARINA.

3.1.1. Material vegetal

Se evaluaron seis genotipos de *Citrus* spp. pertenecientes a la colección del banco de germoplasma del Iniap (Tab. 1). Las accesiones fueron seleccionadas debido a sus características fisicoquímicas del fruto como (°Brix, ácidos titulables, tamaño y peso del fruto) que son idóneas para trabajos de mejoramiento.

Tabla 1. Accesiones de mandarinas utilizadas en este trabajo

| Nº | Código ECU ⁴ | Nombre común | Especie |
|----|-------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| 1 | 11274 | Mandarina King | <i>Citrus nobilis</i> |
| 2 | 11275 | Mandarina Cleopatra | <i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tanaka |
| 3 | 18383 | Mandarina Wilkin | <i>Citrus reticulata</i> |
| 4 | 18384 | Mandarina Chonera | <i>Citrus reticulata</i> |
| 5 | 18385 | Mandarina Criolla | <i>Citrus reticulata</i> |

⁴ El código ECU es un código otorgado por el DENAREF (Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos) que está conformado por tres siglas que representan el país de origen de la accesión en el banco de germoplasma y de cinco números que representan el orden de ingreso de la accesión en el banco de germoplasma.

3.1.2. Extracción de ADN cloroplastídico y PCR

Para la extracción de ADN, se realizó la colecta de material vegetal, de cada accesión seleccionada para este trabajo se tomó 6 ramas de manera aleatoria de los 4 puntos cardinales, las ramas con brotes de hojas de 2 semanas de edad. Después de etiquetarlos, se transportaron las ramas hacia el laboratorio de Biotecnología de la EELS en cisteína para preservar la integridad de las muestras.

Para iniciar con el proceso de extracción de ADN se tomaron dos hojas de cada una de las muestras, el tejido vegetal fue pulverizado y homogeneizado con la ayuda de nitrógeno líquido en morteros previamente refrigerados (Rogers & Bendich, 1989). El nitrógeno es utilizado para evitar la degradación del ADN y la producción de otros metabolitos que pudieran interferir con las pruebas moleculares. Se siguió el protocolo de (Pineda-Rodriguez et al., 2023) para llevar a cabo el proceso de extracción de ADN, que optimiza la utilización del kit de extracción Invitrogen™ PureLink™ Total Plant DNA Purification Kit (*Anexo 1*). Obtenido el ADN total, se almacenó en micro tubos de 1.5 ml tipo Eppendorf. a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para la evaluación de la calidad y cantidad de ADN después de la extracción, se realizó un gel de agarosa al 1,5% y se le agrego fluorocromo Sybr Safe a una concentración final de 0,005 uL/ml corridos en tampón TAE 1X a 100 Voltios durante 30 minutos en una cámara de electroforesis Labnet a la cual se le agrego TAE 1X como tampón de carga. A continuación, en cada pocillo se colocó una mezcla de 2 μL de tampón de carga *Blue Juice* y 4 μL de ADN (Diaz & Quilachamin, 2023). La concentración de ADN total en cada una de las muestras se determinó con la ayuda del equipo nanodrop.

Las PCR se realizaron con un termociclador (TECHNE TC-412) en un volumen de reacción 26 μL que contenía 20 uL de Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity, 4 uL de ADN total y 1 uL de cada cebador a una concentración de 200 nM. Las condiciones de la PCR fueron: temperatura inicial de desnaturalización de 94°C durante 2 min, luego 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto de seguidos de 30 segundos a una temperatura 55°C para permitir el annealing y un ciclo de extensión a 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 3 minutos (Chandrasekara et al., 2021). En cada grupo de muestras para

amplificación se incluyó un control negativo que contenía la mezcla de reactivos y se reemplazó el ADN por agua bidestilada estéril para detectar posible contaminación en la master mix. Se usaron tres genes como Marcadores moleculares (**Tab. 2**)

Para la evaluación de la calidad y tamaño de los fragmentos obtenidos mediante PCR se realizaron geles de agarosa al 1,5% y se le agrego fluorocromo Sybr Safe a una concentración final de 0,005 uL/ml corridos en tampón TAE 1X a 100 Voltios durante 30 minutos en una cámara de electroforesis Labnet a la cual se le agrego TAE- 1X como tampón de carga. A continuación, en cada posillo se colocó una mezcla de 2 µL de tampón de carga *Blue Juice* y 4 µL de producto de PCR.

Tabla 2. Genes y secuencia de los primers usados para la caracterización molecular de mandarina.

| PRIMERS | | | |
|------------------|---------|-----------------------------|----------------------------------|
| Nombre del Gen | | Secuencias | referencia |
| <i>trnH-PsbA</i> | Forward | CGCGCATGGTGGATTCACAATCC | (Zhao, <i>et al.</i> , 2018) |
| | Reverse | GTTATGCATGAACGTAATGCTC | |
| <i>matk</i> | Forward | CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG | (Jeanson., Labat & Little, 2011) |
| | Reverse | ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC | |
| <i>rbcL</i> | Forward | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC | (Uchoi <i>et al.</i> , 2016) |
| | Reverse | GCAGCAGCTAGTTCGGGGCTCCA | |

Los productos de amplificación fueron purificados con el kit de purificación PureLink™ PCR Purification Kit siguiendo el protocolo mostrado en el *Anexo 2*.

3.2. SECUENCIAMIENTO SANGER Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

La secuenciación a partir de los productos PCR fueron enviados al laboratorio de investigaciones de la UDLA (Universidad de Las Américas), las secuencias consenso a partir de los productos de PCR fueron obtenidas mediante secuenciamiento Sanger.

Los datos de secuencia de cpDNA se concatenaron y alinearon con la ayuda del programa MEGA 11, para la alineación de las secuencias se utilizó el algoritmo ClustalX (Thompson et al., 1997) con ajustes manuales según fuera necesario. Además, se empleó el programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021), para estimar el contenido de GC y la matriz sustitución de nucleótidos. Para el análisis de las secuencias cloroplásticas se utilizará el método estadístico de *Maximum likelihood*, este es un método de búsqueda de árboles filogenéticos, este método busca el árbol maxiverosímil, es decir el árbol cuya disposición maximice la probabilidad de obtener el árbol más probable con esas secuencias de nucleótidos (Parra & Suárez, 2017). con el modelo evolutivo de *Kimura 2-parameter*

(Machado et al., 2022). Se realizó una búsqueda heurística, intercambio de ramas por reconexión de bisección de árboles (TBR) y adición aleatoria por pasos con 1000 repeticiones. La robustez topológica se evaluó mediante análisis *bootstrap* con 2000 réplicas utilizando una simple adición de taxones.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS DEL ADN CLOROPLÁSTICO

La eficiencia en el proceso de extracción de ADN de tejidos vegetales depende de una serie de factores como: eficiencia del kit, estado del tejido y método de preparación de la muestra como lo menciona (Alejos et al., 2014). En este caso fue utilizado nitrógeno líquido para efectuar una ruptura mecánica eficiente de la pared celular, teniendo en consideración que el tejido utilizado fue brotes de hojas (Rogers & Bendich, 1989). Además, como se observa en la *tabla 3* los niveles de absorbancia A260/A280 y A260/A230 se encuentran en los límites de absorbancia para considerar al ADN de buena calidad y las cantidades de ADN son las adecuadas para tomarlo como punto de partida para llevar a cabo la amplificación de fragmentos mediante PCR (Desjardins & Conklin, 2010).

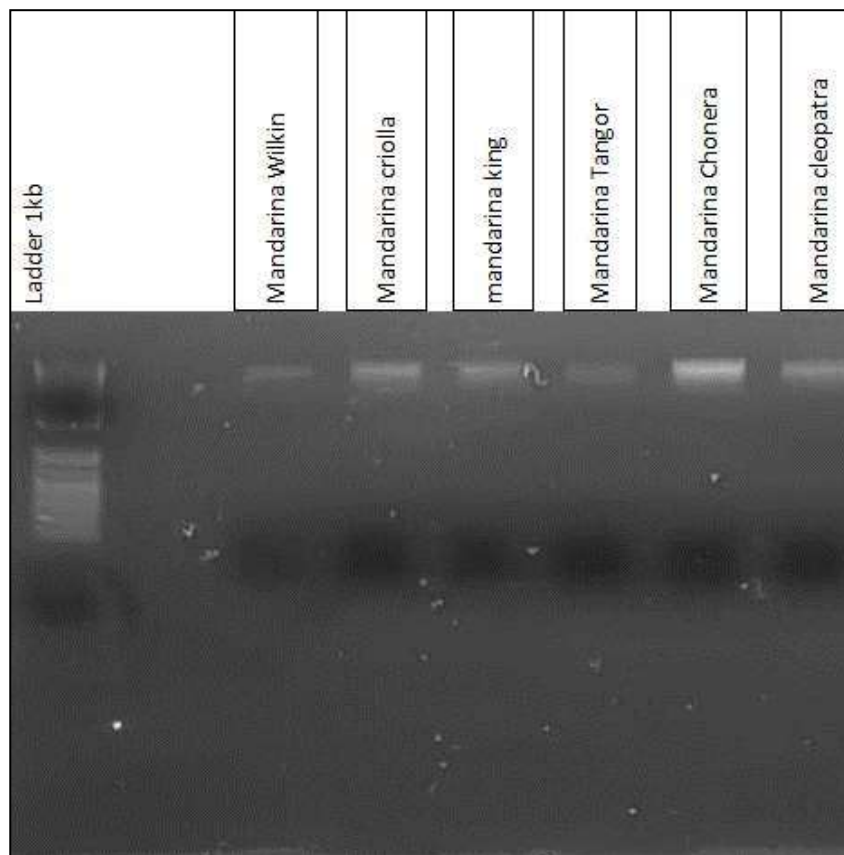


Figura 2. Gel de electroforesis después del proceso de extracción de ADN total, se observa la calidad del ADN después del proceso de extracción.

El método utilizado para la extracción de ADN fue el provisto por el Invitrogen™ *PureLink™ Total Plant DNA Purification Kit*, permitiendo un volumen final de 200 uL. Además, no solo permite un mayor volumen de ADN total al final del proceso, sino que como se observa en la *Fig2*. En la fotografía de la electroforesis en gel, existen bandas definidas lo que a su vez representa la calidad del ADN extraído como se puede observar en la *tabla 2*. La cantidad de ADN obtenida en el proceso de extracción se encuentra entre los 17 y los 31 ng/uL y la calidad del ADN según los límites de absorbancia en 260/280 y 260/230 se encuentran dentro de los rangos permitidos para poder decir que se ha obtenido un ADN de buena calidad después del proceso de extracción. Para la amplificación por PCR de las secuencias *trnH-PsbA*, *matk* y *rbcL*, las condiciones utilizadas para los primers fueron las mencionadas por (Gori et al., 2019), debido a esto la amplificación demuestra una adecuada amplificación para cada una de las accesiones del banco de germoplasma. La *Fig. 2* muestra los pesos moleculares de los 3 marcadores: el marcador utilizado para la el gen *trnH-PsbA* mostro un peso cercano a los 500 Pb, para el gen *rbcL* se observó un peso cercano a los 750 pb y finalmente el gen *matk* tiene un peso cerca de 1000 Pb, estos valores concuerdan a lo reportado en la bibliografía (Maloukh et al., 2017; Wong et al., 2013)

El uso de marcadores moleculares para caracterizar individuos es importante en este caso se utilizó marcadores del genoma cloroplástico, para caracterizar el banco de germoplasma de la EETP. Se han evaluado varios marcadores, incluidos *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA*, para determinar su eficacia y utilidad en este contexto. Un estudio utilizando los marcadores *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* demostró que, tanto *matk* como *rbcL* mostraron una mayor tasa de éxito en la amplificación por PCR en comparación con *trnH-psbA*. Además, los autores observaron que la tasa de éxito de la secuenciación de los marcadores fue alta para *rbcL* y *trnH-psbA*, lo que sugiere su aplicabilidad (Cabelin & Alejandro, 2016b)

Tabla 3. Determinación de concentración y calidad de ADN extraído (el rango mínimo de absorbancia a A260/A280 es de 1.8-2 y el rango rango mínimo de absorbancia a A260/A230es de 2.0 a 2.2

| Nombre de muestra | Concentración (ng/uL) | A260/A280 | A260/A230 |
|------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|
| ECU18383/Mandarina Wilkin | 27,621 | 1.84 | 1.99 |
| ECU18385/Mandarina criolla | 28,732 | 2.03 | 2.02 |
| ECU11274/Mandarina King | 16,835 | 1.95 | 1.98 |
| ECU18399/Mandarina Tangor | 17,188 | 1.81 | 2.1 |
| ECU18384/Mandarina chonera | 31,247 | 2.30 | 2.17 |
| ECU11274/Mandarina cleopatra | 23,440 | 1.84 | 2.12 |

Sin embargo, a pesar de la eficiencia en la amplificación, la capacidad discriminativa de cada marcador usado de manera independiente varía. Un estudio realizado por Yan et al. (2008) encontró que *matk* demostró una mayor variabilidad interespecífica en comparación con *trnH-psbA*. Por otro lado, *trnH-psbA* se destacó por su alta variabilidad intraespecífica y su capacidad para discriminar entre una amplia gama de especies de plantas (Yang et al., 2012)

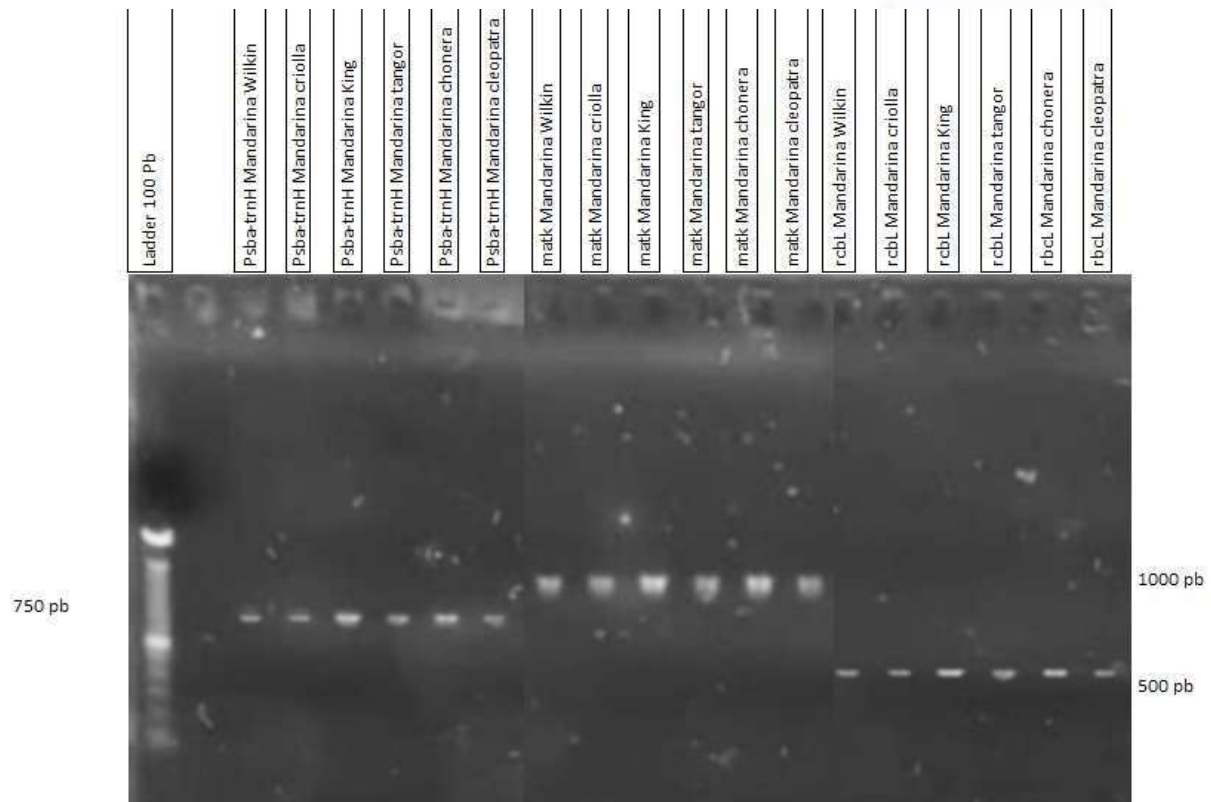


Figura 3. Productos de PCR para los marcadores *trnH-PsbA*, *matk* y *rbcL*, de izquierda a derecha.

Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar tanto la eficiencia de amplificación como la capacidad discriminativa al seleccionar marcadores moleculares para la caracterización del germoplasma vegetal.

4.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE GENES

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos de la caracterización molecular del banco de germoplasma de mandarinas, utilizando tres marcadores moleculares de tipo cloroplástico: *matK*, *rbcL* y *trnH-psbA*. Estos marcadores se seleccionaron debido a su alta variabilidad y utilidad en estudios filogenéticos y de diversidad genética en especies

vegetales. Se analizaron un total de seis accesiones de mandarinas, representativas de la diversidad genética presente en el banco de germoplasma, con el objetivo de comprender la estructura genética y las relaciones filogenéticas entre las diferentes variedades de mandarinas presentes en Ecuador.

La *Fig. 4* muestra el resultado del análisis molecular realizado en seis accesiones de mandarinas *Citrus* spp. del banco de germoplasma y tres genes específicos, *trnH-psbA*, *matk* y *rbcL*. La comparación se basa en la construcción de un dendrograma a partir de las secuencias concatenadas de los tres genes mencionados. Además, la *Fig. 4* permite relaciones inferiores entre filogenéticas entre las muestras. Para este ejemplo, 3 grupos son más seguros que representan individuos con características genéticas similares, por la misma razón, una relación filogenética más estrecha. Por otro lado, el mismo análisis también identifica la accesión ECU11275 como única que se destaca por su perfil genético en comparación con el resto de la población analizada.

Se obtuvieron seis secuencias correspondientes a los genes concatenados *trnH-psbA+matk+rbcL* adicionalmente se agregaron 4 secuencias del genoma cloroplástico obtenidas de GenBank de las especies: *C. tangerina*, *C. paradisi*, *C. aurantium* y *C. aurantifolia*, para obtener el árbol filogenético correspondiente se implementó el método *Maximum likelihood* para comprender la diversidad entre las diferentes accesiones del banco de germoplasma y su diversa relación entre ellos como se observa en la *fig4*.

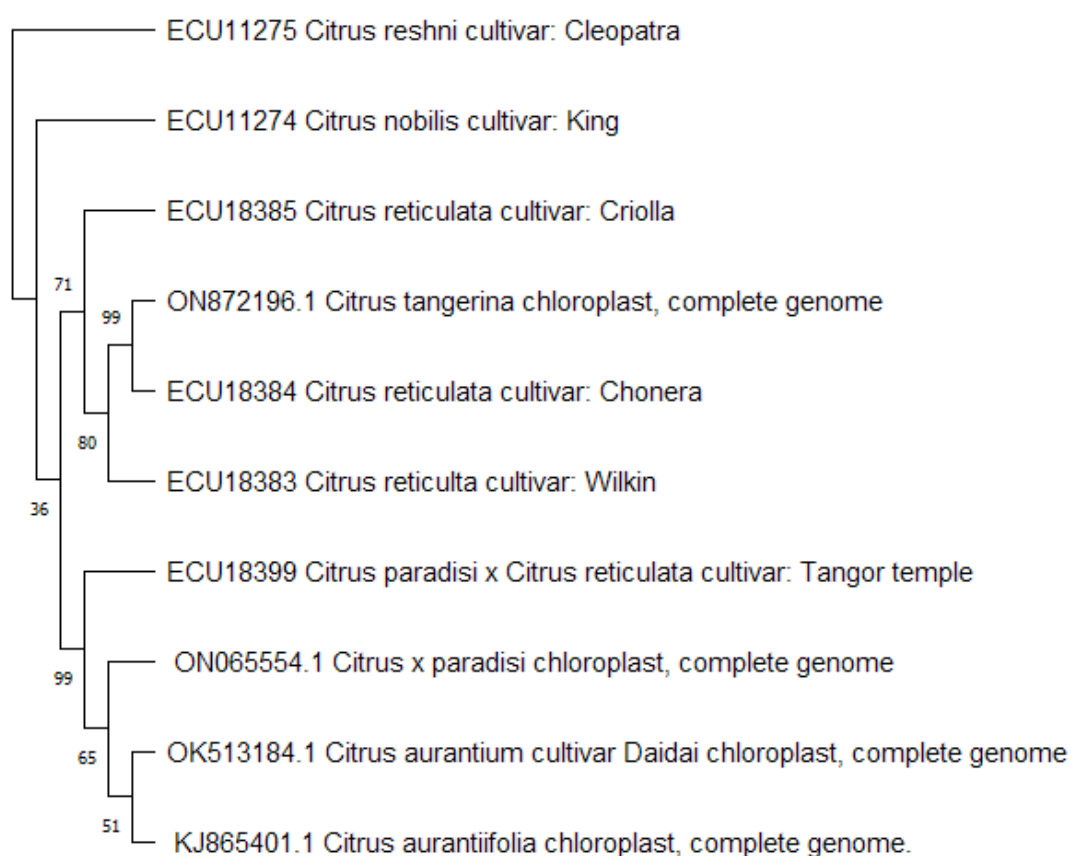


Figura 4. Árbol filogenético consenso de las secuencias concatenadas *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* de seis accesiones de *Citrus* spp. Del Banco de germoplasma del INIAP y cuatro accesiones de referencia del GenBank. Método ML.

Como se observa en el árbol filogenético (Fig. 5) el uso de las regiones concatenadas *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* permitió una discriminación a nivel de especie, y en este caso permitió la correcta identificación de accesiones. En el caso de la mandarina Chonera (ECU18384) en el banco de germoplasma se encuentra identificada como cultivar de la especie *C. reticulata*, sin embargo en el análisis filogenético de las secuencias concatenadas, esta accesión aparece en el mismo clado que *C. tangerina* cultivar Dancy, como lo menciona (Singh et al., 2019) en relación al riesgo de duplicados en las accesiones e identificaciones erróneas, en este caso existe una mala identificación del cultivar Chonera, esto es debido a que es un cultivar de origen local establecido en el litoral ecuatoriano, pero del cual no se tienen registros de caracterización morfoagronómica y mucho menos de una caracterización molecular que puedan otorgar datos fiables de su origen.

Aunque el uso de las secuencias *matk*, *rbcL* y *trnH-psbA* han sido reportados para la caracterización molecular a nivel de especies, híbridos y variedades de diferentes especies y géneros, como es el caso de *Actinia* que es un género particularmente difícil de trabajar pero en el estudio realizado por Weihong et al., (2018), determinaron la eficiencia de este grupo de marcadores cloroplásticos que fueron trabajados en combinación, como él es caso de *matk+rbcL* que mostró un nivel de caracterización a nivel intraespecífico, resultados similares fueron reportados en los géneros *Calamus* (Yang et al., 2012), resultados similares se observaron en cuanto la familia *Actinidia* (Weihong et al., 2018b), Apocynaceae (Cabelin & Alejandro, 2016a), *Camelia* (Ho et al., 2023). Del mismo modo y a nivel de subespecie tienen un alto grado discriminatorio en subespecies de *Rye* (Skuzza et al., 2019) y de un modo más específico a nivel de cultivares como es el caso de *Ficus larica L.* (Castro et al., 2015). En cítricos este grupo de marcadores ya ha sido reportado en estudios a nivel de especie lo hicieron (Gori et al., 2019; Mahadani & Ghosh, 2014; Viglietti et al., 2019).

A pesar de que la mayoría de los trabajos para la caracterización de bancos de germoplasma en nuestro país han sido realizados con la implementación de marcadores de tipo SSR, aunque ha sido reportado la utilización de marcadores SSR en cítricos (Luro et al., 2023; Martínez et al., 2024; Munankarmi et al., 2023) pudiendo ser caracterizados a nivel de cultivares de *Citrus spp* (García – Lor, 2013) pero a pesar de eso presentan algunas desventajas como lo son: el tiempo y los altos costos asociados con el proceso de diseño de cada marcador y su estandarización y aunque este tipo de marcadores es susceptible a mutaciones su nivel de respuesta no igual en todas las especies por lo que limita su uso al trabajar con diferentes especies. Por otro lado, los marcadores del genoma cloroplástico, tiene diversas ventajas al momento de realizar estudios de análisis filogenético. En primer lugar, tienen un alto número de copias y un tamaño de secuenciación completa relativamente pequeño, lo que lo hace adecuado para analizar las relaciones evolutivas en plantas (McNeal et al., 2006). Debido a su baja tasa de reemplazo y secuencia de ADN uniparental (Shaw et al., 2005; Chen y Liu, 2008). En segundo lugar, los cloroplastos tienen una estructura con 100 a 130 genes, altamente conservados, lo que hace que estos genomas sean más propicios para la comparación y el análisis de la evolución y el parentesco entre especies (Wicke et al., 2011).

Al identificar grupos genéticamente distintos (Fig. 5), se puede guiar la selección de muestras para programas de conservación *ex situ* (Rajpurohit & Jhang, 2015) o para

programas de fitomejoramiento genética (Quiroz-Chávez et al., 2012), asegurando así la preservación y el uso eficiente de la diversidad genética.

*Tabla 4. Matriz de sustitución de nucleótidos generada a partir de las secuencias utilizadas*⁵

| | A | T | C | G |
|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| A | - | 7.92 | 3.78 | 12.98 |
| T | 6.48 | - | 6.89 | 3.92 |
| C | 6.48 | 14.44 | - | 3.92 |
| G | 21.48 | 7.92 | 3.78 | - |

La matriz de sustitución de nucleótidos muestra las tasas de sustitución entre pares de nucleótidos en secuencias del género Citrus. Los valores más altos indican una mayor probabilidad de sustitución entre esos nucleótidos específicos. Por ejemplo, la tasa más alta observada es entre G y A con 21.48, lo que sugiere que estas transiciones son más comunes en las secuencias analizadas. Las tasas más bajas son entre C y G y G y C, ambas con 3.78, indicando que estas transversiones son menos probables.

En términos de diversidad genética, una alta tasa de sustitución puede introducir nuevas mutaciones y aumentar la diversidad genética, lo cual es crucial para la adaptación y supervivencia de una población frente a cambios ambientales y enfermedades. Sin embargo, en términos de estabilidad genética, un equilibrio adecuado en las tasas de sustitución es necesario (Parkinson et al., 2005). Tasas de sustitución demasiado altas pueden generar mutaciones perjudiciales o inestabilidad, mientras que tasas muy bajas pueden llevar a la pérdida de alelos importantes y aumentar el riesgo de endogamia y por lo tanto disminuir la variabilidad genética en la población (Hazarika et al., 2014).

⁵ Cada entrada muestra la probabilidad de sustitución de una base (fila) a otra base (columna). Las tasas de diferentes sustituciones transicionales se muestran en negrita y las de las sustituciones transversionales se muestran en cursiva. Las frecuencias de nucleótidos son 29.33% (A), 35.84% (T/U), 17.11% (C) y 17.72% (G). Este análisis involucró 10 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 1630 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- 1- A partir de las muestras recolectadas de las accesiones del banco de germoplasma se estableció una colección de ADN de las 6 accesiones almacenadas a -20°C. Con el análisis de calidad y cantidad de ADN con ayuda del *Nanodrop* se demostró la fiabilidad del kit utilizado. El análisis demostró la variabilidad entre las accesiones de mandarinas del banco de germoplasma, para la determinación se utilizó como outgroup 4 especies del género *Citrus*: *C. tangerina*, *C. paradisi*, *C. aurantium* y *C. aurantifolia*, permitiendo así una mayor discriminación de las accesiones de mandarinas en el banco de germoplasma de la EETP.
- 2- El análisis de las accesiones demostró que una de las accesiones se encontraba en el banco identificada de manera errónea (ECU18384 cultivar: Chonera). De las variedades de origen local como la cultivada en los cantones Patate y Caluma, siendo ambas de interés económico, no se tiene accesiones en el banco de germoplasma de la EETP. El árbol filogenético agrupa a *C. tangerina* y *C. reticulata* en el mismo clado, y agrupa a las limas dulces y pomelos en otro grupo, mostrando a los Tangores *Citrus paradisi* x *Citrus reticulata* con un mayor grado de cercanía a los Pomelos *C. paradisi* siendo esto acorde al origen de los Tangores al ser un híbrido.
- 3- Finalmente, se observa en el árbol, las especies del género *Citrus* tienen un alto grado de hibridación algo que se relaciona con la relativamente baja tasa de sustitución de nucleótidos, como es el caso de las mandarinas Tangor que son un híbrido entre y mandarina *C. reticulata* y pomelo *C. paradisi*. Además, el árbol demostró que a pesar de las muestras provienen de colecciones de trabajo, se conserva cierto grado de variación que es un factor importante para el mantenimiento de la especie como tal.

5.2 RECOMENDACIONES

1. A partir del trabajo realizado y la utilidad de los marcadores concatenados utilizados se puede ampliar y trabajar con la totalidad de las accesiones del banco de germoplasma de cítricos. El banco de germoplasma de cítricos de la EETP cuenta con un total de 69 accesiones de cítricos este trabajo sirve como un punto de partida

emprender un trabajo de caracterización de todas las accesiones en el banco, para identificar duplicados o identificaciones erróneas en cada una de las accesiones, como ya se dió el caso de la mandarina chonera, la cual se encontraba identificada de manera errónea en el banco.

2. Se recomienda renovar el banco de germoplasma tomando en cuenta las variedades locales, con el fin de preservación y su posterior caracterización, así como de variedades comerciales comunes en otros países, esto para nutrir la diversidad genética del banco y pensando en futuros trabajos de mejoramiento genético. Además, de la caracterización de todo el banco, teniendo en consideración que las especies del género *Citrus* tienen la capacidad de hibridarse para dar origen a nuevos híbridos de interés comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, Waseem, S., Mirza, B., Ahmed, I., & Waheed, M. T. (2020). Comparative analyses of chloroplast genomes of *Theobroma cacao* and *Theobroma grandiflorum*. *Biologia*, 75(5), 761–771. <https://doi.org/10.2478/S11756-019-00388-8>
- Adhikari, S., Saha, S., Biswas, A., Rana, T. S., Bandyopadhyay, T. K., & Ghosh, P. (2017). Application of molecular markers in plant genome analysis: a review. *The Nucleus*, 60(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s13237-017-0214-7>
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Researchgate.Net*. https://www.researchgate.net/profile/Alejandra-Vazquez-Lobo/publication/280731680_Microsatelites/links/55c3903008aeca747d5fa98f/Microsatelites.pdf#page=17
- Apaza, R. E. (2021). *Caracterización de tubérculos andinos y conocimientos tradicionales asociados a la conservación en la comunidad Coromata media - provincia Omasuyos* [UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/25858>
- Aristya, G. R., Putri, F., Kasiandari, R. S., & Musthofa, A. (2020). DNA Barcoding and Phylogenetic Analysis Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Based on matK (maturase K) Gene. *Key Engineering Materials*, 840, 162–170. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/KEM.840.162>
- Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Parra, S., Ochoa, D., Sánchez, J., & Guerrero, R. (2017). Caracterización de pastos naturalizados de la Región Sur Amazónica Ecuatoriana: potenciales para la alimentación animal. *Bosques Latitud Cero*, 7(2), 83–97. <http://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/323>
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2006). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1), D16–D20. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ157>
- Bowman, S. M., Patel, M., Yerramsetty, P., Mure, C. M., Zielinski, A. M., Bruenn, J. A., & Berry, J. O. (2013). A novel RNA binding protein affects rbcL gene expression and is specific to bundle sheath chloroplasts in C4 plants. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-138/FIGURES/8>
- Buckley, S. J., Brauer, C. J., Unmack, P. J., Hammer, M. P., & Beheregaray, L. B. (2022). Variation in intraspecific demography drives localised concordance but species-wide discordance in response to past climatic change. *BMC Ecology and Evolution*, 22(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12862-022-01990-2>

- Cabelin, V. L., & Alejandro, G. D. (2016a). Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA barcoding. *Pharmacognosy Magazine*, 12(46), 384. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.185780>
- Cabelin, V. L., & Alejandro, G. D. (2016b). Efficiency of matK, rbcL, trnH-psbA, and trnL-F (cpDNA) to molecularly authenticate Philippine ethnomedicinal Apocynaceae through DNA barcoding. *Pharmacognosy Magazine*, 12(46), 384. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.185780>
- Caicedo, M. G. (2020). *Control de las principales Moscas de la Fruta en el Cultivo de Naranja (Citrus sinensis)*. <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/7977>
- Callano, J. (2022). Genetic Assessment of Eggplant (*Solanum melongena* L.) and its Wild Crop Relatives in the Philippines through DNA Barcoding. *Silliman Journal*, 63(1). <http://sillimanjournal.su.edu.ph/index.php/sj/article/view/2>
- Carranza, D., Monteros, A., Tapia, C., & Tacán, M. (2015). *Caracterización morfoagronómica de 200 accesiones de papa nativa (Solanum tuberosum L.) conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP-Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3047>
- Carreras, C., García-Cisneros, A., Wangensteen, O. S., Ordóñez, V., Palacín, C., Pascual, M., & Turon, X. (2020). East is East and West is West: Population genomics and hierarchical analyses reveal genetic structure and adaptation footprints in the keystone species *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). *Diversity and Distributions*, 26(3), 382–398. <https://doi.org/10.1111/ddi.13016>
- Castañeda, C., Portela, R., & Morillo, Y. (2021). Caracterización molecular con marcadores ISSR de la colección de cítricos de la Universidad de los Llanos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 67–84. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/130/1302302006/html/>
- Castro, C., Hernandez, A., Alvarado, L., & Flores, D. (2015). DNA Barcodes in Fig Cultivars (*Ficus carica* L.) Using ITS Regions of Ribosomal DNA, the psbA-trnH Spacer and the matK Coding Sequence. *American Journal of Plant Sciences*, 06(01), 95–102. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.61011>
- Cervantes, D. F. (2007). *Caracterización molecular de la colección de ajíes (Capsicum spp) y calabazas y Cucurbita spp.) del banco de germoplasma del Instituto Nacional Autónomo de*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/234>

- Chalampunte, D., & Prado, P. (2005). *Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de tomate de árbol (Cyphomandra betacea Sendt) del banco de germoplasma del INIAP, Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/488>
- Chandrasekara, C. H. W. M. R., Naranpanawa, D. N. U., Bandusekara, B. S., Pushpakumara, D. K. N. G., Wijesundera, D. S. A., & Bandaranayake, P. C. G. (2021). Universal barcoding regions, rbcL, matK and trnH-psbA do not discriminate Cinnamomum species in Sri Lanka. *PLOS ONE*, *16*(2), e0245592. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0245592>
- Cruz, K. M. (2003). *Evaluación y caracterización morfológica y molecular por microsatelites de genotipos de maíz (Zea mays L.) de altura, INIAP, Pichincha, Ecuador, 2002*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/563>
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, *1*. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Díaz, G., & Quilachamin, J. (2023). *Aplicación del sistema de identificación molecular BARCODE para especies del género Epidendrum en Pichincha, Ecuador*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/24254>
- Dobrogojski, J., Adamiec, M., & Luciński, R. (2020). The chloroplast genome: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, *42*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S11738-020-03089-X/TABLES/3>
- Dong, W., Liu, J., Yu, J., Wang, L., & Zhou, S. (2012). Highly Variable Chloroplast Markers for Evaluating Plant Phylogeny at Low Taxonomic Levels and for DNA Barcoding. *PLoS ONE*, *7*(4), e35071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035071>
- FAO. (2021). *CITRUS FRUITFRESH AND PROCESSED Statistical bulletin 2020*.
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J. B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A. M., Luro, F., & Ollitrault, P. (2008a). Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*, *8*(1), 119–122. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01893.x>
- Froelicher, Y., Dambier, D., Bassene, J. B., Costantino, G., Lotfy, S., Didout, C., Beaumont, V., Brottier, P., Risterucci, A. M., Luro, F., & Ollitrault, P. (2008b). Characterization of microsatellite markers in mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco). *Molecular Ecology Resources*, *8*(1), 119–122. <https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01893.X>
- García – Lor, A. (2013). *Organización de la diversidad genética de los cítricos*. Universidad Politécnica de Valencia.

- Gori, M., Pecchioli, S., Giordani, E., Saeedi, M. A., Wafa, F. H., & Biricolti, S. (2019). Barcoding assessment of the Citrus species cultivated in the eastern Afghanistan. *Advances in Horticultural Science*, 33(3), 403–408.
- Hazarika, T. K., Hazarika, B. N., & Shukla, A. C. (2014). Genetic variability and phylogenetic relationships studies of genus Citrus L. with the application of molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(8), 1441–1454. <https://doi.org/10.1007/S10722-014-0188-0>/METRICS
- Henry, R. J. (2020). Innovations in plant genetics adapting agriculture to climate change. *Current Opinion in Plant Biology*, 56, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.11.004>
- Hermosa, V. B. (2010). *Caracterización molecular de la colección lojana de frejol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) conservada en el banco nacional de germoplasma del INIAP-Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4738>
- Hernández, A. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos | Revista Bio Ciencias. *Bio Ciencias*, 2(3), 113–118. <https://revistabiociencias.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/41/133>
- Ho, V. T., Nguyen, T. H., Nguyen, L. B. N., Nguyen, T. T. N., & Nguyen, M. P. (2023). COMPARISON OF rbcL AND trnH-psbA DNA BARCODES IN DIVERSE CAMELLIA SPECIES COLLECTION IN VIETNAM. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 55(3), 877–885. <https://doi.org/10.54910/sabrao2023.55.3.22>
- Ipinza, R., Molina, M. P., Gutiérrez, B., & Ortiz, O. (2011). Estrategia de mejoramiento y conservación de los recursos genéticos forestales de Chile para enfrentar el cambio climático. *Ciencia & Investigación Forestal*, 17(3), 359–384. <https://doi.org/10.52904/0718-4646.2011.376>
- Izurieta, C. C. (2010). *Caracterización molecular de maní (Arachis hypogaea, L.) del banco Nacional de Germoplasma de la Estación Experimental Santa Catalina–INIAP, Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4746>
- Jarma-Orozco, A., Ariza-Gonzalez, A., Jaraba-Navas, J., Rodríguez-Páez, L., Carlos Guzmán-Castro, J., Díaz-Rodríguez, D., Jiménez-Campos, Y., Ramírez-Campo, W., & Leal Gomez, N. (2023). Recursos fitogenéticos nativos de la región de La Mojana: una poderosa estrategia de resiliencia de los pequeños productores para mejorar la productividad ante los. *Revistas.Uniandes.Edu.Co*. <https://doi.org/10.53010/nys7.02>
- Jost, M., & Wanke, S. (2024). A comparative analysis of plastome evolution in autotrophic Piperales. *American Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1002/ajb2.16300>

- Kacar, Y., Uzun, A., Polat, I., Yesiloglu, T., Yilmaz, B., Gulsen, O., Tuzcu, O., Kamiloglu, M., Kurt, S., & Seday, U. (2013). Molecular characterization and genetic diversity analysis of mandarin genotypes by SSR and SRAP markers. *Journal of Food and Agriculture*, *11*(1), 516–521. https://www.academia.edu/download/50025266/Kacar_et_al._2013_journal_of_food_agriculture_environment.pdf
- Khaki, S., Khalilzadeh, Z., & Wang, L. (2020). Predicting yield performance of parents in plant breeding: A neural collaborative filtering approach. *PLOS ONE*, *15*(5), e0233382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233382>
- Kim, J.-H., Handayani, E., Wakana, A., Sato, M., Miyamoto, M., Miyazaki, R., Zhou, X., Sakai, K., Mizunoe, Y., Shigyo, M., & Masuda, J. (2020). Distribution and evolution of Citrus accessions with S3 and/or S11 alleles for self-incompatibility with an emphasis on sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck; Sfs3 or Sfs3sm]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *67*(8), 2101–2117. <https://doi.org/10.1007/s10722-020-00964-x>
- Koehler-Santos, P., Lúcia, A., Dornelles, C., & Brandão De Freitas, L. (2003). Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analyses. *SciELO Brasil*, *7*, 797–806. <https://www.scielo.br/j/pab/a/QvyBkVNw6QnnqXhSNHbXzdg/?lang=en>
- Lascuráin, M. , List, R. , Barraza, L. , Díaz Pardo, E. , Gual Sill, F. , & Maunder, M. (2009). Conservación de especies ex situ. Investigación. *Capital Natural de México*, *53*(2), 517–544.
- Li, C., Zhao, Y., Xu, Z., Yang, G., Peng, J., & Peng, X. (2020). Initial Characterization of the Chloroplast Genome of *Vicia sepium*, an Important Wild Resource Plant, and Related Inferences About Its Evolution. *Frontiers in Genetics*, *11*, 424049. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00073/BIBTEX>
- Li, Y., Zhou, S., Tong, X., Wang, L., & Xiang, T. (2019). Analysis of the origin of Citrus changshan-huyou by DNA barcode. *International Journal of Agriculture and Biology*, *22*(5).
- Lin, Z., Shen, S., Chen, W., & Li, H. (2013). Phylogenetic analyses of four species of *Ulva* and *Monostroma grevillei* using ITS, rbc L and 18S rDNA sequence data. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, *31*(1), 97–105. <https://doi.org/10.1007/S00343-013-2069-3/METRICS>

- Loera-Sánchez, M., Studer, B., & Kölliker, R. (2020). DNA barcode trnH-psbA is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. *BMC Research Notes*, *13*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-4897-5/TABLES/3>
- Luro, F., Paoli, M., Marchi, E., Costantino, G., & Tomi, F. (2023). Investigation of Diversity by Analyzing the Polymorphism of SSR Markers and the Composition of Leaf and Fruit Essential Oils of 72 Mandarins (*Citrus reticulata* Blanco). *Horticulturae*, *9*(5), 577. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE9050577/S1>
- Mahadani, P., & Ghosh, S. K. (2014). Utility of indels for species-level identification of a biologically complex plant group: a study with intergenic spacer in Citrus. *Molecular Biology Reports*, *41*(11), 7217–7222. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3606-7>
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *444*(2), 139–158. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2005.10.018>
- Maloukh, L., Kumarappan, A., Jarrar, M., Salehi, J., El-wakil, H., & Rajya Lakshmi, T. V. (2017). Discriminatory power of rbcL barcode locus for authentication of some of United Arab Emirates (UAE) native plants. *3 Biotech*, *7*(2), 144. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0746-1>
- Martinez, M. F. (2013). *Caracterización molecular de genotipos de mandarinas Citrus spp. mediante marcadores RAM' s (Microsatélites Amplificados al Azar) y Microsatélites*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/21786>
- Martínez, M. F., Rodríguez-Mora, D. M., & Murcia-Riaño, N. (2024). GENETIC DIFFERENTIATION OF CULTIVATED CITRUS FRUITS (*Citrus* spp.) IN COLOMBIA USING SSR MOLECULAR MARKERS. *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/AGROCIENCIA.V58I2.2950>
- Monteros, A., Tapia, C., & Borja, E. B. (2013). *Colecta y caracterización morfoagronómica in situ y molecular de capuli (Prunus serotina Ehrh) del banco nacional de germoplasma del INIAP-Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/928>
- Moose, S. P., & Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology*, *147*(3), 969–977. <https://doi.org/10.1104/PP.108.118232>
- Morales, N., Ogbonna, A. C., Ellerbrock, B. J., Bauchet, G. J., Tantikanjana, T., Teclé, I. Y., Powell, A. F., Lyon, D., Menda, N., Simoes, C. C., Saha, S., Hosmani, P., Flores, M., Panitz, N., Preble, R. S., Agbona, A., Rabbi, I., Kulakow, P., Peteti, P., ... Mueller, L.

- A. (2022). Breedbase: a digital ecosystem for modern plant breeding. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 12(7). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkac078>
- Mulneh, M. G. (2021). Impact of climate change on biodiversity and food security: a global perspective—a review article. *Agriculture & Food Security*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40066-021-00318-5>
- Munankarmi, N. N., Rana, N., Joshi, B. K., Bhattarai, T., Chaudhary, S., Baral, B., & Shrestha, S. (2023). Characterization of the genetic diversity of Citrus species of Nepal using simple sequence repeat (SSR) markers. *South African Journal of Botany*, 156, 192–201. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.03.014>
- Murillo, A., Peralta, E., Pinzón, J., Rivera, M., & Mazón, N. (2002). *Caracterización de accesiones de quinua del banco de germoplasma del INIAP en Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3167>
- Núñez-Colín, C., & Escobedo-López, D. (2014). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 1(1), 1–6. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6201345&info=resumen&idioma=SP>
- Ollitrault, P., Curk, F., & Krueger, R. (2020). Citrus taxonomy. In *The Genus Citrus* (pp. 57–81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00004-8>
- Orduz, J., Monroy, H., & Fischer, G. (2010). Phenological behavior of “Arrayana” mandarin in the piedmont of the Meta department, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 28(1), 63–70. https://www.researchgate.net/publication/262752832_Phenological_behavior_of_'Arrayana'_mandarin_in_the_piedmont_of_the_Meta_department_Colombia
- Orrego, C. E., Rodríguez, Y., Zemanate, K., & Rodríguez, L. J. (2021). *PRODUCTIVIDAD Y COMPETITIVIDAD FRUTÍCULA ANDINA Producto 3: Informe técnico de resultados sobre la productividad alcanzada por cultivo y por país*. www.fontagro.org
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., Cherny, S. S., & Chen, S. (2012). Utility of the trnH-psbA Intergenic Spacer Region and Its Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 7(11), e48833. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048833>
- Paredes, N., Monteros, Á., Tapia, C., Lima, L., Tacán, M., & Alulema, V. (2018). Descripción de la Diversidad Morfológica de la Colección Nacional de Yuca (Manihot esculenta Crantz) en la Amazonía Ecuatoriana. *1er Congreso Internacional Alternativas*

Tecnológicas Para La Producción Agropecuaria Sostenible En La Amazonía Ecuatoriana, 1–8.

- Parkinson, C. L., Mower, J. P., Qiu, Y. L., Shirk, A. J., Song, K., Young, N. D., DePamphilis, C. W., & Palmer, J. D. (2005). Multiple major increases and decreases in mitochondrial substitution rates in the plant family Geraniaceae. *BMC Evolutionary Biology*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-73/TABLES/1>
- Parra, G., & Suárez, M. (2017). SISTEMÁTICA MOLECULAR y BIOINFORMÁTICA. In R. Mata, A. Castañeda, García Erick, M. Honey, M. Mendoza, & I. Cervantes (Eds.), *academia.edu* (1st ed.). https://www.academia.edu/download/89241559/Sistematica_Molecular_y_Bioinformatica_Parte_2.pdf#page=49
- Patwarhan, A., Roy, A., & Ray, S. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
- Penjor, T., Yamamoto, M., Uehara, M., Ide, M., Matsumoto, N., Matsumoto, R., & Nagano, Y. (2013). Phylogenetic Relationships of Citrus and Its Relatives Based on matK Gene Sequences. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062574>
- Peres, S. (2016). Saving the gene pool for the future: Seed banks as archives. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 55, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2015.09.002>
- Pineda-Rodriguez, Y. Y., Pompelli, M. F., Jarma-Orozco, A., Rodríguez, N. V., & Rodríguez-Paez, L. A. (2023). A New and Profitable Protocol to DNA Extraction in *Limnospira maxima*. *Methods and Protocols 2023, Vol. 6, Page 62*, 6(4), 62. <https://doi.org/10.3390/MPS6040062>
- Plaza, L., Solórzano, G., Guerrero, H., & Duicela, L. (2015). *Caracterización fenotípica del germoplasma de Coffea canephora Pierre base para su mejoramiento en Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/4576>
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J. P. T., & Hyvönen, J. (2013). Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods 2013* 9:1, 9(1), 1–32. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-6>
- Priyanka, V., Kumar, R., Dhaliwal, I., & Kaushik, P. (2021). Germplasm Conservation: Instrumental in Agricultural Biodiversity—A Review. *Sustainability*, 13(12), 6743. <https://doi.org/10.3390/su13126743>

- Quiroz-Chávez, J., García-Pérez, M., & Quiroz-Figueroa, F. (2012). Mejoramiento vegetal usando genes con funciones conocidas. *Revista Científica de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sostenible*, ISSN-e 1665-0441, Vol. 8, N°. Extra 3, 2, 2012, Págs. 79-92, 8(3), 79–92. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7865505&info=resumen&idioma=SPA>
- Rajpurohit, D., & Jhang, T. (2015). In Situ and Ex Situ Conservation of Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge. *Plant Genetic Resources and Traditional Knowledge for Food Security*, 137–162. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0060-7_8
- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1989). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, 73–83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Rousselle, M., Simion, P., Tilak, M. K., Figuet, E., Nabholz, B., & Galtier, N. (2020). Is adaptation limited by mutation? A timescale-dependent effect of genetic diversity on the adaptive substitution rate in animals. *PLoS Genetics*, 16(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1008668>
- Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic Diversity, Conservation, and Utilization of Plant Genetic Resources. *Genes*, 14(1), 174. <https://doi.org/10.3390/genes14010174>
- Sallam, A., Amro, A., EL-Akhdar, A., Dawood, M. F. A., Kumamaru, T., & Stephen Baenziger, P. (2018). Genetic diversity and genetic variation in morpho-physiological traits to improve heat tolerance in Spring barley. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2441–2453. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4410-6>
- Sarvamangala, C., Gowda, M. V. C., & Varshney, R. K. (2011). Identification of quantitative trait loci for protein content, oil content and oil quality for groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Field Crops Research*, 122(1), 49–59. <https://doi.org/10.1016/J.FCR.2011.02.010>
- Sen, L., Fares, M. A., Liang, B., Gao, L., Wang, B., Wang, T., & Su, Y. J. (2011). Molecular evolution of *rbcL* in three gymnosperm families: Identifying adaptive and coevolutionary patterns. *Biology Direct*, 6(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-6-29/TABLES/5>
- Singh, N., Wu, S., Raupp, W. J., Sehgal, S., Arora, S., Tiwari, V., Vikram, P., Singh, S., Chhuneja, P., Gill, B. S., & Poland, J. (2019). Efficient curation of genebanks using next generation sequencing reveals substantial duplication of germplasm accessions. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37269-0>
- Skuza, L., Szućko, I., Filip, E., & Adamczyk, A. (2019). DNA Barcoding in Selected Species and Subspecies of Rye (*Secale*) Using Three Chloroplast Loci (*matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*).

- Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(1), 54–62.
<https://doi.org/10.15835/NBHA47111248>
- Sonnino, A. (2017). International Instruments for Conservation and Sustainable Use of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture: An Historical Appraisal. *Diversity*, 9(4), 50. <https://doi.org/10.3390/d9040050>
- Steinegger, M., & Salzberg, S. L. (2020). Terminating contamination: Large-scale search identifies more than 2,000,000 contaminated entries in GenBank. *Genome Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-020-02023-1>
- Sun, J., Wang, Y., Liu, Y., Xu, C., Yuan, Q., Guo, L., & Huang, L. (2020). Evolutionary and phylogenetic aspects of the chloroplast genome of *Chaenomeles* species. *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67943-1>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tapia, C., Zambrano, E., & Monteros, A. (2008). *Estado de los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación en Ecuador: A mas uso, mas conservación*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2711>
- Tapia, E., Gutierrez, M., Warburton, M., Santacruz, A., & Villegas, A. (2005). Characterization of madarin (CITRUS SPP.) Using morphological and aflp markers. *Interciencia*, 30, 687–693. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442005001100007&script=sci_arttext
- Tiwari, A., Tikoo, S. K., Angadi, S. P., Kadaru, S. B., Ajanahalli, S. R., & Vasudeva Rao, M. J. (2022). Designing Plant Breeding Programs for Targeted Deliveries. In *Market-Driven Plant Breeding for Practicing Breeders* (pp. 69–100). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5434-4_3
- Turudić, A., Liber, Z., Grdiša, M., Jakše, J., Varga, F., & Šatović, Z. (2021). Towards the Well-Tempered Chloroplast DNA Sequences. *Plants*, 10(7), 1360. <https://doi.org/10.3390/plants10071360>
- Udensi, O. U., Ita, E. E., Ikpeme, E. V., Ubi, G., & Emeagi, L. I. (2017). Sequence analysis of Maturase K (matK): A chloroplast-encoding gene in some selected pulses. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 23(2), 213–230. <https://doi.org/10.4314/GJPAS.V23I2.2>

- Vaca, C. M. (2006). *Caracterización morfoagronómica de la colección de uvilla (Physalis peruviana L.) del banco de germoplasma del INIAP, Ecuador*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/530>
- Valarezo, A., Valarezo, O., Mendoza, A., & Hugo Álvarez. (2014). *Guía técnica sobre el manejo de los cítricos en el Litoral Ecuatoriano. Manual Técnico N° 101. INIAP*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1194>
- Valarezo, M., Valarezo, O., Mendoza, A., & Álvarez, H. (2014). *Guía técnica sobre el manejo de los cítricos en el Litoral ecuatoriano* (2da ed.).
- Valencia, A., Pervaiz, A., Husami, A., Qian, Y., & Zhang, K. (2013). *Sanger Sequencing Principles, History, and Landmarks*. 3–11. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9032-6_1
- Viglietti, G., Galla, G., Porceddu, A., Barcaccia, G., Curk, F., Luro, F., & Scarpa, G. (2019). Karyological Analysis and DNA Barcoding of Pompia Citron: A First Step toward the Identification of Its Relatives. *Plants*, 8(4), 83. <https://doi.org/10.3390/plants8040083>
- Viteri, M., & Tapia, C. (2018). Ecuadorian economy: from agricultural production to service. *Revista Espacios*, 39(32).
- Wang, N., Li, C., Kuang, L., Wu, X., Xie, K., Zhu, A., Xu, Q., Larkin, R. M., Zhou, Y., Deng, X., & Guo, W. (2022). Pan-mitogenomics reveals the genetic basis of cytonuclear conflicts in citrus hybridization, domestication, and diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(43). <https://doi.org/10.1073/pnas.2206076119>
- Weihong, B., Li, D., & Li, X. (2018a). DNA barcoding of *Actinidia* (Actinidiaceae) using internal transcribed spacer, *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*, and its taxonomic implication. *New Zealand Journal of Botany*, 56(4), 360–371. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2018.1491009>
- Weihong, B., Li, D., & Li, X. (2018b). DNA barcoding of *Actinidia* (Actinidiaceae) using internal transcribed spacer, *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*, and its taxonomic implication. *New Zealand Journal of Botany*, 56(4), 360–371. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2018.1491009>
- Whitlock, B. A., Hale, A. M., & Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 5(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0011533>
- Wong, K.-L., But, P.-H., & Shaw, P.-C. (2013). Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal *Gentiana* species and their adulterants. *Chinese Medicine*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-8-16>

- Wu, Y., Li, M., Yang, Y., Jiang, L., Liu, M., Wang, B., & Wang, Y. (2018). Authentication of Small Berry Fruit in Fruit Products by DNA Barcoding Method. *Journal of Food Science*, 83(6), 1494–1504. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14177>
- Ya-Na, L., Chun-Yong, Y., Lin-Chun, S., Zhong-Lian, Z., An-Shun, X., Li-Xia, Z., Xue-Lan, L., & Hai-Tao, L. (2023). Identification of medicinal plants within the Apocynaceae family using ITS2 and psbA-trnH barcodes. *Elsevier*, 37. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(20\)30071-6](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(20)30071-6)
- Yang, H., Dong, Y.-R., Gu, Z.-J., Liang, N., & Yang, J.-B. (2012). A preliminary assessment of matK, rbcL and trnH—psbA as DNA barcodes for Calamus (Arecaceae) species in China with a note on ITS. *Annales Botanici Fennici*, 49(5), 319–330.
- Yang, H.-Q., Dong, Y.-R., Gu, Z.-J., Liang, N., & Yang, J.-B. (2012). A preliminary assessment of matK, rbcL and trnH-psbA as DNA barcodes for Calamus (Arecaceae) species in China with a note on ITS. *Annales Botanici Fennici*, 49(5), 319–330. <http://www.jstor.orgURL:http://www.jstor.org/stable/23728208http://www.jstor.org/page/info/about/policies/terms.jsp>
- Yang, X., Huang, Y., Li, Z., & Chen, J. (2021). Complete plastid genome of *Primula calliantha* Franch. (Primulaceae): an alpine ornamental plant endemic to Hengduan Mountain, China. *Mitochondrial DNA Part B*, 6(9), 2643–2645. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1963868>
- Yao, X., Tan, Y. H., Yang, J. B., Wang, Y., Corlett, R. T., & Manen, J. F. (2019). Exceptionally high rates of positive selection on the rbcL gene in the genus *Ilex* (Aquifoliaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12862-019-1521-1/FIGURES/3>
- Yonekura, R., Kawamura, K., Research, K. U.-E., & 2007, undefined. (2007). A peculiar relationship between genetic diversity and adaptability in invasive exotic species: bluegill sunfish as a model species. *Springer*, 22(6), 911–919. <https://doi.org/10.1007/s11284-007-0357-0>
- Zabala, I. (2021). *Manejo agronómico del cultivo de Mandarina (Citrus reticulata), en el Ecuador*. UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO .
- Zhao, B., Li, J., Yuan, R., & Mao, S. (2017). *Biotechnology & Biotechnological Equipment Adaptive evolution of the rbcL gene in the genus Rheum (Polygonaceae) Adaptive evolution of the rbcL gene in the genus Rheum (Polygonaceae)*. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1288072>

ANEXOS

ANEXO 1. Experienced Users Procedure Invitrogen™ PureLink™

Introduction This quick reference sheet is included for experienced users of the PureLink® Plant Total DNA Purification Kit. If you are a first time user, refer to the details included in this manual.

| Step | Action |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Preparing Plant Lysate | <ol style="list-style-type: none">1. For hard plant tissue, freeze the tissue in liquid nitrogen and grind the tissue to a powder. For soft, non-fibrous plant tissue, cut the tissue into small pieces. For lyophilized samples, proceed to Step 2.2. Add 250 µL Resuspension Buffer (R2) to 100 mg plant tissue. Prepare lysate by homogenizing the soft tissue with a homogenizer/tissue grinder or vortexing the ground tissue/lyophilized sample until the sample is completely resuspended.3. Add 15 µL 20% SDS and 15 µL RNase A (20 mg/mL) to lysate.4. Incubate the lysate at 55°C for 15 minutes to complete lysis.5. Centrifuge the lysate at high speed for 5 minutes to remove insoluble materials.6. Transfer supernatant to a sterile microcentrifuge tube and add 100 µL Precipitation Buffer (N2) supplied with the kit to the clear lysate. Mix well and incubate on ice for 5 minutes.7. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 5 minutes at room temperature to produce a clear lysate.8. Transfer 250 µL clear lysate to a new, sterile microcentrifuge tube and add 375 µL Binding Buffer (B4) with ethanol (page 12) to the lysate. Mix well.9. Proceed to Purification Procedure (step 1, page 5). |

| Step | Action |
|------|--------|
|------|--------|

| | |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Purification Procedure | <p>The purification procedure is designed for use with a microcentrifuge capable of centrifuging $>10,000 \times g$.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Add sample from Step 8, page 4 to a PureLink® Spin Cartridge in a collection tube. 2. Centrifuge the cartridge at $10,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through and place the spin column into the Wash Tube supplied with the kit. 3. Wash the cartridge with 500 μL Wash Buffer (W4). 4. Centrifuge the cartridge at $10,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through and place the column into the tube. 5. Wash the cartridge with 500 μL Wash Buffer (W5) with ethanol (page 12). 6. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 30 seconds at room temperature. Discard the flow through and place the column into the tube. 7. Repeat Steps 5–6 one more time. 8. Centrifuge the column at maximum speed for 2 minutes at room temperature to remove any residual Wash Buffer (W5). Discard the collection tube. 9. Place the spin column in a sterile DNase-free 1.5-mL microcentrifuge tube. 10. Elute with 100 μL Elution Buffer (E1) or sterile, distilled water (pH >7.0). 11. Incubate at room temperature for 1 minute. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute. <i>The elution tube contains the purified DNA.</i> 12. To recover more DNA, perform a second elution step using 100 μL Elution Buffer. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. <i>The elution tube contains the purified DNA. Remove and discard the column.</i> 13. Store the purified DNA at -20°C or use DNA for the desired downstream application. |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Anexo 2 Procedure for Purifying PCR Products Invitrogen™ PureLink™

1. Add 4 volumes of Binding Buffer (B2) to 1 volume of PCR reaction (50–100 μL). Mix well.
2. Remove a PureLink® Clean-up Spin Column in a Wash Tube from the package.
3. Add sample in Binding Buffer from step 1, above, to the PureLink® Spin Column.
4. Centrifuge the PureLink® Spin Column at room temperature at $10,000 \times g$ for 1 minute.
5. Discard the flow through and replace the PureLink® Spin Column into the Wash Tube.
6. Add 650 μL Wash Buffer with ethanol (page 7) to the PureLink® Spin Column.
7. Centrifuge the PureLink® Spin Column at room temperature at $10,000 \times g$ for 1 minute. Discard the flow-through from the Wash Tube and replace the PureLink® Spin Column into the tube.
8. Centrifuge the PureLink® Spin Column at maximum speed at room temperature for 2–3 minutes to remove any residual Wash Buffer. Discard the Wash Tube.
9. Place the PureLink® Spin Column in a clean 1.7-mL PureLink® Elution Tube (supplied with the kit).
10. Add 50 μL Elution Buffer (E1) or sterile, distilled water (pH >7.0) to the center of the PureLink® Spin Column.

11. Incubate the PureLink® Spin Column at room temperature for 1 minute.
12. Centrifuge the PureLink® Spin Column at maximum speed for 1 minute.
13. The elution tube contains the purified PCR product. Remove and discard the PureLink® Spin Column. The recovered elution volume is ~48 µL.

The elution tube contains the purified PCR product. Store the purified DNA at 4°C for immediate use or at -20°C for long-term storage

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

